

## Fe de erratas:

- **Página 19. Línea 19:**

Dice: pié Debe decir: pie

- **Página 35. Línea 10:**

Dice: género, tiempo de evolución de la diabetes e índice tobillo-brazo (ITB)

Debe decir: género, IMC, HbA1c y filtrado glomerular.

- **Página 70. Línea 8:**

Dice: el riesgo de prueba patológica fue del 28%

Debe decir: el riesgo de prueba patológica fue del 27%,

- **Página 84. Línea 13:**

Dice: por cada incremento de un 1%, un 28% de riesgo de ..

Debe decir: por cada incremento de un 1%, un 27% de riesgo de ..

- **Página 85. Línea 3:**

Dice: “de forma que los pacientes con mayor afectación neuropática presentaban en su historial clínico antecedentes de dislipemia, en su mayoría en tratamiento hipolipemiente, y unos niveles más elevados de LDL, apo B y triglicéridos”

Debe decir: “de forma que los pacientes con **mayor** afectación neuropática presentaban en su historial clínico menor prevalencia de dislipemia y tratamiento hipolipemiente, sin embargo unos niveles más elevados de LDL, apo B y triglicéridos”

- **Página 96. Línea 9:**

Dice: peroxidación lipídica y el EO<sup>151</sup>

Debe decir: peroxidación lipídica y el EO<sup>152</sup>

- **Página 108. Línea 15 (ref. 31):**

Dice: Fanapour PC, Yug B, Kochar MS. Hyperhomocysteinemia: an additional cardiovascular risk factor. 1999; 98 (8): 51-4.

Debe decir: Fanapour PC, Yug B, Kochar MS. Hyperhomocysteinemia: an additional cardiovascular risk factor. WMJ 1999; 98 (8): 51-4.



VNIVERSITAT D VALÈNCIA

---

**FACULTAD DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA**

**TESIS DOCTORAL**

**ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA  
POLINEUROPATÍA DIABÉTICA**

**Mercedes Molina Méndez**

Licenciada en Medicina y Cirugía

Especialidad en Endocrinología y Nutrición

**Dirigida por:**

**D. Juan F. Ascaso Gimilio**

**D. José T. Real Collado**

**Valencia 2014**



**FACULTAD DE MEDICINA**



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

---

**FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

**TESIS DOCTORAL**

**ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA  
POLINEUROPATÍA DIABÉTICA**

**Presentada por:**

**Mercedes Molina Méndez**

Licenciada en Medicina y Cirugía

Especialidad en Endocrinología y Nutrición

**Dirigida por:**

**D. Juan F. Ascaso Gimilio**

**D. José T. Real Collado**





VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

---

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

Juan F. Ascaso Gimilio, Doctor en medicina y Catedrático de Universidad del Departament de Medicina de la Universitat de Valencia y José T. Real Collado, Doctor en medicina y Profesor Titular de Universidad del Departament de Medicina de la Universitat de Valencia.

CERTIFICAN:

Que Dña. Mercedes Molina Méndez, licenciada en medicina, ha realizado bajo nuestra dirección la tesis doctoral titulada: "Estudio del estrés oxidativo en la polineuropatía diabética", y que reúne todos los requisitos para ser presentada y defendida para optar al Grado de Doctor por la Universitat de Valencia.

Valencia, 15 de Octubre de 2014.

Fdo. Dr. Juan F. Ascaso

Fdo. Dr. José T. Real



**A Arturo**  
**A mis hijos, David y Marcos**



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, he de agradecer al Dr. José T. Real su apoyo incondicional a este proyecto, sus acertadas explicaciones, y su inestimable confianza, sin los cuales no habría sido posible este trabajo, y al Dr. Juan F. Ascaso por su apoyo y colaboración en todo momento.

Mi agradecimiento al Dr. R. Carmena por haberme dado la oportunidad, junto con su confianza, para iniciar este proyecto.

Deseo agradecer al Dr. Javier Chaves y al resto de integrantes del Laboratorio su trabajo y dedicación, imprescindibles para el resultado final de estos años de trabajo.

También a Geles por su apoyo, cariño y eficacia.

Por último, quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de alguna forma u otra han contribuido en la realización de esta tesis doctoral, pero en especial a mi marido y mis hijos, por su apoyo y comprensión tras tantas horas de dedicación a este trabajo, escatimadas a la vida familiar.



# ÍNDICE



<b>LISTADO DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>5</b>
<b>LISTADO DE FIGURAS.....</b>	<b>7</b>
<b>LISTADO DE TABLAS.....</b>	<b>9</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
<b>1. La diabetes, un problema de salud pública.....</b>	<b>13</b>
<b>2. La neuropatía diabética, una complicación crónica clave en el curso de la diabetes .....</b>	<b>14</b>
2.1. Introducción .....	14
2.2. El papel de la PNP en el desarrollo del pie diabético .....	16
<b>3. ¿Qué conocemos de la fisiopatología de la polineuropatía diabética?.....</b>	<b>17</b>
3.1. Los factores clásicos .....	17
3.2. Hiperhomocistinemia, marcador o promotor de daño tisular. ....	18
3.3. El estrés oxidativo.....	20
3.3.1. Papel del EO como desencadenante de las complicaciones microvasculares. ....	20
3.3.2. Papel del EO en la disfunción neural .....	24
<b>4. Figuras .....</b>	<b>27</b>
<b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
<b>III. SUJETOS Y MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
<b>1. SUJETOS .....</b>	<b>35</b>
1.1. Criterios de inclusión .....	35
1.2. Criterios de exclusión .....	35
<b>2. Métodos .....</b>	<b>37</b>
2.1. Parámetros clínicos generales .....	37
2.2. Parámetros clínicos específicos .....	39
2.3. Parámetros bioquímicos.....	42
2.4. Marcadores de estrés oxidativo.....	43
<b>3. Métodos estadísticos .....</b>	<b>44</b>
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
<b>1. Parte Primera:</b>	
<b>Asociación de factores clásicos y niveles de homocisteína plasmática con la presencia y grado de PNP (objetivos 1 y 2) .....</b>	<b>49</b>
1.1. Características generales de la cohorte estudiada .....	49
1.2. Objetivo nº 1: Asociación de factores clásicos con la presencia y gravedad de PNP. ....	54
1.2.1. Determinación de la asociación de factores clásicos con la presencia de PNP.....	54
1.2.1.1. Características generales clínicas y antropométricas .....	54
1.2.1.2. Factores de riesgo cardiovascular y comorbilidades asociadas.....	55

1.2.1.3. Tratamientos antidiabéticos .....	57
1.2.1.4. Parámetros bioquímicos .....	58
1.2.2. Determinación de la asociación de factores clásicos con el grado de PNP...	60
1.2.2.1. Características generales clínicas y antropométricas .....	60
1.2.2.2. Factores de riesgo cardiovascular y comorbilidades asociadas.....	62
1.2.2.3. Tratamientos antidiabéticos .....	64
1.2.2.4. Parámetros bioquímicos .....	65
1.3. Objetivo nº 2: Asociación de los niveles de homocisteína plasmática con la presencia y grado de PNP. ....	68
1.3.1. Asociación de los niveles de homocisteína plasmática con la presencia de PNP.....	68
1.3.2. Análisis de regresión múltiple.....	70
1.3.3. Asociación de los niveles de homocisteína plasmática con el grado de PNP.....	71
<b>2. Parte Segunda:</b>	
<b>Asociación del estrés oxidativo con el grado de PNP en un subgrupo de pacientes diabéticos de nuestra cohorte (Objetivo 3).....</b>	<b>73</b>
2.1. Características generales del subgrupo estudiado.....	73
2.2. Descriptivo de casos y controles.....	76
2.3. Estudio comparativo de los marcadores de estrés oxidativo y parámetros biológicos destacados entre casos y controles. ....	79
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>81</b>
<b>1. Importancia del estudio.....</b>	<b>83</b>
<b>2. Asociación de factores clásicos con la presencia y gravedad de la neuropatía diabética.....</b>	<b>84</b>
<b>3. Asociación entre la presencia y gravedad de neuropatía diabética con los niveles de homocisteína plasmática.....</b>	<b>87</b>
<b>4. Asociación de marcadores de EO con la presencia de PNP.....</b>	<b>90</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>99</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>103</b>

**LISTADO DE ABREVIATURAS**

ADA: American Diabetes Association  
ADN: ácido desoxirribonucleico  
ADOs: antidiabéticos orales  
AGE: productos de glicosilación avanzada  
ALT: alanino-amino transferasa  
AST: aspartato aminotransferasa  
ATP: Adult Treatment Panel  
BHMT: betaína-homocisteínametiltransferasa  
CBS: cistation beta-sintetasa  
CBS: cistationina- $\beta$ -sintetasa  
cHDL: colesterol HDL  
CI: cardiopatía isquémica  
cLDL: colesterol LDL  
CT: colesterol total  
DAG: diacil glicerol  
DHAP: dihidroxiacetona fosfato  
DM: diabetes mellitus  
EAP: enfermedad arterial periférica  
ECA: enzima convertidora de la angiotensina  
ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas  
EO: estrés oxidativo  
FADH<sub>2</sub>: flavín adenín dinucleótido reducida  
GADPDH: gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa reducida  
GAFT: glutamine:fructose-6 phosphate amidotransferase  
GGT: gamma-glutamyl transpeptidasa.  
GLcNac: acetylglucosamine  
GPX: glutation peroxidasa  
GSH: glutatión reducido  
GSSG: glutatión oxidado  
HbA1c: hemoglobina glicosilada  
HPLC: cromatografía de alta densidad  
IDF: International Diabetes Federation  
IMC: índice de masa corporal  
ITB: índice tobillo-brazo  
MAT: metionina adenosiltransferasa  
MDA: malondialdehido  
MS: metionina sintetasa  
mtADN: ADN mitocondrial  
MTHFR: metilen-tetrahidrofolato reductasa  
NADH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido  
NDS: Neuropathy Disability Score

NO: óxido nítrico  
NSS: Neuropathy Symptom Score  
NYHA: New York Heart Association  
O<sub>2</sub><sup>-</sup>: anión superóxido  
OR: odds ratio  
PAD: presión arterial diastólica  
PARP: polimerasa adenosintrifosfato ribosa  
PAS: presión arterial sistólica  
PCK: proteinkinasa  
PNP: polineuropatía periférica  
RAGE: receptor para productos de glicosilación avanzada  
ROS: especies reactivas de oxígeno  
ROT: reflejo osteotendinoso  
SAH: S-adenosilhomocisteína.  
SAM: S-adenosilmetionina  
SOD: superóxido dismutasa  
SW: Semmes-Weinstein  
TBA: ácido tiobarbitúrico  
TCA: ácido tricarbóxico  
TG: triglicéridos  
THF: tetrahidrofolato  
UCPs: uncoupling proteínas o proteínas desacopladoras  
UDP: uridine diphosphate

## LISTADO DE FIGURAS

**Figura 1:** Metabolismo de la homocisteína

**Figura 2:** Producción de superóxido en la cadena de transporte de electrones de la mitocondria inducida por la hiperglucemia

**Figura 3:** El daño del DNA inducido por ROS activa la enzima PARP y modifica GAPDH

**Figura 4:** Activación de las 4 mayores vías de daño tisular hiperglucémico por inhibición de la GAPDH

**Figura 5:** Prevalencia de diferentes factores de riesgo y comorbilidades en nuestra cohorte de 405 pacientes diabéticos

**Figura 6:** Tratamientos hipoglucemiantes habituales de los pacientes con diabetes tipo 2 estudiados, clasificados según la prueba de monofilamento SW

**Figura 7:** Gráfica comparativa de la duración de la diabetes de los pacientes con diabetes tipo 2 estudiados, clasificados según el grado de PNP

**Figura 8:** Diferencias en la presencia de dislipemia y pacientes en tratamiento hipolipemiente entre los 4 grupos de pacientes DM tipo 2 clasificados según NDS

**Figura 9:** Diferencias en la presencia de retinopatía y prueba de monofilamento alterada entre los pacientes DM tipo 2 clasificados según criterios NDS

**Figura 10:** Tratamientos hipoglucemiantes habituales de los pacientes con diabetes tipo 2 estudiados, clasificados según NDS

**Figura 11:** Diferencias de los niveles de homocisteína plasmática entre los pacientes diabéticos clasificados según la presencia de PNP por la prueba de monofilamento de SW

**Figura 12:** Diferencias de los niveles de homocisteína plasmática entre los pacientes diabéticos clasificados según criterios NDS

**Figura 13:** Diferencia en la ratio GSH/GSSG entre pacientes con DM tipo 2 con y sin PNP según criterios NDS



## LISTADO DE TABLAS

**Tabla 1:** Escala NSS

**Tabla 2:** Escala NDS

**Tabla 3:** Distribución por sexo y grupos de edad de la cohorte completa

**Tabla 4.-**Características generales, clínicas y antropométricas de la cohorte de diabéticos tipo 2 estudiada

**Tabla 5.-** Parámetros biológicos evaluados en la cohorte de diabéticos tipo 2 estudiada

**Tabla 6.-** Características generales y antropométricas de los pacientes con diabetes tipo 2 estudiados, clasificados según la prueba de monofilamento de SW

**Tabla 7.-** Presencia de factores de riesgo y comorbilidades asociadas en los pacientes con diabetes tipo 2 estudiados, clasificados según la prueba de monofilamento de SW

**Tabla 8.-** Tratamientos hipoglucemiantes habituales de los pacientes con diabetes tipo 2 estudiados, clasificados según la prueba de monofilamento de SW.

**Tabla 9:** Características biológicas de los pacientes con DM tipo 2 agrupados según presentasen o no la prueba monofilamento SW alterada

**Tabla 10.-** Características generales y antropométricas de los pacientes con diabetes tipo 2 estudiados, clasificados según el grado de PNP

**Tabla 11.-** Presencia de factores de riesgo y comorbilidades asociadas en los pacientes con diabetes tipo 2 estudiados, clasificados según el grado de PNP (criterios NDS)

**Tabla 12.-** Tratamientos hipoglucemiantes habituales de los pacientes con diabetes tipo 2 estudiados, clasificados según el grado de PNP (criterios NDS)

**Tabla 13.-** Parámetros bioquímicos en los pacientes con DM2 clasificados según el grado de PNP (según criterios NDS)

**Tabla 14.-** Niveles plasmáticos de homocisteína, ácido fólico y vitamina B12, y otros factores clásicos, de los pacientes con DM tipo 2 agrupados según presentasen o no la prueba de monofilamento SW alterada

**Tabla 15:** Regresión logística teniendo como variable dependiente la prueba de monofilamento alterada y como independientes la edad, los años de evolución de la

diabetes, la HbA1c, la homocisteína plasmática, el filtrado glomerular, el tabaquismo, la ingesta de alcohol y la presencia de vasculopatía.

**Tabla 16:** Niveles plasmáticos de homocisteína, ácido fólico y vitamina B12, y otros factores clásicos, de los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 agrupados según el grado de PNP

**Tabla 17.-** Características generales, clínicas y antropométricas del grupo completo de los 58 sujetos seleccionados

**Tabla 18.-** Parámetros biológicos destacados del subgrupo de 58 pacientes

**Tabla 19:** Características generales, clínicas y antropométricas de los casos y controles incluidos en el estudio de EO

**Tabla 20.-**Comparativa de marcadores biológicos y EO de los casos y controles

# I. INTRODUCCIÓN



## **1. La diabetes, un problema de salud pública**

La Diabetes mellitus (DM) constituye un grupo de enfermedades metabólicas, caracterizado por hiperglucemia secundaria a un déficit de secreción de insulina, a la resistencia a su acción o a ambos, con alteración de los hidratos de carbono, lípidos y proteínas.

En la actualidad, la DM es una enfermedad crónica que constituye un importante problema de salud de proporciones epidémicas, por su prevalencia y elevada morbimortalidad. La International Diabetes Federation (IDF) en su sexta edición del atlas de diabetes<sup>1</sup>, ha estimado el número de adultos con diabetes en 382 millones, la mayoría con edades comprendidas entre los 40 y 59 años, lo que representa más del 8 % de la población mundial adulta. Se calcula que esta cifra casi se duplicará, alcanzando los 592 millones de personas para 2035. Estos cálculos han superado en los 2 últimos años a los previamente publicados, debido a los nuevos datos disponibles de China, Oriente Medio y África, pero también al incremento de su prevalencia en países en vías de desarrollo, relacionado con los cambios en el estilo de vida y la mayor esperanza de vida. Tanto en términos humanos como financieros, la carga de la diabetes es enorme. Provoca 5,1 millones de muertes y ha representado unos 548.000 millones de dólares en gastos de salud (11% del gasto total en todo el mundo) en 2013.

Por otra parte, la IDF llama la atención sobre la diabetes no diagnosticada, que estima en 175 millones de personas, es decir, casi la mitad de los pacientes con diabetes, lo que limita el diagnóstico precoz de complicaciones crónicas como la enfermedad renal, la cardiopatía isquémica e insuficiencia cardíaca, retinopatía y neuropatía diabéticas.

En nuestro país, un reciente estudio estima la prevalencia de diabetes en mayores de 18 años en el 13,8%, de los cuales la mitad, en torno a un 6%, no tenían diagnóstico previo<sup>2</sup>. Datos similares aporta el estudio Valencia en nuestra comunidad con una prevalencia discretamente superior de 14,1% en población mayor de 18 años, alcanzando un 47,4% la diabetes no diagnosticada<sup>3</sup>.

En los países desarrollados las complicaciones crónicas de la diabetes, tanto micro como macrovasculares, son la principal causa de morbi-mortalidad en estos pacientes. La enfermedad cardiovascular, resultado de las lesiones de los grandes vasos sanguíneos, causa la muerte del 50% de las personas con diabetes. Las lesiones de los pequeños vasos sanguíneos (enfermedad microvascular) afecta a múltiples órganos con un gran impacto sobre la calidad de vida de los pacientes diabéticos y un elevado coste sanitario.

## **2. La neuropatía diabética, una complicación crónica clave en el curso de la diabetes**

### **2.1. Introducción**

La neuropatía diabética es probablemente la más frecuente y, al mismo tiempo, la más infradiagnosticada y menos entendida de las complicaciones crónicas de la diabetes, presente tanto en la DM tipo 1 como en el tipo 2<sup>4</sup>, con un efecto deletéreo tanto en la supervivencia como en la calidad de vida del diabético<sup>5,6</sup>.

Su forma más frecuente de presentación es la polineuropatía periférica (PNP) de tipo sensitivomotora distal simétrica. Su prevalencia oscila entre el 30-60%,

dependiendo de los procedimientos diagnósticos utilizados y de la población estudiada<sup>7</sup>, con un progresivo incremento en la historia natural de la diabetes<sup>8</sup>. Sin embargo, llega a ser casi tan elevada en pacientes sin diagnóstico previo de diabetes como en aquellos con diagnóstico establecido<sup>9,10</sup>, sugiriendo un mecanismo fisiopatológico ya presente en estos pacientes.

La PNP es una afectación bilateral, simétrica y difusa que afecta a miembros inferiores, con un comienzo insidioso. Históricamente, el diagnóstico se basaba en la interpretación subjetiva de una constelación de síntomas y signos, tales como la pérdida de sensibilidad vibratoria o táctil, o la reducción o ausencia del reflejo aquileo<sup>11</sup>. Sin embargo, hasta casi la mitad de los pacientes pueden estar asintomáticos y en riesgo de sufrir lesiones o traumas en sus pies que deriven en consecuencias tan graves como la amputación<sup>4</sup>.

Esta amplia variabilidad clínica dificulta su diagnóstico, por ello, varios grupos de trabajo han intentado desde 1988 establecer unos criterios diagnósticos basados en datos clínicos y exploración física<sup>12</sup>, ya que estudios electrofisiológicos son de difícil uso en la práctica clínica.

De entre ellos, el más utilizado actualmente por su sencillez, reproductibilidad y aplicabilidad en la práctica clínica, desarrollado en el Reino Unido<sup>13,14</sup>, se basa en 2 escalas: la Neuropathy Symptom Score (NSS) evalúa la presencia de síntomas referidos por el paciente mediante una encuesta de 5 ítems y la Neuropathy Disability Score (NDS) basada en la exploración física, nos permite cuantificar la severidad de la misma y detectar la presencia de neuropatía periférica en aquellos diabéticos asintomáticos.

Por otra parte, la prueba del monofilamento de SemmesWeinstein (SW) es un test de fácil aplicación en la práctica clínica que permite conocer si el paciente tiene

afectada la propiocepción, y es capaz de identificar a pacientes con PNP<sup>15</sup> y en alto riesgo de ulceración y futura amputación<sup>16</sup>.

## **2.2. El papel de la PNP en el desarrollo del pie diabético**

La PNP es, por tanto, una de las complicaciones crónicas de la diabetes que genera una elevada morbilidad por ser el principal factor de riesgo en el desarrollo de complicaciones en el pie<sup>7,17</sup>.

El denominado pie diabético, resultado de la presencia de PNP, de enfermedad arterial periférica (EAP) o de ambas, engloba múltiples manifestaciones clínicas como el dolor neuropático, hasta el 75% de los pacientes con PNP desarrollará un cuadro de dolor de difícil control<sup>17</sup>, deformidades como la artropatía de Charcot, y la ulceración que precede en el 80% de los pacientes a la gangrena y amputación<sup>18</sup> con una gran repercusión sobre la calidad de vida y coste sanitario<sup>19</sup>.

Se calcula que el 25% de los pacientes diabéticos desarrollarán a lo largo de su evolución lesiones en sus pies, con una incidencia anual de ulceración de 2 casos por cada 100 diabéticos y entre 1 a 20 por cada mil sufrirá amputación<sup>20</sup>. Además, para los pacientes diabéticos el riesgo de amputación es hasta 20 veces superior a los no diabéticos, con una mortalidad perioperatoria del 6% y postoperatoria de hasta un 50% a los 3 años<sup>21</sup>. El coste sanitario ligado al tratamiento de la úlcera del pie diabético supone por sí solo el 33% del gasto sanitario global del paciente diabético; comparado con pacientes diabéticos sin úlcera, el coste se incrementa en 5,4 veces durante el 1º año tras la presencia de ulceración<sup>22</sup>.

Aunque se considera a la vasculopatía periférica el principal factor pronóstico, sin embargo, la neuropatía periférica es el factor más importante en el desarrollo de la úlcera del pie diabético, ya que en su ausencia, la ulceración raramente se produce, lo que hace de su estudio un objetivo crucial<sup>23</sup>.

Los programas de prevención precoz, correctamente estandarizados y aplicados, han demostrado su efectividad en la profilaxis de estas complicaciones, en la mejoría de calidad de vida y en la reducción de la tasa de mortalidad<sup>24</sup>. Programas que, como valor añadido, han demostrado su eficiencia en el ahorro de los costes que se derivan de las complicaciones fatales. Sin embargo, los mecanismos fisiopatológicos subyacentes en el desarrollo de la PNP son multifactoriales y no bien conocidos<sup>7</sup>, por lo que su estudio podría aportarnos futuras armas de detección precoz y terapéuticas.

### **3. ¿Qué conocemos de la fisiopatología de la polineuropatía diabética?**

#### **3.1. Los factores clásicos**

El riesgo de desarrollar PNP está asociado al control metabólico, edad, duración de la DM, coexistencia de otras complicaciones microvasculares, como la retinopatía y la nefropatía<sup>7</sup>, y otros factores vasculares como la hipertensión y la dislipemia<sup>10,25</sup>; son los llamados factores clásicos.

El tratamiento intensivo de la DM, tanto tipo 1 como 2, ha demostrado prevenir y retrasar la progresión de la PNP<sup>26,27</sup>, aunque los datos sugieren un menor beneficio para los DM tipo 2 y una irreversibilidad para la neuropatía establecida a pesar de una mejoría del control metabólico y de factores de riesgo vascular<sup>28</sup>.

En la actualidad, se considera que los factores clásicos son insuficientes para explicar la patogenia del daño tisular que conduce a la neuropatía y a otras complicaciones microvasculares. Los mecanismos fisiopatológicos que subyacen en el desarrollo de la PNP son heterogéneos, multifactoriales y no bien comprendidos, y ninguna teoría es hoy aceptada como mecanismo único<sup>7</sup>.

Por otra parte, una vez los pacientes presentan dolor neuropático, solo disponemos de tratamiento sintomático basado en el uso de antiepilépticos como la gabapentina o la pregabalina, y agentes antidepresivos, sin conocerse un tratamiento con una base fisiopatológica que evite o frene la progresión de la PNP. Por ello, el estudio de nuevos factores biológicos asociados con PNP podría incrementar el conocimiento de la patogenia de esta complicación, siendo varias las líneas de investigación abiertas tanto para identificar a los sujetos con predisposición a la PNP como para encontrar nuevas dianas terapéuticas<sup>29</sup>.

### **3.2. Hiperhomocistinemia, marcador o promotor de daño tisular.**

La homocisteína es un aminoácido azufrado importante en la transferencia de grupos metilos a nivel celular y cuyo metabolismo se encuentra en la intersección de 2 vías<sup>30</sup> (figura. 1): la remetilación a metionina que requiere ácido fólico y vitamina B12 (o betaína en una ruta alternativa) y la transsulfuración a cistatión que requiere vitamina B6, coordinadas por la S-adenosilmetionina que actúa como inhibidor alostérico de la metilentetrahidrofolatoredutasa (MTHFR) y como activador de la cistation beta-sintetasa (CBS). Formas severas de hiperhomocistinemia son debidas a raros defectos genéticos que resultan en déficits de las enzimas involucradas en su metabolismo, en cambio existen múltiples factores asociados a las formas leves como edad avanzada,

déficits vitamínicos, enfermedades renal o hepática, o tóxicos como cafeína o tabaco ente otros.

La hiperhomocistinemia se considera un factor de riesgo para la enfermedad cardiovascular<sup>31,32</sup> y la EAP<sup>33,34</sup>, en relación a lesión del endotelio vascular mediado por un incremento del estrés oxidativo (EO) celular a través de su oxidación y concomitante producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), pero también por la activación de mediadores inflamatorios de la pared vascular. Otros mecanismos descritos de daño vascular incluyen: deterioro en la producción de óxido nítrico (NO) y factores vasodilatadores, interferencia en mecanismos de transcripción celular y oxidación de lipoproteínas.

Ambrosch et al.<sup>35</sup> fueron los primeros que demostraron una asociación independiente de las concentraciones elevadas de homocisteína con la presencia de neuropatía en diabéticos tipo 2, y aunque estudios más recientes confirman esta asociación<sup>10</sup>, no todos los autores han obtenido resultados similares<sup>36,37</sup>. En cambio, sí se han relacionado de forma sistemática niveles plasmáticos elevados de homocisteína con otras complicaciones crónicas microvasculares como la nefropatía y la retinopatía, e incluso con la macroangiopatía diabética, especialmente en la DM tipo 1<sup>38,39</sup>.

Recientemente nuestro grupo de investigación ha demostrado una asociación independiente de la homocisteína con la presencia de úlcera en el pie diabético<sup>40</sup> y con el tipo y grado de PNP<sup>41</sup>; aún más, por cada incremento de 1  $\mu\text{mol}$  en plasma de homocisteína hubo un aumento del 23% del riesgo de polineuropatía en diabéticos tipo 2<sup>42</sup>. Además, el grado de neuropatía evaluada por la escala NDS se relacionó con los niveles de homocisteína, los valores de hemoglobina glicosilada (HbA1c), edad y duración de la diabetes.

¿Cómo explicar la relación de la elevación de homocisteína y la PNP?. En estudios experimentales, es bien conocido que la homocisteína promueve el EO a nivel del endotelio vascular activando una serie de reacciones químicas, que llevan a la inflamación de la pared arterial y la progresión de la placa aterosclerótica<sup>43</sup>. Estas alteraciones a nivel de los pequeños vasos favorecerían la isquemia, con una importante repercusión neural cuando afecte a los vasa vasorum del nervio. Además, la hiperhomocistinemia se asocia en estudio experimentales y clínicos con lesión neurológica directa afectando a la función nerviosa por efecto directo citotóxico o por daño oxidativo de la célula endotelial de los pequeños vasos<sup>44,45</sup>.

Distintas opciones terapéuticas han surgido de esta relación entre la homocisteína y el desarrollo de complicaciones macro y microvasculares, entre ellas la suplementación con vitamina B12 y ácido fólico; aunque existe una recomendación firme para dicha suplementación en enfermedad cardiovascular<sup>32</sup>, ante los resultados contradictorios en relación a un beneficio clínico algunos autores han puesto en duda si la homocisteína podría tratarse de un marcador más que de un promotor de lesión celular<sup>46</sup>, siendo necesarios más estudios que evalúen tanto las dosis utilizadas como la respuesta a largo plazo<sup>47</sup>.

### **3.3. El estrés oxidativo.**

#### ***3.3.1. Papel del EO como desencadenante de las complicaciones microvasculares.***

La hiperglucemia mantenida es el factor clave que pone en marcha el daño tisular, sin embargo, determinados tipos celulares (endotelio capilar en la retina, célula mesangial en el glomérulo renal, neuronas y células de Schwann en el nervio periférico)

son más vulnerables a su efecto. Esto hace que el estudio de dichas células pueda aclarar la fisiopatología de las complicaciones microvasculares.

Desde los años 60, diversas alteraciones del metabolismo celular se han asociado a la presencia de complicaciones microvasculares, incluyendo la neuropatía, como diferentes piezas de un puzzle<sup>48</sup>. La vía de los polioles centrada en la enzima aldosa reductasa que por consumo de co-factor nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADH) incrementa la susceptibilidad intracelular al EO al reducirse la cantidad de glutatión reducido (GSH), fue la primera en asociarse con daño neuronal<sup>49</sup>.

La formación excesiva y depósito de productos de glicosilación avanzada (AGE), otra de las piezas del puzzle, se ha asociado de forma independiente con la presencia de PNP en DM tipo 2<sup>50</sup>. Los AGEs alteran la función neuronal a través de diversos mecanismos: la mielina modificada por AGE del nervio periférico es susceptible de fagocitosis por macrófagos contribuyendo a su desmielinización segmentaria; la glicosilación de proteínas del citoesqueleto axonal conduce a su atrofia y de la matriz extracelular a reducir su actividad regenerativa. Además, la interacción de proteínas glicosiladas circulantes con su receptor para AGEs (RAGE) activado induce EO y sobreexpresión de genes proinflamatorios que provocaría una grave disfunción neuronal<sup>51</sup>.

Otras piezas del puzzle son la producción excesiva de isoformas de la proteínquinasa C y la sobre-activación de la vía de las hexosaminas, relacionadas con alteraciones en la regulación de la transcripción génica, cambios en la matriz extracelular y liberación de citoquinas y mediadores inflamatorios y de crecimiento que provocarán daño vascular.

Pues bien, se propone como proceso unificador para encajar las diferentes piezas de este puzzle una superproducción de anión superóxido ( $O_2^-$ ) por la cadena de transporte de electrones en la membrana mitocondrial (figura 2) en presencia de hiperglucemia, es decir, un incremento del EO mediado por la producción excesiva de ROS<sup>48</sup>.

¿Qué ocurre a nivel de la mitocondria? Cuando la glucosa es metabolizada a través del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), genera donantes de electrones para la cadena de transporte en la membrana mitocondrial. La principal es la NADH, que da electrones al complejo I, el otro es la flavín adenín dinucleótido reducido ( $FADH_2$ ), formado por la enzima succinato deshidrogenasa, que da electrones al complejo II. Los electrones de dichos complejos son transferidos por la coenzima Q al complejo III, el citocromo C, complejo IV y finalmente a oxígeno molecular, el cual es reducido a agua. En presencia de niveles elevados de glucosa hay un aporte excesivo de donantes de electrones hasta un punto crítico donde se satura la transferencia de electrones al complejo III, y la coenzima Q cede el exceso de electrones a una molécula de oxígeno generando superóxido (figura 3). La isoforma mitocondrial de la superóxido dismutasa (SOD) degradará esta molécula en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y esta a su vez en agua y oxígeno por otras enzimas.

Diversos estudios experimentales han puesto de manifiesto que en el contexto de una hiperglucemia mantenida existe un aumento del voltaje transmembrana mitocondrial<sup>52</sup> y sobreproducción de ROS en la mitocondria, tales como superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo<sup>53</sup>. Al contrario, si se produce una sobreexpresión de SOD o de uncoupling proteínas UPDs (que colapsan el voltaje transmembrana mediante producción de calor) no se produce elevación de ROS tras exposición a hiperglucemia y tampoco activación de las otras 4 piezas del puzzle<sup>54,55</sup>.

El paso intermedio entre la producción de ROS y las otras vías de daño tisular podría ser el bloqueo por parte de los primeros de la actividad de la enzima gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) a través de la activación de la poli ADP ribosa polimerasa (PARP)<sup>56</sup>, producida a su vez por la rotura de ADN nuclear por los ROS (figura 3)<sup>48</sup>. La reducción de la actividad de GAPDH produciría el acúmulo de diversos sustratos claves para la activación del resto de las vías componentes del puzzle (figura 4).

Aunque la hiperglucemia se postula como la causa de producción de ROS y el consiguiente incremento de EO a nivel microvascular, también la elevación de ácidos grasos libres en contexto de una resistencia a la insulina provocaría a nivel macrovascular consecuencias similares, ya que su oxidación a nivel mitocondrial genera similares donantes de electrones que el ciclo de la TCA para la oxidación de la glucosa.

Por tanto, la diabetes y sus complicaciones se asocian a un incremento del EO definido como un desbalance en la producción de radicales libres y/o deterioro de la capacidad defensiva antioxidante, indicando una contribución centrada en los ROS en el establecimiento, progresión y consecuencias patológicas de la diabetes. Sin embargo, hoy se considera al EO, en una visión más amplia, como una disrupción en la señalización redox y su control<sup>57</sup>. Es más, existen suficientes evidencias que han mostrado una implicación directa de la mitocondria en la patogénesis de las complicaciones de la diabetes, sugiriendo la posibilidad de una disregulación de la función mitocondrial a nivel transcripcional en respuesta a la hiperglucemia, provocando mutaciones del ADN mitocondrial (mtADN) y disminución del número de copias, que a su vez influirían en la codificación nuclear<sup>58</sup>.

Se ha planteado un paso más, definiendo una potencial “memoria metabólica” mediada por el exceso de ROS y especies de nitrógeno, en particular originadas a nivel de proteínas mitocondriales glicosiladas, quizás actuando unas y otras para mantener la señalización en la generación de estrés<sup>59</sup>. Clínicamente, la presencia de la memoria metabólica sugiere la necesidad de un precoz y agresivo tratamiento con agentes que reduzcan la producción de ROS y la glicosilación además de mantener un óptimo control metabólico en pacientes diabéticos para minimizar sus complicaciones<sup>60</sup>.

### ***3.3.2. Papel del EO en la disfunción neural***

El EO que hemos definido como el desequilibrio bioquímico debido a la producción excesiva de ROS y radicales libres, genera daño oxidativo en las biomoléculas y se ha asociado con la disfunción neural y microvascular del paciente diabético<sup>61</sup>, mientras la contribución de otros factores tales como la hipoxia endoneural, el desbalance en la transición de metales o la hiperlipidemia no están claramente demostrados<sup>62</sup>. En la actualidad, el análisis del estado oxidativo se basa en la detección del daño oxidativo causado en lípidos, proteínas y ADN, que puede ser cuantificado a través de varios biomarcadores específicos, mediante la medición de niveles de moléculas antioxidantes que ayudan a nuestro organismo a combatir el daño oxidativo o la medición directa de especies reactivas en cultivos celulares<sup>63</sup>.

Así crecientes evidencias tanto experimentales como clínicas sugieren que el EO, con la mitocondria como diana específica, juega un papel decisivo en la patogénesis de la PNP. Estudios experimentales han puesto de manifiesto que en el contexto de una hiperglucemia mantenida existe un incremento de productos de estrés oxidativo en los nervios periféricos y su glía, raíces dorsales y en las células

endoteliales, encontrando el marcador más sensible el GSH junto a productos de hiperoxidación lipídica como la malondialdehído (MDA), resultando en mielopatía de raíces dorsales, vacuolización mitocondrial y apoptosis neuronal, implicados en los déficits de conducción, deterioro neurotrófico y anomalías características de la PNP diabética<sup>64,65</sup>. Hallazgos similares se han encontrado en cultivos de células neuronales de ganglios de raíces dorsales expuestos a un medio hiperglucémico, sugiriendo que picos hiperglucémicos serían suficientes para generar EO y daño neuronal<sup>66</sup>.

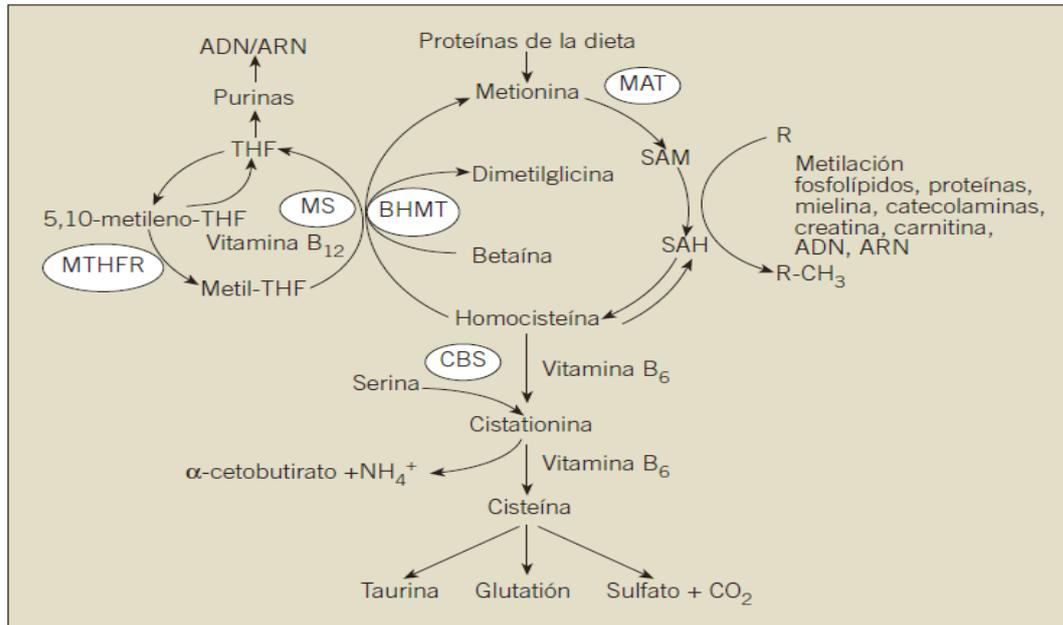
A nivel clínico, recientes estudios también han encontrado un aumento de diversos marcadores de EO en relación a la presencia de PNP. El peroxinitrato, formado por la reacción entre NO y O<sub>2</sub><sup>-</sup>, y lipoproteínas oxidadas se han encontrado elevados en pacientes diabéticos, con una diferencia significativa en aquellos que presentaban PNP<sup>67</sup>. Junto a esta superproducción de ROS parece existir un mecanismo antioxidante celular insuficiente. Se ha detectado una disminución de la actividad de varias enzimas antioxidantes, tales como la SOD, catalasa y glutatión peroxidasa (GPX) en pacientes diabéticos con PNP, aunque no hubo un descenso significativo de la actividad antioxidativa global del plasma sanguíneo en pacientes diabéticos con neuropatía, con una diferencia significativa frente a sujetos sanos, pero no frente a diabéticos sin PNP. Esta disminución de actividad de enzimas antioxidantes se correspondía con un incremento de ADN oxidado en linfocitos de DM con PNP<sup>68</sup>.

Resultados similares se han obtenido en la medición de otros marcadores del estado redox, como los planteados en nuestro estudio, encontrándose una disminución significativa de GSH eritrocitario de pacientes diabéticos frente a controles, pero no entre pacientes con o sin PNP, aunque sí las hubo en otros parámetros como la MDA como indicador de oxidación lipídica, la homocisteína plasmática y la actividad oxidativa global<sup>69</sup>, resultado que difiere de otros estudios<sup>68</sup>.

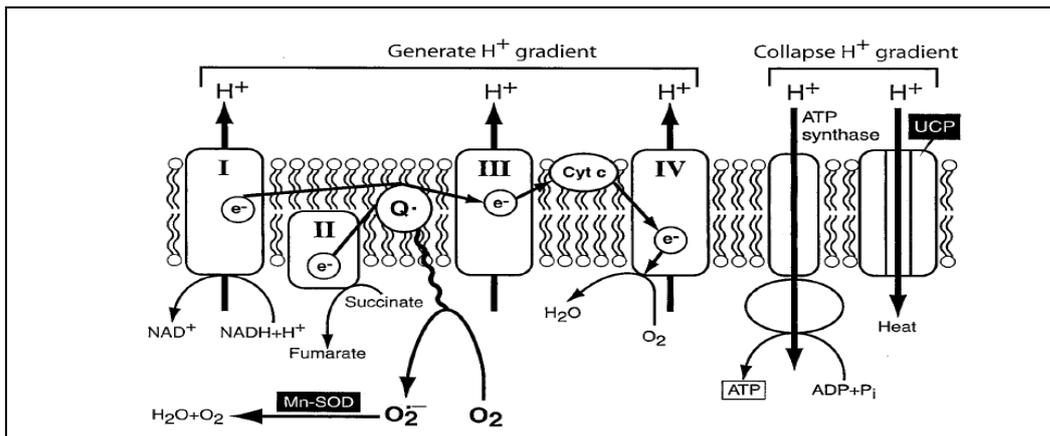
Considerando al EO como diana terapéutica se han valorado algunos tratamientos basados en su efecto antioxidante, como el ácido alfa-lipoico, que es capaz de revertir in vitro el EO y la apoptosis neuronal<sup>66</sup> aunque su aplicación clínica ha obtenido resultados dispares y es incierta su efectividad a largo plazo o administrado de forma oral<sup>70,71</sup>.

En conclusión, el EO, como factor importante en la patogénesis de PNP, podría convertirse en un interesante objetivo para la prevención y la terapia de esta complicación.

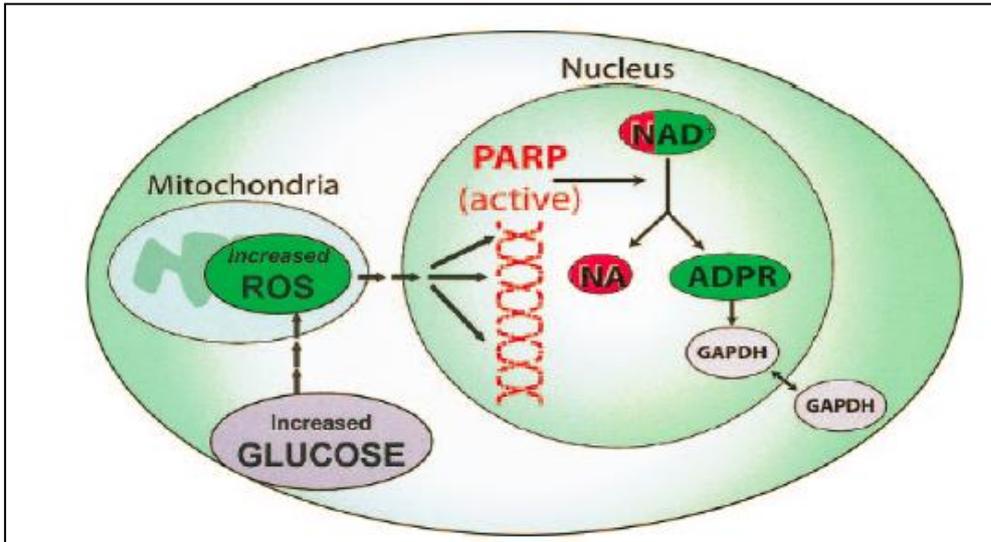
4. Figuras



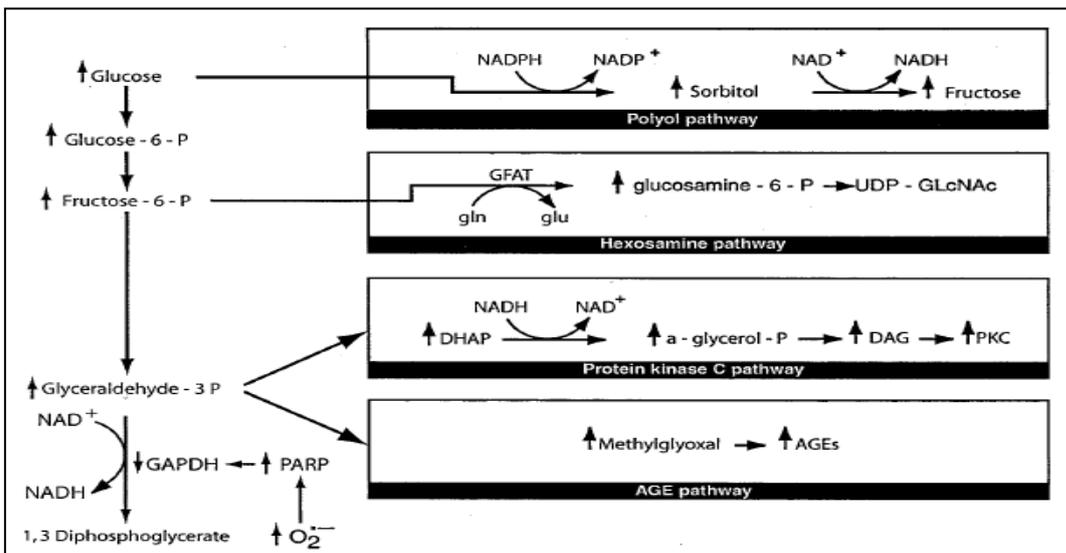
**Figura 1: Metabolismo de la homocisteína.** Tomada de de Luis D, Fernández N, Aller R. Homocysteine in patients with diabetes mellitus. *Med Clin (Barc)*. 2004 Jan 17;122(1):27-32).



**Figura 2: Producción de superóxido en la cadena de transporte de electrones de la mitocondria inducida por la hiperglucemia.** Tomada de Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005; 54 (6): 1615-25.



**Figura 3: El daño del DNA inducido por ROS activa la enzima PARP y modifica GAPDH.** Tomada de Brownlee M. *The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism.* *Diabetes.* 2005; 54 (6): 1615-25.



**Figura 4: Activación de las 4 mayores vías de daño tisular hiperglucémico por inhibición de la GAPDH.** Brownlee M. *The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism.* *Diabetes.* 2005; 54 (6): 1615-25.

## **II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



Diversos estudios realizados en pacientes diabéticos han encontrado un incremento de EO al compararlos con controles, con una diferencia significativa de determinados marcadores de EO entre pacientes diabéticos con y sin complicaciones micro y macrovasculares. Sin embargo, considerando la información disponible en la actualidad, no ha podido demostrarse de forma concluyente la asociación con la PNP, así como tampoco se ha demostrado una relación entre la presencia de EO y el grado de neuropatía.

**Nuestra hipótesis de trabajo es:**

En la diabetes tipo 2 la presencia y grado de polineuropatía (PNP) debe estar asociada a un mayor grado de estrés oxidativo (EO) y una elevación de los niveles plasmáticos de homocisteína

Para ello, nos hemos planteado los siguientes objetivos:

**Objetivo nº 1:** Estudiar la relación de factores clásicos como la edad, duración de la diabetes, control metabólico y patrón lipídico con la presencia y gravedad de PNP en diabéticos tipo 2.

**Objetivo nº 2:** Determinar la asociación entre la presencia y gravedad de PNP diabética con los niveles de homocisteína plasmática.

**Objetivo nº 3:** Analizar si los marcadores de EO (GSH, GSSG, el cociente GSH/GSSG y los niveles de MDA) se asocian con la presencia y grado de PNP en una amplia cohorte de diabéticos tipo 2.



## **III. SUJETOS Y MÉTODOS**



## 1. Sujetos

Nuestra población diana fueron los pacientes con DM tipo 2.

Una cohorte de 405 pacientes con DM tipo 2 fueron seleccionados aleatoriamente de entre los pacientes atendidos en la Unidad de Diabetes del Hospital Clínico Universitario y 2 centros de Atención Primaria de nuestro Departamento de Salud, todos ellos pertenecientes a una población del área metropolitana de Valencia. El rango de edad de la población estudiada fue de 37 a 89 años. En esta cohorte se estudiaron los parámetros para evaluar los objetivos 1 y 2.

De la cohorte de 405 y utilizando un muestreo aleatorio ajustado por edad, género, tiempo de evolución de la diabetes e índice tobillo-brazo (ITB) se seleccionaron 58 pacientes con presencia de PNP grave o sin ella (casos/control anidados, ver diseño). En este estudio anidado se midieron los parámetros de EO para cumplir con el objetivo 3. El coste y procedimiento usados para medir los marcadores de EO por cromatografía de alta densidad (HLPC) (ver más adelante) no permitieron usar las muestras de toda la cohorte.

### 1.1. Criterios de inclusión

Los pacientes que se incluyeron en el estudio cumplían los siguientes criterios:

- ✓ Edad  $\geq$  35 años.
- ✓ DM tipo 2 según los criterios diagnósticos establecidos por la ADA (American Diabetes Association)<sup>72</sup>.

### 1.2. Criterios de exclusión

Quedaron excluidos todos los pacientes que presentaron algunos de los siguientes diagnósticos y/o patologías asociadas:

- ✓ DM tipo 1
- ✓ Insuficiencia cardiaca clase III y IV según NYHA
- ✓ Enfermedad renal definida por un aclaramiento de creatinina menor de 30.
- ✓ Cirrosis hepática
- ✓ Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
- ✓ Hipotiroidismo no corregido
- ✓ Enfermedad neoplásica
- ✓ Deficiencia de vitamina B12 o ácido fólico, o toma de suplementos vitamínicos
- ✓ Cualquier otro proceso, condición o toma de medicación que cause “per se” neuropatía.
- ✓ Pacientes con artropatía de Charcot y/o amputación bilateral.

Todos los pacientes mantuvieron su tratamiento habitual para la diabetes y factores de riesgo asociados durante el estudio.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de nuestro centro y todos los pacientes que cumplieron los criterios de inclusión y ninguno de exclusión se les explicó la finalidad del estudio y firmaron el consentimiento informado para participar en el mismo.

## **2. Métodos**

Se ha diseñado un estudio casos-controles, considerando casos a los diabéticos con PNP sensitivo-motora y controles a los diabéticos sin PNP. Por las limitaciones de presupuesto y procedimiento de medición de los marcadores de EO, hemos diseñado un estudio casos controles anidados como se comentó en el apartado de la selección de los sujetos para así cumplir con el objetivo 3 del estudio.

En todos los sujetos se ha aplicado el siguiente protocolo de estudio, recogiendo:

1°. Parámetros clínicos generales

2°. Parámetros clínicos específicos en relación a la detección y grado de PNP

3°. Pruebas de laboratorio, que incluyeron:

- Parámetros bioquímicos.
- Marcadores de EO, en un subgrupo de la corte completa

### **2.1. Parámetros clínicos generales**

En una primera fase se realizó una anamnesis detallada, con especial énfasis en la recogida de datos demográficos y clínicos de cada paciente mediante un cuestionario estandarizado, que incluyó:

- Edad y sexo
- Nivel de estudios: bajo, medio y alto
- Hábitos relacionados con riesgo cardiovascular, como tabaquismo (activo), consumo de alcohol y la práctica de ejercicio físico habitual.

- Tiempo de evolución de la diabetes, en años.
- Presencia de patologías asociadas documentada en historia clínica: hipertensión, dislipemia, y tratamiento en su caso, y antecedente de infarto agudo de miocardio y/o ictus isquémico.
- Presencia de retinopatía documentada en historia clínica, si no estaba reflejada se remitía al paciente al servicio de oftalmología del Hospital Clínico.
- Tratamiento habitual, clasificados como dieta, antidiabéticos orales, insulina o ambos.

Tras ello se realizó una exploración física para la obtención de los siguientes parámetros antropométricos y clínicos:

- Peso en kilogramos (kg) mediante una báscula romana, la talla en metros (m) y el índice de masa corporal (IMC) en  $\text{kg/m}^2$ .
- Perímetro de cintura abdominal: se midió en el punto medio entre la espina ilíaca anterosuperior y el margen costal inferior con una cinta métrica graduada en centímetros (cm) estando el sujeto en bipedestación y los brazos en posición anatómica.
- Determinación de la presión arterial tras 10 minutos de reposo en posición sentado, utilizando el valor medio de 3 mediciones separadas 5 minutos realizadas con un esfigmomanómetro de mercurio.
- Detección de la presencia de EAP sintomática mediante el Cuestionario de Edimburgo modificado para claudicación intermitente vascular y la realización del ITB: ratio entre presión arterial sistólica en tobillo y arteria braquial medidas con esfigmógrafo de mercurio y un eco-doppler (Bi-directional Smartdrop™ 20) tras 5-10 minutos de reposo. La EAP fue definida por un ITB < 0.9 en cada pierna, considerando

severa si  $< 0.5$ . Una ratio superior a 1,2 se deben posiblemente a rigidez arterial y fueron excluidos del análisis estadístico.

Todas las medidas fueron realizadas por 2 investigadores (G.R. y M.M.) con adiestramiento similar y mismos instrumentos.

## 2.2. Parámetros clínicos específicos

A continuación y durante la misma visita se estableció la presencia y grado de PNP por el Neuropathy Symptom Score (NSS), el Neuropathy Disability Score (NDS)<sup>13,14</sup> y la prueba del monofilamento de SW<sup>15</sup>.

La escala NSS (tabla 1) recoge la presencia de síntomas como cansancio, calambres, dolor, quemazón y parestesias mediante un cuestionario, que incluye 5 ítems a cuyas posibles respuestas se les asigna una determinada puntuación, siendo su valor máximo 9 puntos.

Tabla 1: Escala NSS

1º ¿Presenta algunos de estos síntomas?: Quemazón, entumecimiento u hormigueo (2) Fatiga, calambre o dolorimiento (1) Ninguno (0)
2º ¿Los síntomas se presentan o aumentan por la noche (2), día y noche (1), o sólo durante el día (0)?
3º ¿Se localizan en los pies (2), pies y pantorrillas (1), otras localizaciones (0)?
4º ¿Calman con el movimiento (2), de pie (1), u otros (0)?
5º ¿Despiertan durante el descanso nocturno? : SI (1) NO (0)

En segundo lugar, con el objetivo de cuantificar la severidad de la PNP se usó la escala NDS. Para ello, con el paciente en decúbito supino se realizó exploración neurológica que incluyó la valoración de los siguientes ítems:

**Sensibilidad vibratoria:** se utilizó un diapasón 128 ciclos/segundo, que se aplicó sobre la articulación interfalángica del 1° dedo de cada pie, evitando callosidades y asegurándose que el paciente diferencia entre presión y vibración. Se consideró patológico si el paciente dejaba de notar vibración por debajo de 6.

**Sensibilidad algésica:** se usó el pinprick o palillo de punta roma o puntiaguda, presionando de forma alterna en la raíz de la uña del dedo gordo. Se consideró patológico si el paciente era incapaz de diferenciar entre ambos tipos de presión.

**Sensibilidad térmica:** se utilizó una barra térmica (barra metálica adherida a un material PVC) que se aplicó sobre las zonas laterales del pie. Se consideró patológico si el paciente es incapaz de discriminar si el objeto aplicado está más frío o caliente.

**Reflejo osteotendinoso (ROT) aquileo:** se percutió con un martillo de reflejos sobre el tendón de Aquiles, estando el paciente relajado en decúbito supino, sentado o arrodillado en la camilla, debiendo apreciarse una contracción del tríceps crural y la flexión plantar del pie. Si el reflejo estaba ausente, se repetía con maniobra de refuerzo.

A continuación se aplicó la escala NDS según la tabla siguiente, con una puntuación máxima de 10 puntos.

Tabla 2: Escala NDS

Sensibilidad	Derecha			Izquierda		
	Normal	Anormal		Normal	Anormal	
<b>Dolorosa</b>	0	1		0	1	
<b>Vibratoria</b>	0	1		0	1	
<b>Térmica</b>	0	1		0	1	
<b>Reflejos aquileos</b>	Presentes	Con maniobra de esfuerzo	Ausentes	Presentes	Con maniobra de esfuerzo	Ausentes
	0	1	2	0	1	2

Se consideró anormal y por tanto diagnóstica de PNP una puntuación NSS o NDS  $\geq 3$ . Además, los sujetos fueron clasificados en 4 grupos de acuerdo al grado de PNP (NDS score): grupo 1 con score  $\leq 2$  (ausencia de PNP), grupo 2 con score 3-5 (PNP leve), grupo 3 con score 6-7 (PNP moderada) y grupo 4 con score  $\geq 8$  (PNP grave).

Se consideró de igual modo la presencia de neuropatía a la pérdida de sensibilidad a la presión determinada mediante el test del monofilamento de 5.07 mm de SW que ejerce una fuerza constante al presionarlo sobre la piel de 10 g. Con el paciente en decúbito, se presionó con el filamento durante 1-1.5 segundos y se preguntó al paciente si sentía o no su contacto. Se evaluaron 3 puntos en cada pie: cara dorsal del primer dedo, y base de cabeza de primer y quinto metatarsiano, evitando áreas de hiperqueratosis. Se asignó una puntuación de 1 si el paciente percibía la presión aplicada en al menos 2 de 3 intentos en cada punto y cero si no había percepción. Si tenemos en cuenta que la exploración se realizó en 3 puntos en cada pie, la puntuación máxima para un paciente fue de 6, ajustándose el resultado si el paciente tenía una amputación de la zona a explorar. Agrupamos los resultados en 2 categorías, la primera con valor de 0 para una puntuación de 0 a 4, que sería patológica, y la segunda con valor 1, cuando la suma de todos los puntos fue de 5 y 6, que consideramos normal.

Todos los procedimientos fueron realizados por 2 investigadores (G.R. y M.M.) con adiestramiento similar y mismos instrumentos.

### 2.3. Parámetros bioquímicos

Los estudios bioquímicos se realizaron tras 10 horas de ayuno nocturno, a todos los pacientes incluidos en el estudio, en la Unidad de Pruebas Funcionales y Laboratorio Central de nuestro centro, incluyendo las siguientes determinaciones:

Hemograma (recuento y fórmula leucocitaria) y estándar de coagulación

Bioquímica sanguínea, que además de la determinación de glucosa, enzimas hepáticas, creatinina, ácido úrico y albúmina por métodos de laboratorio estandarizados, incluyó:

- HbA1c mediante HPLC, método estandarizado y certificado según National Glycohemoglobin Standardization Program<sup>73</sup>(NGSP).
- Perfil lipídico que incluyó colesterol total (CT) y triglicéridos (TG), medidos por un método enzimático colorimétrico, basado en reacción química con producto final de pigmento rojo medible con espectrofotómetro<sup>74,75</sup>. Colesterol HDL (cHDL) medido por precipitación con polianiones con ácido fosfotúngstico-cloruro de magnesio y posterior método colorimétrico<sup>76</sup>. Colesterol LDL (cLDL) según fórmula de Friedewald, y apo B y A mediante inmunturbimetría<sup>77</sup>
- Homocisteína plasmática, que se determinó con el Advia Centaur HCY2 assay®, un inmunoensayo competitivo basado en tecnología de quimioluminiscencia directa. El procedimiento se basa en 3 pasos<sup>78</sup>: la reducción de homocisteína disulfuro a homocisteína libre, su conversión enzimática a S-adenosil-homocisteína (SAH) y su cuantificación en un inmunoensayo competitivo (anticuerpo anti SAH marcada con partículas magnéticas) y cuantificación mediante quimioluminiscencia directa.
- Vitamina B12 y ácido fólico fueron medidos por método ELISA

El filtrado glomerular se calculó según la fórmula de Crockcroft-Gault, en ml/min.

En orina se determinaron creatinuria por fotolorimetría y albuminuria por inmunoturbimetría, para el cálculo del índice albúmina/creatinina.

El procesado de las muestras se realizó en el Laboratorio de Endocrinología del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Las muestras de sangre se depositaron en tubos con EDTA, y una vez en el laboratorio, se separó inmediatamente el plasma mediante centrifugación refrigerada a 2500-3000 rpm durante 10 minutos. Las muestras de plasma fueron procesadas inmediatamente o se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **2.4. Marcadores de estrés oxidativo**

Diversos indicadores de EO o estado redox medidos en fluidos biológicos han sido propuestos. En estudios previos de nuestro grupo de trabajo se han analizado la producción de radicales libres mediante la cuantificación de la actividad xantina oxidasa en plasma, de glutatión en sus formas reducida (GSH) y oxidada (GSSG) y su ratio GSH/GSSG, y de los niveles de MDA; y se ha valorado el estado antioxidante mediante la cuantificación de niveles de diversas enzimas antioxidantes como la SOD, catalasa y GPX<sup>79</sup>.

En nuestro trabajo se optó por la determinación de GSH, GSSG y su cociente, y de los niveles de MDA puesto que la determinación se realizó de muestras del banco de sueros de la cohorte.

Las determinaciones de GSH y GSSG se realizaron mediante HPLC y detección ultravioleta, previa adicción de N-ethylmaleimida para prevenir la oxidación de GSH en

plasma haciendo uso de patrones apropiados y siguiendo la metodología descrita previamente<sup>80</sup>.

Del mismo modo y según método validado<sup>81</sup> se determinó la MDA mediante HPLC previa hidrólisis de lipoperóxidos plasmáticos y reacción con ácido tiobarbitúrico (TBA) con MDA aislada, siendo el complejo MDA-TBA finalmente cuantificado mediante espectrofotometría.

Ambas determinaciones se realizaron en el Laboratorio del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

### **3. Métodos estadísticos**

Todos los análisis fueron realizados usando el SPSS 14 versión (SPSS Inc, Chicago, Illinois). Los resultados han sido expresados como media  $\pm$  DS. Se consideró estadísticamente significativa una probabilidad menor al 5%.

El tamaño muestral se ha calculado teniendo en cuenta un error alpha inferior al 5% y un error beta inferior al 20%, para un riesgo atribuible (odds ratio)  $> 2$ . Este tamaño es de un mínimo de 200 individuos por grupo (total un mínimo de 400 individuos con DM tipo 2).

Las variables cuantitativas han sido expresadas en media y desviación estándar y las cualitativas como porcentajes o número total.

Las medias de las variables cuantitativas se compararon entre grupos con la prueba t de Student para datos no apareados y por ANCOVA.

La comparación de las variables cualitativas (o porcentajes) entre grupos se realizó con el test de  $X^2$ .

La correlación de Pearson se usó para analizar el grado de asociación entre las variables bioquímicas y la PNP (definida por NDS). La significación estadística de las variables se calculó con el método de Wald.

Para evaluar factores de riesgo independiente, se realizaron análisis de regresión lineal, considerando variable dependiente a la presencia y grado de PNP (evaluada por NDS y por la prueba del monofilamento) y como variable independiente a todas aquellas que alcanzaron una significación estadística entre grupos en el estudio univariante.

El riesgo atribuible, fue calculado entre casos y controles, teniendo en cuenta la presencia o ausencia de variables de confusión mediante regresión logística. Se consideró variable dependiente a la presencia de PNP (evaluada por NDS y por la prueba del monofilamento) e independiente, las que previamente mostraron una asociación o diferencia estadísticamente significativa en el estudio univariante. Edad, duración de la diabetes, HbA1c, homocisteína, creatinina, microalbuminuria fueron las variables independientes.

Se consideraron como variables de confusión la edad, la vasculopatía (incluyendo periférica, cardíaca y cerebral), la ingesta de alcohol y tabaquismo.



## **IV. RESULTADOS**



## 1. Parte Primera:

### Asociación de factores clásicos y niveles de homocisteína plasmática con la presencia y grado de PNP (Objetivos 1 y 2)

#### 1.1. Características generales de la cohorte estudiada

La cohorte completa de diabéticos tipo 2 estuvo compuesta por un total de 405 pacientes, 236 de ellos varones y 169 mujeres con una edad media de  $64,67 \pm 10,04$  años y  $67,78 \pm 10,71$  respectivamente. La distribución por grupos de edad y sexos de nuestra cohorte de estudio (tabla 3) representa a los pacientes válidos para el seguimiento, una vez aplicados los criterios de inclusión y exclusión del estudio, y es similar a estudios poblacionales previos<sup>2,3</sup> en cuanto a un predominio de varones y una mayor prevalencia de diabetes en mujeres de mayor edad aunque nuestra cohorte difirió en un predominio del grupo de edad entre los 61-75 años frente al grupo < 60 años, posiblemente debido a que un porcentaje importante de la selección de pacientes se realizó en consulta hospitalaria.

Tabla 3: Distribución por sexo y grupos de edad de la cohorte completa.

	31-45 años	46-60 años	61-75 años	> 76 años
<b>Hombres (n/%)</b>	10 (4,2)	58 (24,6)	133 (56,4)	35 (14,8)
<b>Mujeres (n/%)</b>	6 (3,5)	36 (21,3)	84 (49,7)	43 (25,4)

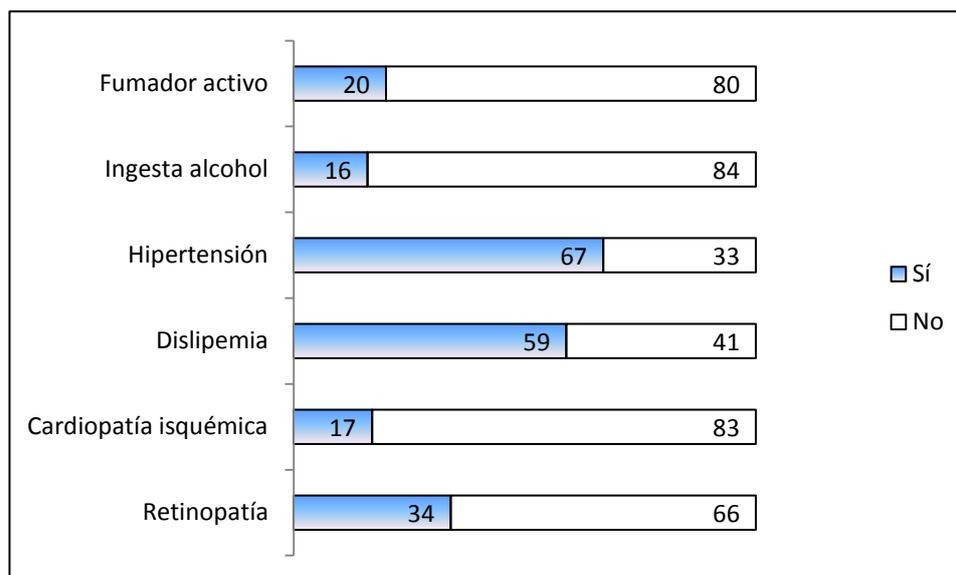
Las características generales, clínicas y antropométricas, obtenidas en la historia clínica y en la exploración física inicial se describen en la tabla 4. Como datos más relevantes destacar una duración media de la diabetes de  $12,67 \pm 9.67$  años, y un IMC en rango de obesidad grado 1. En la figura 5 se observa la prevalencia de distintos factores de riesgo y comorbilidades en nuestra cohorte, similar a las observadas en otras poblaciones de pacientes diabéticos.

Tabla 4.-Características generales, clínicas y antropométricas de la cohorte de diabéticos tipo 2 estudiada

	<b>Población diabética estudiada n=405</b>
<b>Edad (años)</b>	65,97 ± 10,43
<b>Sexo, n (%)</b>	
Hombre	236 (58)
Mujer	169 (42)
<b>Duración de la diabetes (años)</b>	12,67 ± 9,67
<b>Nivel de estudios, n (%)</b>	
Bajo	181 (45)
Medio	83 (20)
Alto	141 (35)
<b>PAS (mmHg)</b>	153,71 ± 23,01
<b>PAD (mmHg)</b>	83,51 ± 11,93
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	30,48 ± 5,23
<b>Perímetro de cintura (cm)</b>	104,79 ± 11,54
<b>Fumador activo, n (%)</b>	
Si	79 (20)
No	326 (80)
<b>Ingesta de alcohol, n (%)</b>	
Si	66 (16)
No	339 (84)
<b>Hipertensión, n (%)</b>	271 (67)
<b>Dislipemia, n (%)</b>	240 (59)
<b>Tratamiento de dislipemia<sup>a</sup>, n (%)</b>	223 (55)
<b>Retinopatía diabética, n (%)</b>	139 (34)
<b>Cardiopatía isquémica crónica, n (%)</b>	68 (17)
<b>ITB derecho</b>	0,96 ± 0,23
<b>Tratamiento con agentes orales, n (%)</b>	181 (45)
<b>Tratamiento con metformina, n (%)</b>	158 (39)
<b>Tratamiento con insulina, n (%)</b>	109 (27)
<b>Tratamiento ADOs +insulina, n (%)</b>	94 (23)

<sup>a</sup>incluye estatinas y/o fibratos

Figura 5: Prevalencia de diferentes factores de riesgo y comorbilidades en nuestra cohorte de 405 pacientes diabéticos



En la tabla 5 se muestran los parámetros biológicos medidos. Como puede observarse, la hemoglobina glicosilada (HbA1c) media, reflejo del control metabólico de los pacientes, fue de  $7,69 \pm 1.53$  %. El filtrado glomerular medio, calculado por la fórmula de Crockcroft-Gault e índice de la función renal, fue de  $87,91 \pm 39.05$  ml/min/hora, sin embargo, la media de microalbuminuria  $> 30$  mg/día refleja la presencia de nefropatía incipiente.

El perfil lipídico de la cohorte se sitúa en rangos aceptables lo que puede explicarse por el alto porcentaje de pacientes con dislipemia en tratamiento, aunque los niveles de cLDL estaban discretamente por encima de las últimas recomendaciones de la ADA para el paciente diabético.

El resto de parámetros biológicos valorados se encontraron en rango de normalidad, incluyendo perfil hepático, niveles de vitamina B12, ácido fólico y homocisteína.

Tabla 5.- Parámetros biológicos evaluados en la cohorte de diabéticos tipo 2 estudiada.

	<b>Población diabética estudiada n=405</b>
<b>Glucosa (mg/dl)</b>	157,58 ± 52,24
<b>HbA1c (%)</b>	7,69 ± 1,53
<b>Urea (mg/dl)</b>	45,19 ± 22,17
<b>Creatinina (mg/dl)</b>	1,02 ± 0,64
<b>Filtrado glomerular (ml/min/hora)</b>	87,91 ± 39,05
<b>Acido úrico (mg/dl)</b>	5,46 ± 2,58
<b>Hierro (µg/dl)</b>	78,00 ± 27,65
<b>Transferrina (mg/dl)</b>	253,81 ± 56,78
<b>Colesterol total (mg/dl)</b>	186,96 ± 44,51
<b>Triglicéridos (mg/dl)</b>	148,11 ± 90,25
<b>cHDL (mg/dl)</b>	47,57 ± 13,79
<b>cLDL (mg/dl)</b>	114,96 ± 39,26
<b>Lipoproteína Apo-A (mg/dl)</b>	140,63 ± 29,24
<b>Lipoproteína Apo-B (mg/dl)</b>	92,08 ± 25,22
<b>Lipoproteína (a) (mg/dl)</b>	30,01 ± 38,73
<b>Proteínas totales (g/dl)</b>	7,35 ± 0,61
<b>AST (U/l)</b>	24,83 ± 44,59
<b>ALT (U/l)</b>	26,82 ± 33,32
<b>GGT (U/l)</b>	44,40 ± 68,79
<b>Acido fólico (nmol/l)</b>	11,04 ± 4,44
<b>Vitamina B12 (pmol/l)</b>	518,47 ± 295,64
<b>Homocisteína (µmol/)</b>	12,77 ± 4,71
<b>Albúmina (g/dl)</b>	4,24 ± 0,37
<b>Fibrinógeno (g/l)</b>	4,34 ± 1,12
<b>Creatinuria (mg/dl)</b>	72,14 ± 53,55
<b>Albúmina/Creatinina (mg/g Cr)</b>	51,83 ± 126,96
<b>Albuminuria (mg/24h)</b>	78,26 ± 181,71

## **1.2. Objetivo n° 1: Asociación de factores clásicos con la presencia y gravedad de PNP.**

### ***1.2.1. Determinación de la asociación de factores clásicos con la presencia de PNP***

Para cumplir con el objetivo 1 se dividió, en primer lugar, a los sujetos en dos grupos según la presencia o no de PNP en función del resultado de la prueba de monofilamento de SW. La prueba resultó alterada en 150 de los 405 pacientes con DM tipo 2 estudiados, 66 mujeres y 84 varones. En las tablas siguientes se muestran los resultados del estudio comparativo entre ambos grupos de las características generales, antropométricas, presencia de factores de riesgo cardiovascular y otras comorbilidades, tratamientos hipoglucemiantes habituales y parámetros biológicos obtenidos.

#### ***1.2.1.1. Características generales clínicas y antropométricas***

En la tabla 6 se reflejan aspectos generales y antropométricos de la población estudiada, tales como edad, distribución por género, duración de la diabetes, presión arterial, IMC y perímetro de cintura de los 405 pacientes, divididos según presentaron o no alterada la prueba de monofilamento de SW.

La presencia de PNP se correlacionó significativamente con la edad y la duración de la diabetes, de forma que, como cabría esperar, los pacientes con DM tipo 2 y prueba de monofilamento de SW alterada tenían mayor edad y más años de evolución

de la diabetes. No se encontraron diferencias significativas en la distribución por sexos, los niveles de tensión arterial, ni en los parámetros antropométricos evaluados.

Tabla 6.- Características generales y antropométricas de los pacientes con diabetes tipo 2 estudiados, clasificados según la prueba de monofilamento de SW

	<b>Prueba de monofilamento SW normal (n=255)</b>	<b>Prueba de monofilamento SW alterada (n=150)</b>
<b>Edad (años)</b>	64,89 ( $\pm$ 10,74)	67,79 $\pm$ 9,62*
<b>Sexo, n (%)</b>		
Hombre	152 (60)	84 (56)
Mujer	103 (40)	66 (44)
<b>Duración de la diabetes (años)</b>	11,04 $\pm$ 8,63	15,46 $\pm$ 10,69**
<b>PAS (mmHg)</b>	153,12 $\pm$ 23,02	154,72 $\pm$ 23,02
<b>PAD (mmHg)</b>	84,16 $\pm$ 11,97	82,38 $\pm$ 11,82
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	30,54 $\pm$ 5,27	30,37 $\pm$ 5,15
<b>Perímetro de cintura (cm)</b>	104,42 $\pm$ 11,43	105,42 $\pm$ 11,73

Significación estadística \*p < 0.05 \*\*p < 0.01

#### ***1.2.1.2. Factores de riesgo cardiovascular y comorbilidades asociadas***

En la tabla 7 se muestra la prevalencia de diferentes factores de riesgo cardiovascular como el hábito tabáquico, consumo de alcohol, hipertensión y dislipemia recogidos en la historia clínica, y de comorbilidades asociadas: la presencia de retinopatía diabética y cardiopatía isquémica (CI) conocidas, y el índice tobillo-brazo obtenido en la exploración física, valor indicativo de la presencia de vasculopatía periférica.

No encontramos diferencias significativas en la presencia de hábito tabáquico activo, ni en el consumo de alcohol. Tampoco hubo diferencias en otros factores de riesgo cardiovascular evaluado, como la hipertensión y dislipemia, el número de pacientes en tratamiento hipolipemiante (incluye estatinas y /o fibratos), ni con la presencia de complicaciones macrovasculares.

Solo la retinopatía se relacionó de forma significativa ( $p < 0.001$ ) con la presencia de neuropatía por una prueba de monofilamento de SW alterada.

Tabla 7.- Presencia de factores de riesgo y comorbilidades asociadas en los pacientes con diabetes tipo 2 estudiados, clasificados según la prueba de monofilamento de SW

	<b>Prueba de monofilameto SW normal (n=255)</b>	<b>Prueba de monofilamento SW alterada (n=150)</b>
<b>Fumador activo, n (%)</b>		
<b>Si</b>	52(20)	27 (18)
<b>No</b>	203 (80)	123 (82)
<b>Ingesta de alcohol, n (%)</b>		
<b>Si</b>	46(18)	20(13)
<b>No</b>	209 (82)	130 (87)
<b>Hipertensión, n (%)</b>	163 (64)	108 (72)
<b>Dislipemia, n (%)</b>	143 (56)	97 (65)
<b>Tratamiento de dislipemia, n (%)</b>	136 (54)	87 (58)
<b>Retinopatía diabética, n (%)</b>	65 (27,9)	74 (53,2)**
<b>CI crónica, n(%)</b>	36 (14)	32 (21)
<b>ITB derecho</b>	0,95 ± 0,21	0,96 ± 0,24

Significación estadística \*\* $p < 0.01$

### 1.2.1.3. Tratamientos antidiabéticos

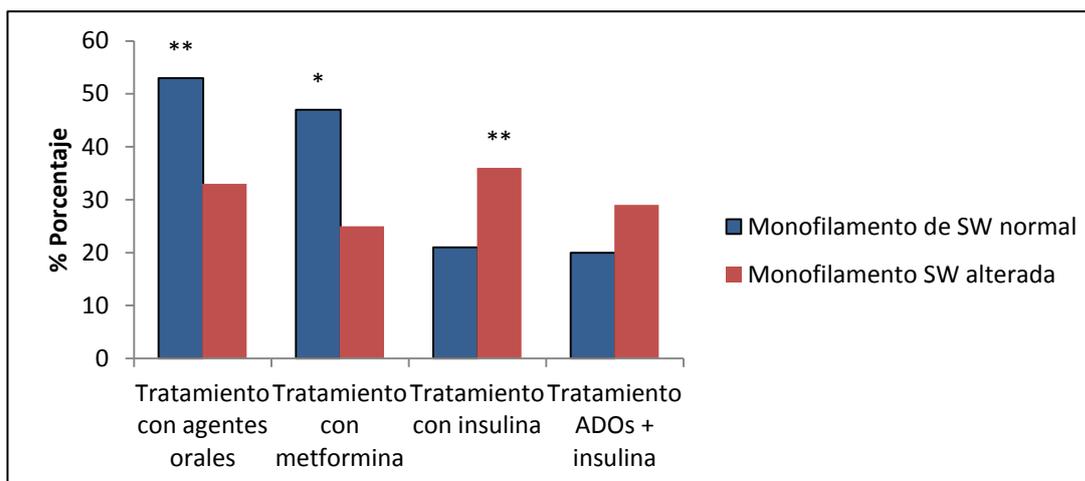
La tabla 8 muestra los tipos de tratamientos hipoglucemiantes habituales de los pacientes con diabetes tipo 2 estudiados, clasificados según la prueba de monofilamento de SW. En la figura 6 observamos que el porcentaje de pacientes con DM tipo 2 con prueba alterada en tratamiento con insulina fue significativamente mayor, comparado con el grupo de pacientes con prueba normal, donde la mayor parte estaba en tratamiento con antidiabéticos orales, incluida la toma de metformina. No hubo diferencias significativas en los pacientes tratados con tratamiento combinado insulina y antidiabéticos orales.

Tabla 8.- Tratamientos hipoglucemiantes habituales de los pacientes con diabetes tipo 2 estudiados, clasificados según la prueba de monofilamento de SW.

<b>Tratamientos</b>	<b>Prueba de monofilamento SW normal (n=255)</b>	<b>Prueba de monofilamento SW alterada (n=150)</b>
<b>ADOs, n (%)</b>	132 (53)**	49(33)
<b>Metformina, n (%)</b>	120 (47)*	38 (25)
<b>Insulina, n (%)</b>	55 (21)**	54 (36)
<b>ADOs +insulina, n (%)</b>	51 (20)	43 (29)

Significación estadística \*p<0.05      \*\*p<0.01

Figura 6: Tratamientos hipoglucemiantes habituales de los pacientes con diabetes tipo 2 estudiados, clasificados según la prueba de monofilamento SW.



Significación estadística \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$

#### 1.2.1.4. Parámetros bioquímicos

En la tabla 9 se detallan los principales parámetros bioquímicos obtenidos en ayunas de los sujetos incluidos en el estudio, clasificados según la prueba de monofilamento de SW.

Como cabría esperar, los pacientes con DM tipo 2 y la prueba de monofilamento SW alterada ( $n=150$ ) presentaron de forma significativa peor control metabólico (según niveles de HbA1c), mayores concentraciones de triglicéridos en ayunas y un mayor deterioro de la función renal (valorada por filtrado glomerular medido según la fórmula de Crockcroft-Gault). Resultado, este último, que podría explicar que en este grupo se encontrara una diferencia significativa en la prevalencia de terapia con insulina.

También se encontraron diferencias significativas en otros parámetros biológicos como los niveles plasmáticos de urea y fibrinógeno. Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas en los niveles plasmáticos de colesterol total y sus

fracciones, ni en las concentraciones de albuminuria o cociente albúmina/creatinina al comparar ambos grupos.

Tabla 9: Características biológicas de los pacientes con DM tipo 2 agrupados según presentasen o no la prueba monofilamento SW alterada

	<b>Prueba de monofilamento SW normal (n=255)</b>	<b>Prueba de monofilamento SW alterada (n=150)</b>
<b>Glucosa (mg/dl)</b>	154,58 ± 50,68	162,46 ± 54,50
<b>HbA1c (%)</b>	7,46 ± 1,48	8,07 ± 1,54**
<b>Urea (mg/dl)</b>	42,37 ± 21,89	49,8 ± 21,91*
<b>Creatinina (mg/dl)</b>	0,97 ± 0,54	1,07 ± 0,77
<b>Filtrado glomerular (ml/min/hora)</b>	90,86 ± 40,13	82,98 ± 36,92*
<b>Acido úrico (mg/dl)</b>	5,4 ± 3,06	5,57 ± 1,49
<b>Colesterol total (mg/dl)</b>	184,19 ± 45,55	191,51 ± 42,5
<b>Triglicéridos (mg/dl)</b>	140,76 ± 85,60	160,13 ± 96,48*
<b>cHDL (mg/dl)</b>	47,20 ± 14,46	48,18 ± 12,65
<b>cLDL (mg/dl)</b>	114,64 ± 41,80	115,47 ± 34,90
<b>Lipoproteína Apo-B (mg/dl)</b>	90,57 ± 25,44	94,57 ± 24,73
<b>Albúmina (g/dl)</b>	4,24 ± 0,37	4,24 ± 0,35
<b>Fibrinógeno (g/l)</b>	4,22 ± 1,09	4,51 ± 1,13*
<b>Creatinuria (mg/dl)</b>	74,82 ± 64,66	67,91 ± 28,00
<b>Albúmina/Creatinina (mg/g Cr)</b>	45,28 ± 132,57	61,83 ± 118,06
<b>Albuminuria (mg/24h)</b>	68,38 ± 175,82	94,45 ± 190,49

Significación estadística \*p < 0.05. \*\*p < 0.01.

### ***1.2.2. Determinación de la asociación de factores clásicos con el grado de PNP***

Del mismo modo, para cumplir con el objetivo 1, hemos clasificado a los sujetos según el grado de PNP. La cohorte de 405 pacientes quedó dividida en 4 grupos según los criterios de NDS; en el grupo 1 con score  $\leq 2$  y por tanto ausencia de PNP quedaron incluidos 123 pacientes, el grupo 2 con un score 3-5 y PNP leve incluyó 105 pacientes, el grupo 3 con score 6-7 y PNP moderada incluyó 83 pacientes y, por último, en el grupo 4 con score  $\geq 8$  y por tanto afectación neuropática grave quedaron incluidos 94 pacientes.

En los apartados siguientes se muestran, de forma similar al apartado anterior, los datos comparativos entre los diferentes grupos de las características generales y antropométricas, la presencia de factores de riesgo cardiovascular y otras comorbilidades, los tratamientos hipoglucemiantes habituales, datos obtenidos en la historia clínica y exploración física, así como de los parámetros biológicos evaluados.

#### ***1.2.2.1. Características generales clínicas y antropométricas***

En la tabla 10 se representan los datos clínicos de edad, distribución por género, duración de la diabetes, presión arterial, IMC y perímetro de cintura de los 405 pacientes, divididos en los 4 grupos referidos.

El grado de PNP, al igual que la presencia de la misma, se relacionó de forma significativa con la edad y la duración de la diabetes, de forma que los pacientes de mayor edad y más años de evolución (figura 7) eran los que presentaban un mayor grado de afectación; y no se encontraron diferencias significativas en la distribución por

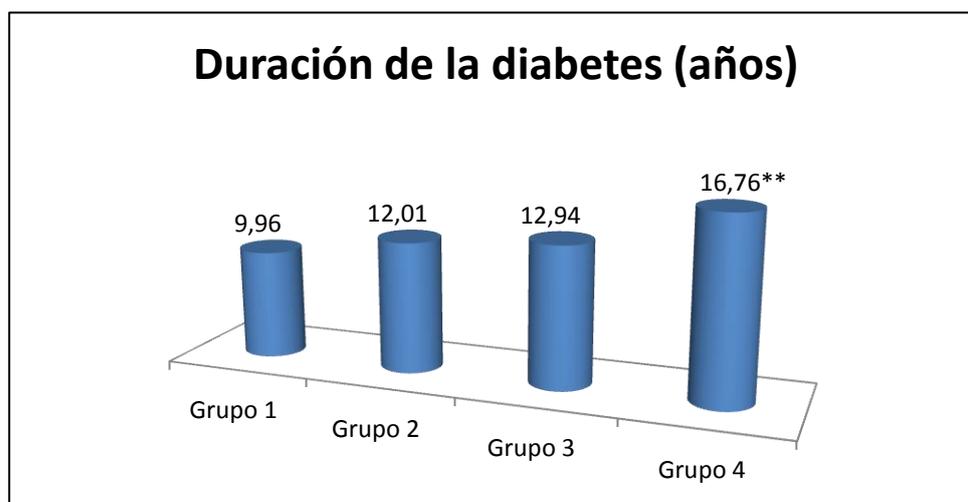
sexos. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa con los niveles de tensión arterial sistólica, no así con la diastólica ni con el resto de parámetros antropométricos evaluados.

Tabla 10.- Características generales y antropométricas de los pacientes con diabetes tipo 2 estudiados, clasificados según el grado de PNP

	<b>Grupo 1 (n=123)</b>	<b>Grupo 2 (n=105)</b>	<b>Grupo 3 (n=83)</b>	<b>Grupo 4 (n=94)</b>
<b>Edad (años)</b>	62,5 ± 10,97	66,63 ± 9,65	68,11 ± 8,99	67,87 ± 10,72**
<b>Sexo, n (%)</b>				
Hombre	79 (64)	55 (52)	48 (58)	54 (57)
Mujer	44 (36)	50 (48)	35 (42)	40 (43)
<b>Duración de la diabetes (años)</b>	9,96 ± 8,95	12,01 ± 9,15	12,94 ± 9,05	16,76 ± 10,4**
<b>PAS (mmHg)</b>	148,87 ± 23,11	153,14 ± 22,23	156,44 ± 21,97	158,31 ± 23,67*
<b>PAD (mmHg)</b>	84,57 ± 12,57	82,79 ± 12,79	83,26 ± 10,92	83,09 ± 10,99
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	30,61 ± 4,75	31,02 ± 5,31	29,34 ± 4,5	30,73 ± 6,17
<b>Perímetro de cintura (cm)</b>	104,85 ± 10,7	105,26 ± 11,54	103,17 ± 10,83	105,62 ± 13,22

Significación estadística \*p < 0.05 \*\*p < 0.01

Figura 7: Gráfica comparativa de la duración de la diabetes de los pacientes con diabetes tipo 2 estudiados, clasificados según el grado de PNP



Significación estadística \*\*p < 0.01

### ***1.2.2.2. Factores de riesgo cardiovascular y comorbilidades asociadas***

La prevalencia de diferentes factores de riesgo cardiovascular recogidos en la historia clínica, y la presencia de comorbilidades asociadas micro y macrovasculares en los pacientes incluidos en el estudio, clasificados en los 4 grupos definidos según el grado de PNP, se muestra en la tabla 11. También se muestra la presencia de una prueba de monofilamento alterado entre los diferentes grupos.

No encontramos diferencias significativas en el consumo de tabaco o alcohol, tampoco en la prevalencia de antecedentes de hipertensión, al igual que ocurrió con la presencia de la misma; sin embargo, sí las hubo en la presencia de dislipemia y su tratamiento (figura 8), de forma que la dislipemia fue más prevalente en los pacientes que presentaron menor grado de PNP pero también fue el grupo que recibía en un mayor porcentaje tratamiento de su dislipemia.

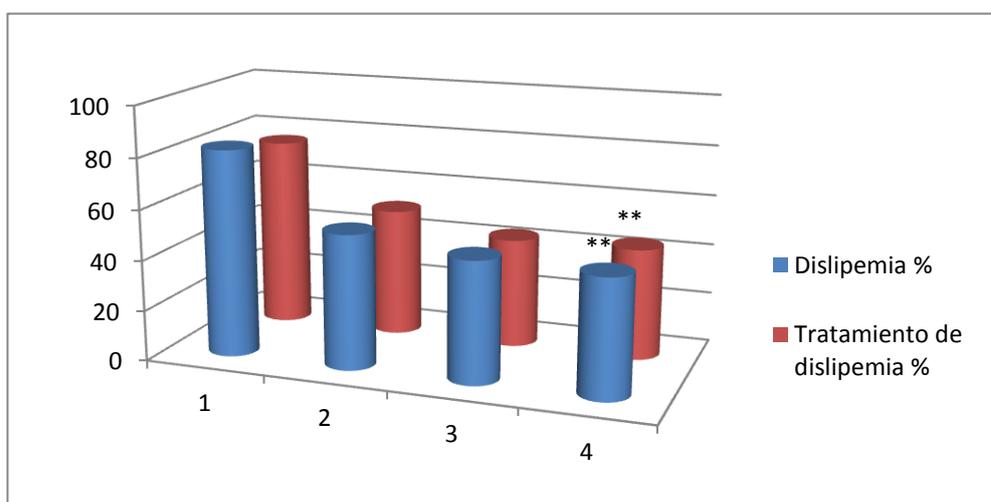
En relación a las complicaciones macrovasculares no hubo diferencias significativas ni en la presencia de antecedentes de cardiopatía isquémica ni en el ITB expresión de la presencia de EAP. En cambio, la retinopatía una de las complicaciones microvasculares evaluadas, sí se relacionó de forma significativa con el grado de PNP. Por último, y como esperábamos, se encontraron diferencias significativas en la presencia de una prueba de monofilamento de SW alterada, de forma que el porcentaje más elevado correspondió a los pacientes con un mayor grado de PNP (figura 9).

Tabla 11.- Presencia de factores de riesgo y comorbilidades asociadas en los pacientes con diabetes tipo 2 estudiados, clasificados según el grado de PNP (criterios NDS)

	<b>Grupo 1 (n=123)</b>	<b>Grupo 2 (n=105)</b>	<b>Grupo 3 (n=83)</b>	<b>Grupo 4 (n=94)</b>
<b>Fumador activo, n (%)</b>				
<b>Si</b>	29 (24)	13 (12)	14 (17)	23 (24)
<b>No</b>	94 (76)	92 (88)	69 (83)	71 (76)
<b>Ingesta de alcohol, n (%)</b>				
<b>Si</b>	17 (14)	16 (15)	11 (13)	22 (23)
<b>No</b>	106 (86)	89 (85)	72 (87)	72 (77)
<b>Hipertensión, n (%)</b>	87 (71)	73 (70)	56 (67)	55 (59)
<b>Dislipemia, n (%)</b>	101 (82)	55 (53)	40 (48)	44 (47)**
<b>Tratamiento de dislipemia, n (%)</b>	93(76)	53 (51)	36 (43)	41 (44)**
<b>Retinopatía diabética, n (%)</b>	27 (22)	28 (27)	33 (40)	51 (54)**
<b>CI crónica, n(%)</b>	19 (15)	12 (11)	15 (18)	22 (23)
<b>ITB derecho</b>	0,92 ± 0,16	0,98 ± 0,22	0,95 ± 0,25	1,0 ± 0,29
<b>Monofilamento anormal, n (%)</b>	22 (18)	31 (30)	40 (48)	57 (61)**

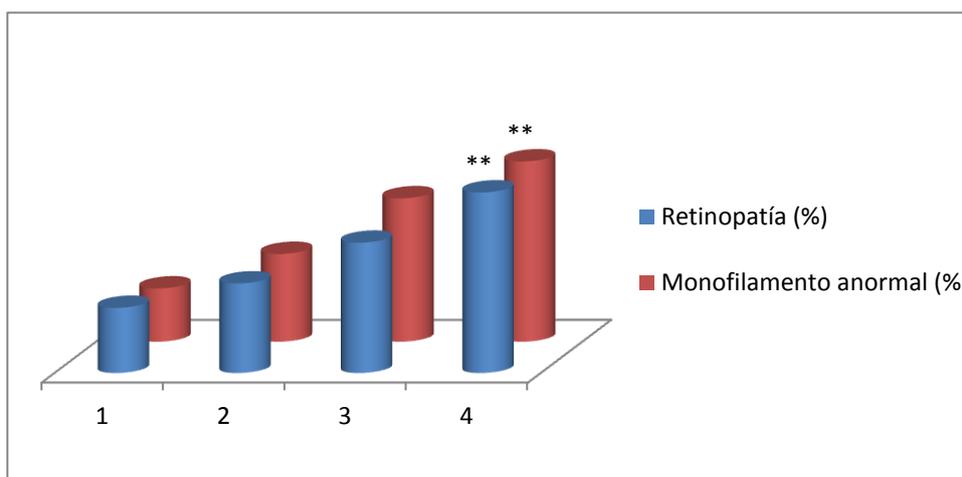
Significación estadística \*p < 0.05 \*\*p < 0.01

Figura 8: Diferencias en la presencia de dislipemia y pacientes en tratamiento hipolipemiante entre los 4 grupos de pacientes DM tipo 2 clasificados según NDS



Significación estadística \*\*p < 0.01

Figura 9: Diferencias en la presencia de retinopatía y prueba de monofilamento alterada entre los pacientes DM tipo 2 clasificados según criterios NDS



Significación estadística \*\* $p < 0.01$

### 1.2.2.3. Tratamientos antidiabéticos

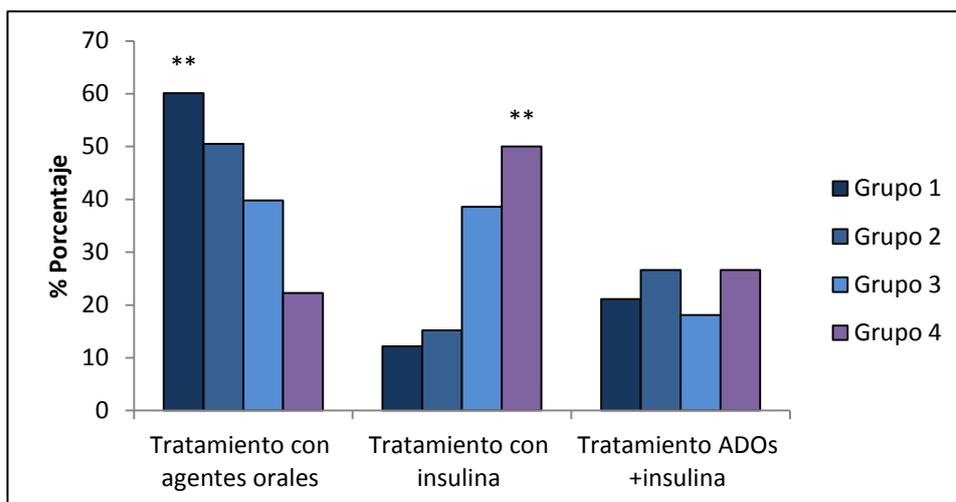
En la tabla 12 se describen los diferentes tipos de tratamientos hipoglucemiantes habituales de los pacientes con diabetes tipo 2 estudiados, clasificados según el grado de neuropatía. Los diabéticos con mayor grado de neuropatía (grupo 4) presentaron de forma significativa un mayor porcentaje de pacientes insulinizados, y al contrario, un menor porcentaje de pacientes tratados solo con hipoglucemiantes orales, incluida la metformina (figura 10).

Tabla 12.- Tratamientos hipoglucemiantes habituales de los pacientes con diabetes tipo 2 estudiados, clasificados según el grado de PNP (criterios NDS)

Tratamientos	Grupo 1 (n=123)	Grupo 2 (n=105)	Grupo 3 (n=83)	Grupo 4 (n=94)
Agentes orales, n (%)	74 (60,1)**	53 (50,5)	33 (39,8)	21 (22,3)
Insulina, n (%)	15 (12,2)	16 (15,2)	32 (38,6)	47 (50)**
ADOs +insulina, n (%)	26 (21,1)	28 (26,6)	15 (18,1)	25 (26,6)

Significación estadística \*\* $P < 0.01$

Figura 10: Tratamientos hipoglucemiantes habituales de los pacientes con diabetes tipo 2 estudiados, clasificados según NDS



Significación estadística \*\*P < 0.01

#### 1.2.2.4. Parámetros bioquímicos

En la tabla 13 se detallan los parámetros bioquímicos más relevantes para nuestro estudio obtenidos en ayunas de los pacientes incluidos en el estudio, clasificados de igual forma en 4 grupos según el grado de neuropatía (criterios NDS). Como cabría esperar, los niveles de HbA1c fueron significativamente más elevados en pacientes con un mayor grado de PNP, poniendo de manifiesto que un peor control metabólico está asociado tanto con la presencia de PNP, como vimos en el apartado anterior, como con el grado de la misma.

Igualmente, encontramos diferencias significativas en parámetros indicativos de función renal tales como urea, creatinina, filtrado glomerular calculado según la fórmula de Cockcroft-Gault y albuminuria, de forma que los pacientes con mayor afectación neuropática según NDS presentaban un mayor deterioro de la función renal expresado tanto por la presencia de albuminuria ( $44,44 \pm 161,06$  mg/24h,  $60,58 \pm 129,75$  mg/24h,  $72,52 \pm 126,391$  mg/24h,  $48,34 \pm 268,05$  mg/24h, p 0.001), como por una caída del

filtrado glomerular ( $100,82 \pm 43,42$  ml/min,  $89,45 \pm 34,54$  ml/min,  $81,34 \pm 31,75$  ml/min,  $75,59 \pm 39,37$  ml/min, p 0.000). También es en este grupo donde se da una mayor prevalencia de tratamiento con insulina.

Respecto al perfil lipídico, a diferencia de la presencia de PNP, los pacientes con mayor grado de neuropatía sí presentaban un peor perfil, con diferencias significativas tanto en los niveles de LDL ( $103,09 \pm 36,55$  mg/dl,  $118,73 \pm 40,45$  mg/dl,  $121,92 \pm 41,96$  mg/dl,  $119,81 \pm 35,86$  mg/dl, p 0.0019), como de apolipoproteína B ( $86,66 \pm 25,17$  mg/dl,  $91,68 \pm 21,68$  mg/dl,  $93,84 \pm 26,33$ ,  $97,99 \pm 26,94$ , p 0.017) y de triglicéridos ( $150,85 \pm 92,32$  mg/dl,  $127,29 \pm 58,26$  mg/dl,  $159,37 \pm 111,04$ ,  $158,02 \pm 94,02$ , p 0.048).

Tabla 13.- Parámetros bioquímicos en los pacientes con DM2 clasificados según el grado de PNP (según criterios NDS)

	<b>Grupo 1 (n=123)</b>	<b>Grupo 2 (n=105)</b>	<b>Grupo 3 (n=83)</b>	<b>Grupo 4 (n=94)</b>
<b>Glucosa (mg/dl)</b>	149,47 ± 47,79	156,68 ± 50,68	165,87 ± 56,63	161,54±54,57
<b>HbA1c (%)</b>	7,51 ± 1,49	7,37 ± 1,39	7,92 ± 1,56	8,08 ± 1,62**
<b>Urea (mg/dl)</b>	43,61 ± 16,62	42,04 ± 17,86	44,96 ± 18,45	50,96±32,66*
<b>Creatinina (mg/dl)</b>	0,93 ± 0,36	0,92 ± 0,32	0,95 ± 0,26	1,28 ± 1,15**
<b>Filtrado glomerular (ml/min/hora)</b>	100,82 ± 43,42	89,45 ± 34,54	81,34 ± 31,75	75,6±39,37**
<b>Acido úrico (mg/dl)</b>	5,57 ± 1,58	5,03 ± 1,44	5,37 ± 1,45	5,91 ± 4,62
<b>CT (mg/dl)</b>	178,59 ± 40,66	186,82 ± 42,01	195,43 ± 44,55	190,39±50,48
<b>TG (mg/dl)</b>	150,85 ± 92,32	127,29 ± 58,26	159,37 ±111,04	158,0±94,02*
<b>HDL-c (mg/dl)</b>	48,03 ± 14,07	48,51 ± 13,24	48,26 ± 15,8	45,32 ± 11,98
<b>LDL-c (mg/dl)</b>	103,09 ± 36,55	118,73 ± 40,45	121,92 ± 41,96	119,8±35,9**
<b>Lipoproteína Apo-B (mg/dl)</b>	86,66 ± 25,17	91,68 ± 21,68	93,84 ± 26,33	97,0 ± 26,94*
<b>Proteínas totales (g/dl)</b>	7,22 ± 0,45	7,32 ± 0,57	7,38 ± 0,65	7,52 ± 0,75**
<b>Albúmina (g/dl)</b>	4,3 ± 0,29	4,21 ± 0,36	4,19 ± 0,38	4,25 ± 0,44
<b>Creatinuria (mg/dl)</b>	79,92 ± 38,10	78,84 ± 89,31	62,52 ± 23,45	62,18 ± 22,63
<b>Albúmina/Creatinina (mg/g Cr)</b>	41,98 ± 125,07	47,13 ± 111,16	96,24 ± 162,60	35,46 ± 72,06
<b>Albuminuria (mg/24h)</b>	44,44 ± 161,06	60,58 ± 129,75	72,52 ± 126,39	148,3±268**

Significación estadística \*p &lt; 0.05 \*\*p &lt; 0.01

### **1.3. Objetivo nº 2: Asociación de los niveles de homocisteína plasmática con la presencia y grado de PNP.**

#### ***1.3.1. Asociación de los niveles de homocisteína plasmática con la presencia de PNP***

Para cumplir con el objetivo nº 2 hemos dividido primero a los sujetos en dos grupos según la prueba de monofilamento de SW. Como vimos en el análisis de las características generales 150 pacientes presentaron la prueba alterada, de ellos 84 varones y 66 mujeres.

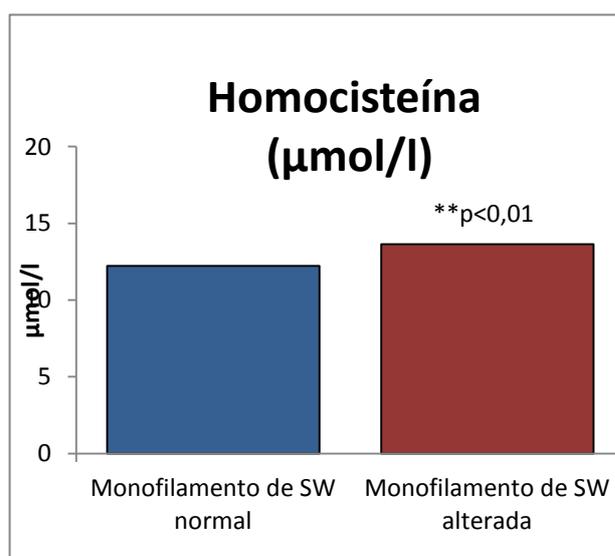
La tabla 14 muestra los niveles plasmáticos obtenidos de homocisteína, vitamina B12 y ácido fólico, así como los datos ya reflejados previamente de edad, género, IMC, HbA1c y filtrado glomerular de los pacientes agrupados según la prueba de monofilamento alterada. Se encontraron unas concentraciones plasmáticas de homocisteína significativamente más elevadas en los pacientes con prueba de monofilamento de SW alterada (figura 11), no así las concentraciones de vitamina B12 y ácido fólico. Además, estas diferencias se mantuvieron al corregir por edad, sexo, tabaquismo, ingesta de alcohol y aclaramiento renal. Es conocido que a mayor edad, consumo de tabaco, ingesta de alcohol y menor aclaramiento, las concentraciones plasmáticas de homocisteína se elevan; del mismo modo, en nuestro estudio encontramos que los valores plasmáticos de homocisteína se relacionaron de forma significativa con la edad ( $r = -0.231$ ,  $p < 0.001$ ) y con el aclaramiento de creatinina ( $r = 0.358$ ,  $p < 0.001$ ). No se relacionaron con el grado de control glucémico, el tabaquismo, los valores de albuminuria ni el tiempo de evolución de la enfermedad.

Tabla 14.- Niveles plasmáticos de homocisteína, ácido fólico y vitamina B12, y otros factores clásicos, de los pacientes con DM tipo 2 agrupados según presentasen o no la prueba de monofilamento SW alterada

	<b>Prueba de monofilamento de SW normal (n=255)</b>	<b>Prueba de monofilamento de SW alterada (n=150)</b>
<b>Ácido fólico (nmol/l)</b>	10,76 ± 4,28	11,49 ± 4,65
<b>Vitamina B12 (pmol/l)</b>	523,06 ± 306,30	511,15 ± 278,73
<b>Homocisteína (µmol/l)</b>	12,22 ± 4,48	13,64 ± 4,93**
<b>Edad (años)</b>	64,89 (± 10,74)	67,79 ± 9,62*
<b>Sexo, n (%)</b>		
<b>Hombre</b>	152 (60)	84 (56)
<b>Mujer</b>	103 (40)	66 (44)
<b>Duración de la diabetes (años)</b>	11,04 (± 8,63)	15,46 ± 10,69**
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	30,54 (±5,27)	30,37 ±5,15
<b>HbA1c (%)</b>	7,46 ± 1,48	8,07 ± 1,54**
<b>Filtrado glomerular (ml/min/hora)</b>	90,86 ± 40,13	82,98 ± 36,92*

Significación estadística: \*p < 0.05 \*\*p < 0.01

Figura 11: Diferencias de los niveles de homocisteína plasmática entre los pacientes diabéticos clasificados según la presencia de PNP por la prueba de monofilamento de SW



Significación estadística: \*\*p < 0.01

### 1.3.2. Análisis de regresión múltiple

Al realizar una regresión logística introduciendo como variable dependiente la prueba de monofilamento alterada y como independientes la edad, los años de evolución de la diabetes, el tabaco, la ingesta de alcohol, la presencia de vasculopatía, el aclaramiento de creatinina, la HbA1c y las concentraciones plasmáticas de homocisteína, permanecieron todas en el modelo excepto el tabaco, la ingesta de alcohol, la presencia de vasculopatía y el aclaramiento de creatinina. Por cada incremento en un 1% de la HbA1c, el riesgo de prueba patológica fue del 28%, mientras que por cada elevación de 1  $\mu\text{mol/l}$  en las concentraciones plasmáticas de homocisteína, el riesgo de prueba patológica se incrementó un 8% (tabla 15).

Tabla 15: Regresión logística teniendo como variable dependiente la prueba de monofilamento alterada y como independientes la edad, los años de evolución de la diabetes, la HbA1c, la homocisteína plasmática, el filtrado glomerular, el tabaquismo, la ingesta de alcohol y la presencia de vasculopatía.

	<b>B</b>	<b>Sig.</b>	<b>EXP (B)</b>
<b>Edad (años)</b>	0,036	0,026	1,037
<b>Evolución (años)</b>	0,041	0,001	1,042
<b>HbA1c (%)</b>	0,274	0,001	1,315
<b>Homocisteína (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>	0,079	0,003	1,083
<b>Filtrado glomerular (ml/min/h)</b>	0,006	0,132	1,006
<b>Tabaquismo</b>	-0,049	0,736	1,050
<b>Alcohol</b>	-0,136	0,682	0,873
<b>Vasculopatía</b>	0,571	0,069	1,770
<b>Constante</b>	-7,184	0	0,001

### ***1.3.3. Asociación de los niveles de homocisteína plasmática con el grado de PNP***

Siguiendo con el objetivo 2 clasificamos a los sujetos según el grado de PNP con los criterios NDS, quedando agrupada la cohorte de 405 diabéticos en los 4 grupos ya mencionados.

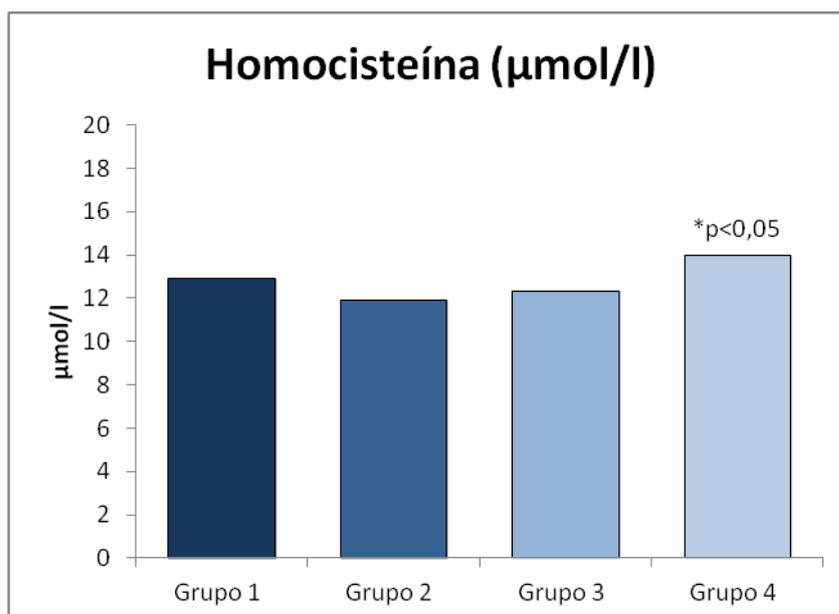
En la tabla 16 se reflejan los datos comparativos entre los 4 grupos de los niveles plasmáticos obtenidos de homocisteína, vitamina B12 y ácido fólico, así como los datos ya reflejados previamente de edad, género, IMC, HbA1c y filtrado glomerular. Cuando analizamos la relación entre niveles de homocisteína plasmática y grado de PNP observamos que hubo una diferencia significativa entre los diferentes grupos, siendo más elevados en el grupo con mayor afectación neuropática ( $12,91 \pm 4,96 \mu\text{mol/l}$ ,  $11,91 \pm 3,75 \mu\text{mol/l}$ ,  $12,34 \pm 3,88 \mu\text{mol/l}$ ,  $13,99 \pm 5,76 \mu\text{mol/l}$ ,  $p 0.022$ ) (figura 12); sin embargo, a diferencia de lo que ocurrió con la relación entre homocisteína plasmática y la presencia de PNP según la prueba de monofilamento de SW, en la regresión lineal no se logró mantener una diferencia significativa e independiente tras corrección por los diversos factores estudiados. Tampoco encontramos diferencias significativas entre los diferentes grupos en los niveles de ácido fólico y vitamina B12.

Tabla 16: Niveles plasmáticos de homocisteína, ácido fólico y vitamina B12, y otros factores clásicos, de los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 agrupados según el grado de PNP

	<b>Grupo 1 (n=123)</b>	<b>Grupo 2 (n=105)</b>	<b>Grupo 3 (n=83)</b>	<b>Grupo 4 (n=94)</b>
<b>Ácido fólico (nmol/l)</b>	10,77 ± 3,63	11,13 ± 4,55	10,85 ± 4,49	11,49 ± 5,24
<b>Vitamina B12 (pmol/l)</b>	502,19 ± 242,27	554,93 ± 376,54	516,21 ± 284,78	499,55 ± 251,54
<b>Homocisteína (µmol/l)</b>	12,91 ± 4,96	11,91 ± 3,75	12,34 ± 3,88	13,99 ± 5,76*
<b>Edad (años)</b>	62,5 ± 10,97	66,63 ± 9,65	68,11 ± 8,99	67,87 ± 10,72**
<b>Sexo, n (%)</b>				
<b>Hombre</b>	79 (64)	55 (52)	48 (58)	54 (57)
<b>Mujer</b>	44 (36)	50 (48)	35 (42)	40 (43)
<b>Duración de la diabetes (años)</b>	9,96 ± 8,95	12,01 ± 9,15	12,94 ± 9,05	16,76 ± 10,4**
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	30,61 ± 4,75	31,02 ± 5,31	29,34 ± 4,5	30,73 ± 6,17
<b>HbA1c (%)</b>	7,51 ± 1,49	7,37 ± 1,39	7,92 ± 1,56	8,08 ± 1,62**
<b>Filtrado glomerular (ml/min/hora)</b>	100,82 ± 43,42	89,45 ± 34,54	81,34 ± 31,75	75,59 ± 39,37**

Significación estadística: \*p < 0.05 \*\*p < 0.01

Figura 12: Diferencias de los niveles de homocisteína plasmática entre los pacientes diabéticos clasificados según criterios NDS.



Significación estadística: \*p < 0.05

## **2. Parte Segunda:**

### **Asociación del estrés oxidativo con el grado de PNP en un subgrupo de pacientes diabéticos de nuestra cohorte (Objetivo 3)**

#### **2.1. Características generales del subgrupo estudiado**

Para cumplir con nuestro tercer objetivo, seleccionamos de forma aleatoria a 58 sujetos de la cohorte completa de 405 pacientes, con y sin presencia de PNP según criterios NDS (n=29 para ambos grupos), apareados por género, edad, IMC, HbA1c y filtrado glomerular, dado que estos parámetros influyen como ya sabemos en el nivel de estrés oxidativo. Se trata como hemos comentado previamente de un diseño de casos/controles anidado.

En la tabla 17 se presentan las características generales del subgrupo de 58 sujetos seleccionados por muestreo aleatorio, 40 varones y 18 mujeres, cuya edad media fue de  $67,02 \pm 7,72$  años y una duración media de su diabetes de  $11,83 \pm 10,33$  años, siendo muy parecida a la cohorte completa salvo la distribución por género, con un mayor predominio de varones en el subgrupo.

El peso medio de los pacientes se encontraba en niveles de obesidad grado 1 según el IMC y su perímetro de cintura también está por encima del rango normal, similar a la cohorte completa. Como puede observarse, 31 de los 58 pacientes (53,4%) presentó un test de monofilamento alterado frente al 37% de la cohorte completa y un 28 % presentaba antecedentes de retinopatía diabética. El ITB medio fue  $0,86 \pm 0,17$ ,

inferior a la cohorte completa, y un porcentaje mayor (22.4 %) tenía antecedentes de cardiopatía isquémica, reflejo de una mayor prevalencia de complicación macrovascular en el subgrupo seleccionado.

Respecto al tratamiento, hubo un porcentaje más bajo de pacientes en tratamiento con insulina respecto a la cohorte.

Tabla 17.- Características generales, clínicas y antropométricas del grupo completo de los 58 sujetos seleccionados

	<b>Población diabética estudiada</b> <b>n=58</b>
<b>Edad (años)</b>	67,02 ± 7,72
<b>Sexo, n (%)</b>	
Hombre	40 (69)
Mujer	18 (31)
<b>Duración de la diabetes (años)</b>	12,33 ± 10,33
<b>PAS (mmHg)</b>	150 ± 18,0
<b>PAD (mmHg)</b>	82,21 ± 11,99
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	31,09 ± 5,08
<b>Perímetro de cintura (cm)</b>	108,35 ± 10,36
<b>Fumador activo, n (%)</b>	
Si	7 (12)
No	51 (88)
<b>Ingesta de alcohol, n (%)</b>	
Si	7 (12)
No	51 (88)
<b>Hipertensión, n (%)</b>	45 (77,6)
<b>Dislipemia, n (%)</b>	42 (72,4)
<b>Tratamiento de dislipemia, n (%)</b>	37 (63,8)
<b>Retinopatía diabética, n (%)</b>	16 (28,1)
<b>Cardiopatía isquémica crónica, n(%)</b>	13 (22,4)
<b>ITB derecho</b>	0,86 ± 0,17
<b>Test monofilamento SW</b>	
Normal	27 (46,6)
Alterado	31 (53,4)
<b>Tratamiento con agentes orales, n (%)</b>	36 (62)
<b>Tratamiento con insulina, n (%)</b>	10 (17)
<b>Tratamiento con ADOs + insulina, n(%)</b>	12 (21)

Los principales parámetros bioquímicos están recogidos en la tabla 18. Los pacientes del subgrupo, de forma similar a la cohorte completa, presentaban un aceptable control metabólico, con una media de HbA1c de  $7,7 \pm 1,64\%$ ; una función renal conservada reflejada por una media de filtrado glomerular, calculado por la fórmula de Crockcroft, de  $91,62 \pm 36,8$  ml/min/hora, aunque con presencia de microalbuminuria  $> 30$  mg/día. También los niveles medios de colesterol total y triglicéridos fueron similares a los de la cohorte completa.

Tabla 18.- Parámetros biológicos destacados del subgrupo de 58 pacientes

	<b>Población diabética estudiada n=58</b>
<b>Glucosa (mg/dl)</b>	165,18 $\pm$ 52,8
<b>HbA1c (%)</b>	7,70 $\pm$ 1,64
<b>Creatinina (mg/dl)</b>	1,00 $\pm$ 0,39
<b>Filtrado glomerular (ml/min/hora)</b>	91,62 $\pm$ 36,8
<b>Colesterol total (mg/dl)</b>	185,14 $\pm$ 38,63
<b>Triglicéridos (mg/dl)</b>	146,77 $\pm$ 73,74
<b>Albúminuria/creatinuria</b>	59,94 $\pm$ 118,76

## 2.2. Descriptivo de casos y controles

Como ya hemos expuesto, el subgrupo de 58 pacientes constituye un grupo casos y controles anidado dentro de la cohorte completa, donde consideramos casos a aquellos pacientes con presencia de PNP según criterios NDS (grupo 2, n=29) y controles a los pacientes con ausencia de PNP (grupo 1, n=29), ajustados por género, edad, IMC, HbA1c y función renal.

En la tabla 19 se presentan las características generales, clínicas y antropométricas de los casos y de los controles. Como puede observarse, los controles son similares a los casos en la distribución por grupos de edad, por sexo y por IMC, lo que indica la eficacia del emparejamiento respecto a dichos parámetros. No hubo una diferencia significativa de la distribución por sexos entre ambos grupos aunque puede observarse un predominio de varones frente a mujeres

Encontramos diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en el tiempo de evolución de la diabetes, del mismo modo que en la cohorte completa, los pacientes con presencia de PNP según criterios NDS presentaban una diabetes de más larga evolución.

También, como cabría esperar, se encontraron diferencias significativas en el test de monofilamento, de forma que el grupo con PNP presentó una mayor prevalencia en la prueba de monofilamento de SW alterada. Hubo diferencias significativas en la prevalencia de dislipemia entre ambos grupos, sin embargo, no se encontraron en la prevalencia de retinopatía aunque con una  $p$  de 0.06, y tampoco en las complicaciones macrovasculares, tanto en la prevalencia de cardiopatía isquémica como en el ITB, indicador de vasculopatía periférica.

Tabla 19: Características generales, clínicas y antropométricas de los casos y controles incluidos en el estudio de EO

	<b>Grupo 1 (n=29)</b>	<b>Grupo 2 (n=29)</b>
<b>Edad (años)</b>	65,93 ± 8,43	68,1 ± 6,9
<b>Sexo, n (%)</b>		
Hombre	21 (72)	19 (66)
Mujer	8 (28)	10 (34)
<b>Duración de la diabetes (años)</b>	9,69 ± 8,00	14,97 ± 11,77**
<b>PAS (mmHg)</b>	148,97 ± 15,63	151,03 ± 20,33
<b>PAD (mmHg)</b>	84,93 ± 10,65	79,48 ± 12,81
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	30,70 ± 5,31	31,49 ± 4,92
<b>Perímetro de cintura (cm)</b>	107,03 ± 9,98	109,66 ± 10,74
<b>Fumador activo, n (%)</b>		
Si	5 (17)	2 (7)
Ex-fumador	13 (45)	16 (55)
No	11 (38)	11 (38)
<b>Ingesta de alcohol, n (%)</b>		
Si	5 (17)	2 (7)
No	24 (83)	27 (93)
<b>Hipertensión, n (%)</b>	23 (79)	22 (76)
<b>Dislipemia, n (%)</b>	25 (86)	17 (59)*
<b>Tratamiento de dislipemia, n (%)</b>	21 (72)	16 (55)
<b>Retinopatía diabética, n (%)</b>	5 (17)	11 (38)†
<b>Test de monofilamento alterado</b>	9 (31)	22 (76)**
<b>Cardiopatía isquémica crónica, n(%)</b>	5 (17)	8 (28)
<b>ITB derecho</b>	0,88 ± 0,16	0,84 ± 0,18
<b>Antecedente de úlcera</b>	0 (0)	5 (15)
<b>Tratamiento sólo dieta</b>	3 (10)	1 (3)
<b>Tratamiento con ADOs</b>	18 (63)	14 (49)
<b>Tratamiento con insulina</b>	3 (10)	7 (24)
<b>Tratamiento con insulina+ADOs</b>	5 (17)	7 (24)

Significación estadística: \*p &lt; 0.05, \*\*p &lt; 0.01, †p=0.06

### **2.3. Estudio comparativo de los marcadores de estrés oxidativo y parámetros biológicos destacados entre casos y controles.**

Medimos el estrés oxidativo, como se expuso en el apartado de métodos, mediante la determinación de glutatión reducido y oxidado y su ratio GSH/GSSG, y de los niveles de malonildialdehído, cuyos resultados se presentan en la tabla 20, junto al resto de parámetros destacados.

Como podemos observar, no hay diferencias estadísticamente significativas en los niveles de HbA1c ni en el filtrado glomerular, por tanto asumimos que controles y casos son similares, lo que indica la eficacia del emparejamiento también respecto a dichos parámetros. Sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de GSH y su ratio GSH/GSSG ( $p < 0.05$ ) entre los dos grupos (figura 13), de forma que los pacientes con ausencia de PNP presentaron niveles mayores respecto a los pacientes con presencia de PNP grave, reflejando en estos un incremento del estrés oxidativo; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de MDA.

Por último, no encontramos diferencias significativas en el resto de parámetros biológicos expuestos, ni en el perfil lipídico, ni tampoco en los niveles de microalbuminuria.

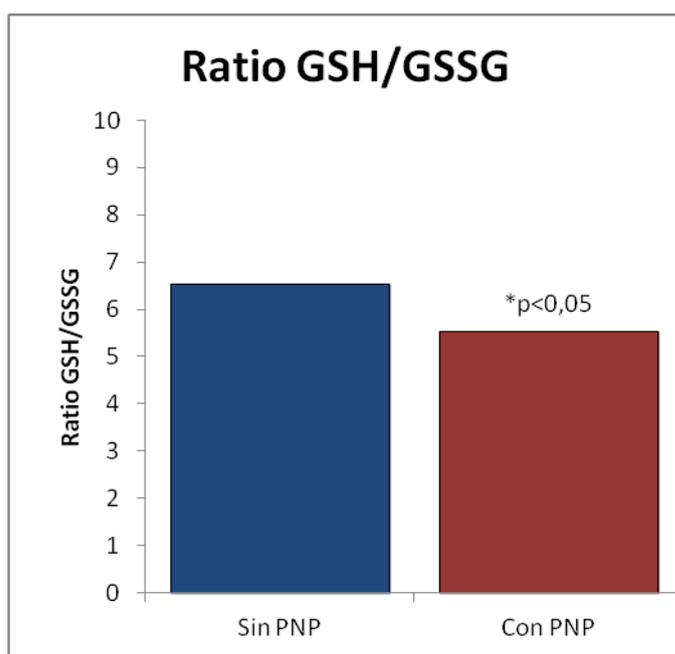
En el análisis de correlación encontramos que ni los niveles de GSH ni la ratio GSH/GSSG se correlacionaron de forma significativa con la edad, IMC, tiempo de evolución de la diabetes, ITB, ni con los niveles de glucemia, HbA1c, filtrado glomerular y el cociente albumina/creatinina en orina.

Tabla 20.-Comparativa de marcadores biológicos y EO de los casos y controles

	<b>Grupo 1 (n=29)</b>	<b>Grupo 2 (n=29)</b>
<b>GSH nmol/ml</b>	22,40 ± 2,57	18,35 ± 4,19*
<b>GSSG nmol/ml</b>	3,46 ± 0,29	3,35 ± 0,37
<b>GSH/GSSG</b>	6,52 ± 0,96	5,54 ± 1,41*
<b>MDA nmol/ml</b>	1,84 ± 0,16	1,78 ± 0,20
<b>Glucosa (mg/dl)</b>	152,04 ± 49,60	177,86 ± 53,52
<b>HbA1c (%)</b>	7,50 ± 1,69	7,89 ± 1,59
<b>Creatinina (mg/dl)</b>	0,99 ± 0,36	1,01 ± 0,43
<b>Filtrado glomerular (ml/min/hora)</b>	93,10 ± 36,67	90,20 ± 37,51
<b>CT (mg/dl)</b>	184,46 ± 40,31	185,79 ± 37,63
<b>TG (mg/dl)</b>	146,11 ± 78,76	147,41 ± 69,95
<b>HDL-c (mg/dl)</b>	48,82 ± 14,30	47,31 ± 8,76
<b>Albúmina/Creatinina orina</b>	35,60 ± 56,29	82,53 ± 153,80

Significación estadística: \*p < 0.05

Figura 13: Diferencia en la ratio GSH/GSSG entre pacientes con DM tipo 2 con y sin PNP según criterios NDS.



## V. DISCUSIÓN



## 1. Importancia del estudio.

La polineuropatía diabética, presente tanto en la diabetes tipo 1 como en el tipo 2<sup>4</sup>, es, sin duda, la complicación microvascular con un mayor efecto deletéreo tanto en la supervivencia como en la calidad de vida del diabético<sup>5,6</sup>. Nuestro trabajo de investigación ha usado una definición de PNP similar a la de otros protocolos<sup>14,15</sup>, y un 37% de los pacientes presentaron PNP, siendo > 40% moderada-grave, frecuencia similar a la observada en otros estudios<sup>13,82,83</sup>.

Existen varias razones por las que su estudio, y sobre todo, de los posibles mecanismos fisiopatológicos implicados en su aparición y desarrollo, tiene un especial interés. La primera es la gran variabilidad clínica, aunque la mayoría de los pacientes llegarán a presentar algún tipo de alteración sensitiva y/o dolor<sup>84</sup> se estima que casi la mitad permanecerán asintomáticos durante un tiempo prolongado y sin embargo, en riesgo de sufrir lesiones o traumas en sus pies que deriven en consecuencias tan graves como la amputación<sup>4</sup>. La segunda es que se ha observado una incidencia casi tan elevada en pacientes sin diagnóstico previo de diabetes como en aquellos con diagnóstico establecido<sup>9,10</sup>, sugiriendo un mecanismo fisiopatológico ya presente durante la fase silente de la diabetes. Por último, la irreversibilidad para la neuropatía establecida, junto al hecho de disponer únicamente de tratamientos sintomáticos con reducida efectividad para evitar su progresión.

En el presente trabajo se estudia la relación de la presencia y grado de PNP con factores clásicos, algunos de ellos modificables, pero se da un nuevo paso en la búsqueda de factores más novedosos con el estudio de los niveles de homocisteína plasmática en un amplio grupo de población diabética con y sin PNP y, además, en un subgrupo de pacientes, hemos valorado la relación de la presencia de PNP con el estrés

oxidativo, ambos factores propuestos por varios autores como posibles dianas terapéuticas<sup>29, 85</sup>.

## **2. Asociación de factores clásicos con la presencia y gravedad de la neuropatía diabética.**

Nuestro trabajo de investigación, al igual que en estudios previos, ha mostrado como, tanto la presencia de PNP, evaluada por la prueba del monofilamento de SW alterada, como el grado de la misma según criterios NDS se asocian con mayor edad, duración de la diabetes y peor grado de control glucémico, así como con la coexistencia de otras complicaciones microvasculares, como la retinopatía y la nefropatía<sup>7,10,25</sup>.

La edad y la duración de la diabetes son 2 factores no modificables, no así los niveles de HbA1c, reflejo del grado de control metabólico, que en nuestro estudio predijeron, por cada incremento de un 1%, un 28% de riesgo de presentar PNP, e igualmente se asoció con el grado de PNP; datos acordes a otros estudios donde las cifras elevadas de la HbA1c se asociaron de forma independiente con la presencia y progresión de la PNP tanto en DM tipo 1<sup>86</sup> como tipo 2<sup>87,88</sup>. Además, el tratamiento intensivo para la optimización de la HbA1c evita la progresión de la PNP, como demostraron los estudios DCCT y UKPDS<sup>26,27</sup>, mejorando sensibilidad vibratoria y velocidad de conducción nerviosa<sup>89</sup>, aunque los datos sugieren un menor beneficio para los DM tipo 2 y una irreversibilidad para la neuropatía establecida a pesar de una mejoría del control metabólico y de factores de riesgo vascular<sup>28</sup>.

No observamos una asociación con factores de riesgo vascular como el tabaquismo, la hipertensión y la obesidad, valorada según el IMC. Sin embargo, los

niveles de tensión arterial sistólica se relacionaron de forma significativa con el grado de PNP. También, la presencia de dislipemia, su tratamiento y el perfil lipídico se asociaron de forma significativa con el grado de PNP, de forma que los pacientes con mayor afectación neuropática presentaban en su historial clínico antecedentes de dislipemia, en su mayoría en tratamiento hipolipemiente, y unos niveles más elevados de LDL, apo B y triglicéridos, pero solo los últimos se relacionaron también con su presencia según el test de monofilamento de SW. Es probable que la discrepancia con resultados previos de nuestro grupo de trabajo<sup>42</sup> sean debidos a tamaño poblacional y que a pesar de dichas diferencias entre grupos, los valores medios se mantenían en todos ellos dentro de los rangos recomendados gracias a tratamiento dietético y farmacológico.

También existen discrepancias en la asociación de la PNP con otros factores de riesgo cardiovascular en diferentes estudios<sup>25,87,90</sup>, en probable relación a la diversidad de los criterios de selección usados como a la heterogeneidad de factores genéticos, dietéticos, etc.. de los grupos de población estudiados. Así en la prolongación del estudio EURODIAB realizado en una amplia población de DM tipo 1<sup>91</sup> la incidencia de PNP se asoció tanto al peso, tabaco, dislipemia (niveles altos de triglicéridos y bajos de cHDL) como a la hipertensión, aunque esta última solo si se incluía la neuropatía autonómica. Sin embargo, en estudios de población con DM tipo 2 o cuando se incluyen ambos tipos de diabetes, mientras algunos autores no encuentran una asociación de la PNP con la presencia de hipertensión o el peso pero sí con el consumo de tabaco y un perfil lipídico alterado<sup>10</sup>, en otros estudios no se observó una asociación con el tabaco<sup>87,92</sup> o el peso<sup>92</sup>, o incluso con ninguno de los factores de riesgo cardiovascular habituales<sup>88</sup>.

Por otra parte, y como cabría esperar, hemos encontrado que la presencia y grado de PNP se relaciona con una mayor prevalencia de otras complicaciones microvasculares como la retinopatía y la nefropatía, esta última puesta de manifiesto por una mayor presencia de microalbuminuria y una caída del filtrado glomerular, resultados similares a otros estudios<sup>10,88</sup>, sugiriendo la existencia de factores fisiopatológicos de daño del endotelio vascular y celular comunes, y la necesidad de identificar a grupos de pacientes diabéticos de alto riesgo<sup>24</sup>. Sin embargo, a diferencia de otros autores<sup>88,91</sup>, en nuestro estudio no hubo una asociación con complicaciones macrovasculares como la cardiopatía isquémica ni con la vasculopatía periférica, ya que en ningún caso se apreció diferencias significativas en el ITB entre los diferentes grupos.

Por último, observamos que los pacientes con presencia y mayor grado de PNP tenían una mayor prevalencia de tratamiento con insulina, resultados acorde a otros estudios<sup>90,92</sup>, probablemente por un mayor deterioro tanto de la función pancreática en relación al mayor tiempo de evolución como de la función renal que condiciona el inicio de insulinización en estos pacientes.

En conclusión, hemos visto que la optimización del control metabólico, que aún supone un reto en un alto porcentaje de pacientes a pesar de la introducción de nuevas líneas de tratamiento hipoglucemiante, y posiblemente la detección y control de otros factores de riesgo cardiovascular pueden evitar o al menos retrasar la progresión de PNP; sin embargo, aún con niveles de HbA1c <7% y corto tiempo de evolución de la diabetes se desarrollan complicaciones microvasculares sugiriendo la presencia de otros mecanismos patogénicos<sup>25</sup>.

### **3. Asociación entre la presencia y gravedad de neuropatía diabética con los niveles de homocisteína plasmática.**

Siguiendo la búsqueda de nuevos factores patogénicos de la neuropatía diabética, en nuestro estudio hemos encontrado cómo otro factor modificable, las concentraciones elevadas de homocisteína plasmática, se relacionaron con la presencia y grado de PNP. Además, en el caso de la presencia de PNP, evaluada por la prueba alterada del monofilamento de SW, esta asociación se mantuvo al incluir en el análisis multivariante potentes predictores conocidos como la edad, el sexo, el tiempo de evolución de la diabetes, el grado de control glucémico, el tabaquismo, la ingesta de alcohol y el aclaramiento renal.

La asociación entre hiperhomocistinemia y complicaciones macrovasculares está claramente establecida, así hoy es considerada un factor de riesgo para la enfermedad cardiovascular<sup>31,93</sup> y la enfermedad arterial periférica<sup>33,94,95</sup>, aunque con diferencias entre géneros<sup>34,96</sup>. Diferentes estudios han relacionado los valores elevados de homocisteína plasmática con la angiopatía, en relación a lesión del endotelio vascular mediado por un incremento del EO, la activación de mediadores inflamatorios de la pared vascular, la alteración de la función plaquetaria y una disminución de la producción de NO y la consiguiente vasoconstricción, siendo la homocisteína un potente factor de disfunción endotelial y lesión macrovascular<sup>31,43</sup> pero también microvascular<sup>44</sup>. Así, estas lesiones vasculares producidas por arteriosclerosis oclusiva de pequeños vasos pueden producir isquemia en la vaina de mielina, contribuyendo a desarrollar la lesión del nervio periférico. Además, estudios in vitro han mostrado un efecto neurotóxico directo de la hiperhomocisteinemia<sup>44,45</sup>, posiblemente mediado por el estrés oxidativo<sup>44</sup>. Estas

alteraciones relacionadas con niveles elevados de homocisteína podrían explicar los resultados de nuestro estudio al asociarse con el daño del tejido nervioso periférico.

En este sentido, apoyando nuestros resultados, diferentes estudios epidemiológicos han mostrado cómo en pacientes con DM tipo 2 existía una asociación independiente de las concentraciones elevadas de homocisteína con la presencia de neuropatía<sup>10,35</sup>, de forma que el riesgo de neuropatía se duplicaba para valores de homocisteína de 13  $\mu\text{mol/l}$  frente a niveles de 9  $\mu\text{mol/l}$ , así por cada 5  $\text{mmol/l}$  de incremento de la homocisteína sérica la odds ratio (OR) para PNP fue de 2,6. Resultados similares han sido publicados por nuestro grupo de trabajo, encontrando que por cada incremento de 1  $\mu\text{mol}$  en plasma de homocisteína hubo un aumento del 23% del riesgo de polineuropatía en diabéticos tipo 2<sup>42</sup>. Recientemente, en población asiática, se ha encontrado una asociación similar de las concentraciones de homocisteína con la PNP evaluada por criterios clínicos y confirmada con criterios electrofisiológicos<sup>97</sup>. No todos los autores han obtenido resultados similares; un subanálisis del estudio Hoorn no encontró una asociación entre niveles altos de homocisteína y neuropatía tras ajustar por factores de riesgo conocidos<sup>98</sup>, tampoco se consiguió establecer dicha asociación en otros trabajos<sup>36,37</sup>. Sin embargo, podemos decir que existen suficientes evidencias clínicas y experimentales en la actualidad que apoyan la asociación entre concentraciones elevadas de homocisteína y la presencia y desarrollo de PNP.

Del mismo modo, esta asociación se ha observado con otras complicaciones crónicas microvasculares tanto en DM tipo 1<sup>38</sup> como tipo 2<sup>39</sup>, lo que apoya la existencia de un mecanismo común mediado por la lesión de la microcirculación<sup>99</sup>. Así los niveles de homocisteína plasmática se han asociado de forma independiente a la presencia de microalbuminuria, marcador de nefropatía incipiente<sup>100,101</sup>, también con la presencia de

retinopatía con una OR para hiperhomocistinemia de 4,24 y 1,16 para retinopatía proliferativa y no proliferativa, respectivamente<sup>102,103</sup>.

Por otro lado, nuestro grupo publicó recientemente cómo las concentraciones elevadas de homocisteína plasmática se asociaron de forma independiente con la presencia de úlcera en el pie diabético<sup>40</sup>. En este sentido, es también explicable cómo estos valores elevados de homocisteína se asociaron con el más potente predictor de riesgo de ulceración, como es la prueba alterada del monofilamento de SW<sup>16</sup>.

Aunque algunos autores plantean que la hiperhomocistinemia podría tratarse de un mero marcador más que de una diana terapéutica, pensamos que nuestros resultados tienen un importante valor clínico.

En primer lugar, porque se ha mostrado cómo fármacos comúnmente usados en el tratamiento de la DM tipo 2 pueden elevar las concentraciones plasmáticas y séricas de la homocisteína y empeorar la PNP. Así, la metformina puede incrementar la homocisteína y agravar la PNP<sup>104</sup>. Además, en el estudio FIELD, los fibratos elevaron la homocisteína, sin que se sepa cuál puede ser la consecuencia en estos pacientes tratados a medio-largo plazo<sup>105,106</sup>. No recogimos en nuestro estudio la toma de fibratos y/o estatinas, que fue categorizada en el protocolo de recogida de datos como tratamiento de la dislipidemia, lo que limita la interpretación de los resultados en este sentido. Son necesarios estudios dirigidos para adecuar la selección de fármacos en el paciente diabético, reduciendo sus potenciales efectos colaterales.

En segundo lugar, porque las concentraciones plasmáticas de homocisteína son fácilmente modificables con suplementos vitamínicos e intervenciones dietéticas. La ingesta diaria de 400 mg de ácido fólico, 2,4 mg de vitamina B12 y 1,7 mg de vitamina B6 se asoció con valores normales-bajos de homocisteína en la población general<sup>107</sup>. Varios ensayos clínicos con suplementos de vitamina B12 y/o ácido fólico a dosis altas

han fallado en demostrar un efecto beneficioso en la prevención de enfermedad cardiovascular<sup>108</sup> y cerebrovascular<sup>109</sup>, o en la progresión de complicaciones microvasculares como la nefropatía<sup>110</sup>, a pesar de lograr un descenso de los niveles plasmáticos de homocisteína posiblemente en relación a la presencia de factores de confusión y/o un número pequeño de pacientes que reduce la potencia estadística de los resultados<sup>111</sup>. Sin embargo, diversos estudios con triple asociación de ácido fólico-B12-B6 han mostrado una mejoría en el control del dolor neuropático en el paciente diabético<sup>112</sup>, e incluso de la sensibilidad tras 1 año de tratamiento<sup>113</sup>, objetivada por el incremento de densidad de fibra nerviosa en biopsia cutánea<sup>114</sup>. Recientemente se han propuesto otras estrategias diferentes a los suplementos vitamínicos a través del aumento de la eliminación renal de homocisteína o su conversión hepática a cisteína<sup>115,116</sup>.

Por tanto, nuestros resultados y los obtenidos por otros autores apoyarían la idea de recomendar dietas, como la mediterránea, con alimentos ricos en estos micronutrientes en pacientes con DM tipo 2, si bien son necesarios más estudios de intervención nutricional o con suplementos farmacológicos de estos micronutrientes que apoyen su introducción en protocolos de manejo clínico de la PNP.

#### **4. Asociación de marcadores de EO con la presencia de PNP.**

Otro de los mecanismos fisiopatológicos implicados en la aparición y desarrollo de la neuropatía diabética que ha cobrado fuerza en los últimos años es el incremento del estrés oxidativo. Aunque ninguna teoría es capaz de explicar por sí sola la patogenia de la PNP, se ha propuesto como punto de partida clave para la activación de todas las otras vías implicadas en la patogénesis de las complicaciones diabéticas a un único

proceso: la sobreproducción de especies reactivas (ROS) a nivel mitocondrial y en consecuencia, el incremento de EO, inducida por la oxidación intracelular de los niveles elevados de glucosa en el paciente diabético<sup>48</sup>. En este sentido, altos niveles de peroxinitrato y otros radicales libres fueron encontrados tanto en fluidos biológicos como en leucocitos de pacientes diabéticos en comparación con sujetos sanos<sup>67,117</sup>. Además en el paciente diabético, este incremento de EO no sólo está asociado con una sobreproducción de ROS, sino también con un descenso en la efectividad de las defensas antioxidantes o ambos.

La célula neuronal donde la entrada de glucosa es dependiente de la concentración transmembrana sería más sensible a la hiperglucemia y el incremento subsecuente de EO. Este incremento en la generación de ROS por la cadena de electrones mitocondrial tales como superóxido, peróxido de hidrogeno y radicales hidroxilo serían la causa de la oxidación y modificación de proteínas, ácidos nucleicos y membranas lipídicas celulares, que resultaría en la lesión de estructuras neuronales y su deterioro funcional<sup>61,118</sup>. Un insuficiente mecanismo celular antioxidante parece estar también relacionado con el daño neural<sup>61,68</sup>.

En nuestro estudio, hemos encontrado en un subgrupo de 58 pacientes diabéticos tipo 2 un descenso significativo de los niveles de GSH y de la ratio GSH/GSSG en aquellos que presentaban PNP frente al grupo sin afectación neuropática. Para evitar factores de confusión los pacientes fueron ajustados por género, edad, IMC, HbA1c y función renal, parámetros todos ellos conocidos por su influencia en los niveles de estrés oxidativo. Además, esta diferencia se mantuvo en el análisis de correlación ya que ni los niveles de GSH, ni la ratio GSH/GSSG se correlacionaron de forma significativa con la edad, IMC, tiempo de evolución de la diabetes, ITB, niveles de glucemia, HbA1c, homocisteína, creatinina, filtrado glomerular y cociente

albúmina/creatinina en orina. El glutatión reducido forma parte del sistema de defensa frente a las ROS ya que su función celular más importante es como antioxidante hidrosoluble reduciendo el exceso de peróxido de hidrógeno mediante la enzima glutatión peroxidasa<sup>119</sup>, además interviene en un gran número de reacciones de detoxificación celular<sup>120,121</sup>. Su síntesis a nivel neuronal depende del aporte por parte de las glía de la glutamylcisteína sintetasa lo que puede hacerlas más sensible a su depleción<sup>122,123</sup>.

Aunque con resultados heterogéneos, posiblemente por la falta de homogeneidad en los marcadores de estrés oxidativo valorados y/o en los criterios diagnósticos utilizados, diversos estudios a nivel clínico apoyan nuestros resultados. El-Boghdady y Badr<sup>69</sup> encontraron un incremento de la actividad oxidativa plasmática global en pacientes diabéticos con PNP frente a aquellos sin PNP, y un descenso significativo de glutatión en eritrocitos de pacientes diabéticos con y sin PNP frente a sujetos sanos. Sin embargo, Kasznicki et al<sup>68</sup> no encontraron diferencias significativas en la actividad oxidativa global, a pesar de observar una menor actividad de diversas enzimas antioxidantes tales como la catalasa, la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa en pacientes diabéticos con PNP tras ajustar diversos factores de confusión, similar a nuestro trabajo, quizás por depender aquella tanto de la actividad enzimática antioxidante como de la depleción de múltiples sustancias llamadas “scavengers” o antioxidantes naturales, como vitaminas A, C, E, tocoferoles, etc... Por otra parte, observaron un aumento significativo de ADN oxidado en los linfocitos de diabéticos con PNP, comparado con pacientes diabéticos sin PNP y el grupo control, siendo más susceptibles a daño inducido por peróxido de hidrógeno en su ADN, sugiriendo una protección antioxidante insuficiente; estas mismas alteraciones se han relacionado con un peor control metabólico<sup>124</sup> y con patología macrovascular<sup>125</sup>. Este incremento de

marcadores de EO y la presencia de ADN oxidado se ha encontrado incluso en sujetos con intolerancia hidrocarbonada y/o diabetes de reciente diagnóstico sugiriendo un círculo vicioso que conduce al deterioro progresivo celular en la diabetes<sup>126,127</sup>.

No encontramos en nuestro estudio una diferencia significativa entre pacientes con y sin PNP de otro marcador de EO, en este caso de un marcador de oxidación lipídica, la malondialdehído. La MDA es un producto de la oxidación de los ácidos grasos<sup>128</sup>, y tras la introducción de métodos más sensibles y específicos para su determinación<sup>81</sup> es uno de los parámetros utilizados para valorar en fluidos biológicos el incremento del EO y sus consecuencias<sup>63,129</sup>. Los productos de oxidación lipídica y concretamente la MDA se ha encontrado elevada en pacientes diabéticos<sup>130,131</sup> y se ha relacionado sobre todo con la presencia de complicaciones macrovasculares<sup>132,133</sup>, pero también algunos autores han reportado su relación con complicaciones microvasculares<sup>134</sup>, y concretamente con la presencia de PNP<sup>69</sup>. La ausencia de diferencias significativas de los niveles de MDA en nuestro estudio podría justificarse por el reducido tamaño muestral o por el hecho de que tampoco hubiesen diferencias significativas en antecedentes y/o presencia de complicaciones macrovasculares,

Estos hallazgos clínicos que orientan a un incremento del EO como base patogénica de la lesión neural y el desarrollo de neuropatía en el paciente diabético son ampliamente sustentados por estudios en modelos animales tanto de tipo 1 como 2<sup>135</sup>. Se ha observado una pérdida de potencial antioxidante en nervio ciático de ratas diabéticas<sup>136,137</sup> y un incremento de productos de estrés oxidativo en los nervios periféricos y su glía, raíces dorsales y en las células endoteliales en presencia de hiperglucemia mantenida<sup>64,138,139</sup>, lo que se ha asociado a mielopatía, vacuolización mitocondrial, y finalmente apoptosis de neuronas y de células gliales de soporte<sup>65</sup>. En un reciente estudio se ha propuesto la carbonilación proteica de la mielina inducida por

el EO y su modificación estructural y agregación observada en roedores con DM tipo 2, como mecanismo clave implicado en los déficits de conducción, deterioro neurotrófico y anormalidades morfológicas de la mielina en el nervio periférico presentes en la PNP<sup>140</sup>. También la intolerancia hidrocarbonada se ha relacionado con elevación de ROS y lesión neural puesta de manifiesto por el enlentecimiento de la velocidad de conducción sensitivo-motora<sup>141</sup>, lo que apoya la hipótesis del inicio precoz de las alteraciones que conducen a la lesión neural de la neuropatía diabética. Por otra parte, en estudios *in vitro* en cultivos de células neuronales de ganglios de raíces dorsales expuestos a un medio hiperglucémico, se ha encontrado una asociación entre la producción de ROS, despolarización mitocondrial y muerte celular<sup>142</sup>, y algunos autores han sugerido que incluso picos hiperglucémicos serían suficientes para generar EO y daño neuronal<sup>66,143</sup>.

La detección del incremento de EO, con diana en la mitocondria, en fases tempranas de la diabetes junto a la irreversibilidad de las complicaciones, y en particular de la neuropatía, han sugerido la posibilidad de una disregulación de la función mitocondrial a nivel transcripcional en respuesta a la hiperglucemia, provocando mutaciones del mtADN, que a su vez influirían en la codificación nuclear<sup>58</sup>. Diversos estudios han observado alteraciones en la metilación del ADN en pacientes diabéticos y con intolerancia a la glucosa<sup>144,145</sup>; apoyando la hipótesis de un papel fundamental de los llamados fenómenos epigenéticos, mediados por la modificación de histonas y metilación de ADN, que sin afectar directamente a su secuenciación, y considerados al menos parcialmente reversibles, producirían una disregulación de la expresión genética, incluyendo genes implicados en el mantenimiento del control glucémico que junto al deterioro de procesos de reparación del ADN, mutaciones e inestabilidad cromosómica perpetuarían los mecanismos fisiopatológicos de la diabetes y sus complicaciones<sup>146,147</sup>.

Se plantea, por tanto, una potencial “memoria metabólica”, parcialmente reversible, mediada por el exceso de ROS y especies de nitrógeno, en particular originadas a nivel de proteínas mitocondriales glicosiladas, quizás actuando unas y otras para mantener la señalización en la generación de estrés<sup>59</sup>. Un reciente estudio ha demostrado una alteración del ADN metilado y un aumento de ROS en células de Schwann en situación de hiperglucemia<sup>148</sup>, reforzando la hipótesis de la presencia de esta memoria metabólica también a nivel neuronal, pudiendo atribuir a ésta, al menos en parte, la irreversibilidad de la neuropatía una vez establecida.

De todo lo expuesto surge de nuevo el interés clínico de nuestro estudio centrado en la necesidad de una precoz detección de los pacientes diabéticos en riesgo de desarrollar PNP, mediante la monitorización de la reserva antioxidante, y el uso temprano de nuevas alternativas terapéuticas centradas esta vez en la reducción de ROS y la glicosilación, o como sugiere nuestro trabajo y el de otros autores, en incrementar los niveles de GSH considerado el antioxidante tisular más importante, además de mantener un óptimo control metabólico para minimizar sus complicaciones<sup>60</sup>.

Como comentamos en la introducción, diversos autores han estudiado el efecto sobre la prevención y desarrollo de la neuropatía de una extensa lista de sustancias con efecto antioxidante<sup>61</sup>. Una de las más prometedoras es el ácido lipoico, que transformado en su forma activa a nivel celular, es capaz de regenerar a otros antioxidantes como la vitamina C, E y la GSH; in vitro ha demostrado que puede revertir el EO y la apoptosis neuronal<sup>66</sup> y en estudios experimentales, como suplemento alimenticio, mantiene la velocidad de conducción nerviosa y el flujo sanguíneo a nivel del nervio periférico<sup>149</sup>. Sin embargo, ha presentado resultados dispares en su aplicación clínica; administrado de forma endovenosa durante 3 semanas consigue una relevante reducción de los síntomas de PNP en un número significativo de pacientes<sup>150</sup>, pero aún

es incierta su efectividad a largo plazo o administrado de forma oral<sup>70,71</sup>. Otras sustancias naturales conocidas por sus efectos antioxidantes han despertado interés en los últimos años, como la curcumina, procedente de una planta rizomatosa y utilizada como colorante alimentario, es también capaz de reducir el EO al inducir a la enzima antioxidante glutatión transferasa con resultados positivos en complicaciones oftalmológicas como la catarata diabética, proponiéndose su uso en la prevención de la neuropatía y otras complicaciones microvasculares<sup>151</sup>. La suplementación con Zinc también ha demostrado mejorar la lesión neural a nivel experimental al reducir la peroxidación lipídica y el EO<sup>151</sup>, sin embargo, la suplementación con vitaminas E y C y otros antioxidantes naturales no han logrado demostrar su correlación con la evolución o la incidencia de neuropatía diabética<sup>61</sup>. Por otra parte, la investigación de fármacos que modulen el EO tiene abiertas múltiples líneas; la inhibición de la enzima aldosa reductasa en la vía de los polioles ha demostrado mejorar la velocidad de conducción y la función neuronal a nivel experimental<sup>153</sup> pero su eficacia y seguridad a nivel clínico sigue pendiente de confirmación<sup>154</sup>. Otros prometedores candidatos con diversas líneas de acción farmacológica: acción mimética de enzimas antioxidantes, inhibición de proteinquinasas, polimerasa u oxidasas y más recientemente la terapia génica siguen en estudio<sup>29,85</sup>, sin olvidar que mientras esperamos sus resultados disponemos de fármacos como estatinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y los inhibidores directos de la angiotensina que han demostrado reducir la generación de ROS intracelular y en este sentido sus efectos beneficiosos en pacientes diabéticos podría deberse a esta propiedad<sup>85</sup>.

Las limitaciones de nuestro trabajo son, por un lado, que al tratarse de un estudio de casos y controles no es posible establecer con seguridad la asociación etiológica entre la PNP y los diferentes factores evaluados, los niveles de homocisteína plasmática

y de estrés oxidativo, que en el caso de éste último se ve dificultado por un n bajo al tratarse de casos y controles anidados con necesidad de ajuste por diversos factores de confusión. Por otro lado, no se han realizado pruebas complementarias diagnósticas de la PNP como son los estudios electrofisiológicos, por lo que tenemos que asumir que la prueba del monofilamento tiene limitaciones en cuanto a su uso como prueba diagnóstica de la PNP, puesto que solo evalúa la sensación de presión, del mismo modo que la valoración de las diferentes sensibilidades que abarcan los criterios NDS no están exentas del sesgo del examinador y del paciente.

...



## **VI. CONCLUSIONES**



Con los resultados obtenidos en nuestro estudio establecemos las siguientes conclusiones:

1. Existe una asociación, estadísticamente significativa, entre la presencia y grado de PNP en los pacientes con DM tipo 2 con la edad, duración de la diabetes, función renal y control glucémico, es decir, los llamados factores clásicos. De esta asociación se deriva la importancia de un diagnóstico precoz de la diabetes y la optimización del control metabólico desde su inicio.

Hay una asociación entre la presencia y grado de PNP en los pacientes con DM tipo 2 con la presencia de otras complicaciones microvasculares como la retinopatía y la nefropatía, poniendo de manifiesto la existencia de mecanismos fisiopatológicos comunes.

2. Existe una correlación, estadísticamente significativa e independiente, de las concentraciones de homocisteína plasmática con la presencia de PNP evaluada por la prueba del monofilamento SW y una asociación con el grado de PNP en pacientes con DM tipo 2. Hay mecanismos fisiopatológicos que podrían explicar estos resultados. Este nuevo predictor podría facilitar la prevención y tratamiento precoz de la PNP, además es un factor biológico fácilmente modificable por varias vías, por lo que sería interesante ensayar intervenciones preventivas de la PNP.

3. Por último, hemos encontrado en un subgrupo de pacientes la existencia de una correlación significativa entre la presencia de PNP y una disminución de la ratio GSH/GSSG, reflejo de un aumento del EO. Existen mecanismos fisiopatológicos que podrían explicar estos resultados, aportando nuevas alternativas terapéuticas. Nuevos

estudios prospectivos son necesarios para clarificar el papel del EO en el desarrollo del daño neural y la PNP.

Por ello nuestra **Tesis** es:

**Existe un asociación entre estrés oxidativo y niveles plasmáticos de homocisteína con la presencia de polineuropatía en la diabetes tipo 2**

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**



1. IDF International Diabetes Federation (2013). Diabetes Atlas. 6ª edición. (en <http://www.idf.org/diabetesatlas>)
2. Soriguer F, Goday A, Bosch-Comas A, Bordiú E, Calle-Pascual A, Carmena R, et al. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia*. 2012; 55 (1):88-93.
3. Catalá M, Girbés J. Estudio Valencia: Investigación de la prevalencia de diabetes mellitus y síndrome metabólico. Plan de Diabetes de la Comunitat Valenciana 2006-2010. Ed. 2010: Generalitat Valenciana. Conselleria de Sanitat. ISBN: 978-84-482-3917-6.
4. Boulton AJM, Vinik AI, Arezzo JC, Feldman EI, Freeman R, Malik RA, et al. Diabetic neuropathies. *Diabetes Care* 2005; 28 (4): 956–62
5. Coppini DV, Bowtell PA, Weng C, Young PJ, Sonksen PH. Showing neuropathy is related to increased mortality in diabetic patients—a survival analysis using an accelerated failure time model. *J Clin Epidemiol* 2000; 53 (5): 519–23
6. Argoff CE, Cole BE, Fishbain DA, Irving GA. Diabetic peripheral neuropathic pain: clinical and quality-of-life issues. *Mayo Clin Proc* 2006; 81 (4 Suppl): S3–S11
7. Pascuzzi RM. Peripheral neuropathy. *Med Clin North Am* 2009; 93 (2):317-42
8. Partanen J, Niskanen L, Lehtinen J, Mervaala E, Siitonen O, and Uusitupa M. Natural history of peripheral neuropathy in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1995; 333 (2):89-94.
9. Gregg EW, Gu Q, Williams D, de Rekeneire N, Cheng YJ, Geiss L, et al. Prevalence of lower extremity diseases associated with normal glucose levels, impaired fasting

glucose, and diabetes among U.S. adults aged 40 or older. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007;77 (3): 485-8.

10. Bruce SG, Young TK. Prevalence and Risk Factors for Neuropathy in a Canadian First Nation Community. *Diabetes Care* 2008, 31(9):1837-41.

11. Mulder DW, Lambert EH, Bastron JA, Sprague RG. The neuropathies associated with diabetes mellitus. A clinical and electromyographic study of 103 unselected diabetic patients. *Neurology* 1961; 11(4) Pt 1:275-84.

12. Consensus statement: Report and recommendations of the San Antonio conference on diabetic neuropathy. American Diabetes Association American Academy of Neurology. *Diabetes Care* 1988; 11 (7):592-7.

13. Young MJ, Boulton AJ, MacLeod AF, Williams DR, Sonksen PH. A multicentre study of the prevalence of diabetic peripheral neuropathy in the United Kingdom hospital clinic population. *Diabetologia* 1993; 36 (2):150-4.

14. Boulton AJ. Guidelines for diagnosis and outpatient management of diabetic peripheral neuropathy. European Association for the Study of Diabetes, *Neurodiab. Diabetes Metab.* 1998 Nov; 24 Suppl 3:55-65

15. Feng Y, Schlösser FJ, Sumpio BE. The Semmes Weinstein monofilament examination as a screening tool for diabetic peripheral neuropathy. *J Vasc Surg* 2009 Sep; 50 (3):675-82.

16. Feng Y, Schlösser FJ, Sumpio BE. The Semmes Weinstein monofilament examination is a significant predictor of the risk of foot ulceration and amputation in patients with diabetes mellitus. *Journal of Vascular Surgery* 2011; 53 (1): 220-26.

17. Lavery LA, Armstrong DG, Vela SA, Quebedeaux TL, Fleisschli JG. Practical criteria for screening patients at high risk of diabetic foot ulceration. *Arch Intern Med* 1998; 158 (2):157-62
18. Boulton AJM: The diabetic foot. In *Textbook of Diabetic Neuropathy*. Gries FA, Cameron NE, Low PA, Ziegler A, Eds. New York, Thieme, 2003, p. 295–305
19. Ulbrecht JS, Cavanagh PR, Caputo GM: Foot problems in diabetes: an overview. *Clin Infect Dis* 2004; 39 (Suppl.2): S73–S82.
20. Richard JL, Schuldiner S. Epidemiology of diabetic foot problems. *Rev Med Interne*. 2008; 29 (Suppl. 2): S222-30.
21. Bouter KP, Storm AJ, de Groot RR, Uitslager R, Erkelens DW, Diepersloot RJ. The diabetic foot in Dutch hospitals: epidemiological features and clinical outcome. *Eur J Med*. 1993;2 (4) :215-8.
22. Driver VR, Fabbi M, Lavery LA, Gibbons G. The costs of diabetic foot: the economic case for the limb salvage team. *J Vasc Surg*. 2010; 52 (3 Suppl): 17S-22S.
23. Pecoraro R, Reiber G, Burgess E. Pathways to diabetic limb amputation: a basis for prevention. *Diabetes Care* 1990; 13 (5): 513-21.
24. Calle-Pascual AL, Durán A, Benedí A, Calvo MI, Charro A, Díaz JA, et al. A preventative foot care programme for people with diabetes with different stages of neuropathy. *Diabetes Res Clin Pract*. 2002 Aug; 57(2):111-7.
25. Tesfaye S, Selvarajah D. Advances in the epidemiology, pathogenesis and management of diabetic peripheral neuropathy. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2012; 28(Suppl. 1): 8–14.

26. The diabetes Control and complications Trial Research group. Factors in the development of diabetic neuropathy: baseline analysis of neuropathy in the feasibility phase of the diabetes complications trial (DCCT). *Diabetes* 1988; 37 (4): 476-81.
27. UKPDS Group: Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998; 352 (9131): 837-53.
28. Coppini DV, Spruce MC, Thomas P, Masding MG. Established diabetic neuropathy seems irreversible despite improvements in metabolic and vascular risk markers a retrospective case-control study in a hospital patient cohort. *Diabet Med*. 2006; 23 (9): 1016-20.
29. Mahmood D, Singh BK, Akhtar M. Diabetic neuropathy: therapies on the horizon. *J Pharm Pharmacol*. 2009; 61 (9): 1137-45.
30. de Luis D, Fernández N, Aller R. Homocysteine in patients with diabetes mellitus. *Med Clin (Barc)*. 2004 Jan 17;122(1):27-32.
31. Fanapour PC, Yug B, Kochar MS. Hyperhomocysteinemia: an additional cardiovascular risk factor. 1999; 98 (8): 51-4.
32. Stanger O, Herrmann W, Pietrzik K, Fowler B, Geisel J, Dierkes J, et al. DACH-LIGA Homocystein e.V. DACH-LIGA homocystein (german, austrian and swiss homocysteine society): consensus paper on the rational clinical use of homocysteine, folic acid and B-vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases: guidelines and recommendations. *Clin Chem Lab Med*. 2003; 41 (11): 1392-403.
33. Allison MA, Criqui MH, McClelland RL, Scott JM, McDermott, Liu K, et al. The effect of novel cardiovascular risk factors on the ethnic-specific odds for peripheral

arterial disease in the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA). *J Am Coll Cardiol* 2006; 48 (6): 1190-7.

34. Garofolo L, Barros N Jr, Miranda F Jr, D'Almeida V, Cardien LC, Ferreira SR Association of increased levels of homocysteine and peripheral arterial disease in a Japanese-Brazilian population. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2007; 34(1): 23-8.

35. Ambrosch A, Dierkes J, Lobmann R, Kühne W, König W, Luley C et al. Relation between homocysteinaemia and diabetic neuropathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetic Medicine* 2001; 18 (3), 185-92.

36. De Luis DA, Fernández N, Arranz ML, Aller R, Izaola O, Romero E. Total homocysteine levels relation with chronic complications of diabetes, body composition, and other cardiovascular risk factors in a population of patients with diabetes mellitus type 2. *J Diabetes Complications.* 2005; 19 (1): 42-6.

37. Cohen JA, Jeffers BW, Stabler S, Schrier RW, Estascio R. Increasing homocysteine levels and diabetic autonomic neuropathy. *Auton Neurosci.* 2001; 87(2-3):268-73.

38. Vaccaro O, Perna AF, Mancini FP, Iovine C, Cuomo V, Sacco M, et al. Plasma homocysteine and microvascular complications in type 1 diabetes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2000; 10 (6): 297-304

39. Looker HC, Fagot-Campagna A, Gunter EW, Pfeiffer CM, Narayan KM, Knowler WC, et al. Homocysteine as a risk factor for nephropathy and retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2003; 46 (6): 766-72.

40. González R, Pedro T, Real JT, Martínez-Hervás S, Abellán MR, Lorente R, et al. Plasma homocysteine levels are associated with ulceration of the foot in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev.* 2010; 26 (2):115-20

41. Molina M, Gonzalez R, Folgado F, Real JT, Martínez-Hervás S, Priego A, et al. Correlación entre las concentraciones plasmáticas de homocisteína y la polineuropatía diabética evaluada con la prueba del monofilamento de Semmes-Weinstein en sujetos con diabetes tipo 2. *Med Clin (Barc)*, 2013;141(9):382-6.
42. González R, Pedro T, Martinez-Hervas S, Civera M, Priego MA, Catalá M, et al. Plasma homocysteine levels are independently associated with the severity of peripheral polyneuropathy in type 2 diabetic subjects. *J Peripher Nerv Syst*. 2012; 17 (2): 191-6.
43. Papatheodorou L, Weiss N. Vascular oxidant stress and inflammation in hyperhomocysteinemia. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9 (11): 1941-58.
44. Schlüssel E. Homocysteine-induced oxidative damage: mechanisms and possible roles in neurodegenerative and atherogenic processes. *Z Naturforsch* 1995; 50 (9-10): 699-707.
45. Aguirre Errasti C, Egurbide Arberas MV, Martínez Berriotxo A. Present role of homocysteine in clinical medicine. *Med Clin (Barc)*. 2009; 133(12):472-8.
46. Rafflenbeul W. Homocysteine--risk factor or risk indicator? *MMW Fortschr Med*. 2005;147(44):28-30.
47. B-Vitamin Treatment Trialists' Collaboration. Homocysteine-lowering trials for prevention of cardiovascular events: a review of the design and power of the large randomized trials. *Am Heart J*. 2006 Feb;151(2):282-7.
48. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005; 54 (6): 1615-25.
49. Gabbay KH, Merola LO, Field RA. Sorbitol pathway: presence in nerve and cord with substrate accumulation in diabetes. *Science* 1966; 151 (3707):209–10.

- 
50. Aubert CE, Michel PL, Gillery P, Jaisson S, Fonfrede M, Morel F, et al. Association of peripheral neuropathy with circulating advanced glycation end products, soluble receptor for advanced glycation end products and other risk factors in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2014 Jan 21. doi: 10.1002/dmrr.2529. [Epub ahead of print]
51. Sugimoto K1, Yasujima M, Yagihashi S. Role of advanced glycation end products in diabetic neuropathy. *Curr Pharm Des*. 2008; 14(10):953-61.
52. Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest* 2001; 108 (9):1341–48.
53. Gille L, Schott-Ohly P, Friesen N, Schulte im Walde S, Udilova N, Nowl H, et al. Generation of hydroxyl radicals mediated by streptozotocin in pancreatic islets of mice in vitro. *Pharmacol Toxicol*. 2002 Jun; 90 (6):317-26.
54. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000; 404 (6779):787–90.
55. De Rubertis FR, Craven PA, Melhem MF, Salah EM. Attenuation of renal injury in db/db mice overexpressing superoxide dismutase: evidence for reduced superoxide–nitric oxide interaction. *Diabetes* 2004; 53 (3):762–68.
56. Adaikalakoteswari A, Rema M, Mohan V, Balasubramanyam M. Oxidative DNA damage and augmentation of poly (ADP ribose) polymerase/nuclear factor-kappa B signaling in patients with type 2 diabetes and microangiopathy. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39 (9):1673–84

57. Dean P. Jones. Redefining Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2006; 8(9-10): 1865-79.
58. Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006; 212(2): 167-78.
59. Ihnat MA, Thorpe JE, Ceriello A. Hypothesis: the 'metabolic memory', the new challenge of diabetes. *Diabet Med*. 2007; 24(6): 582-6.
60. Ceriello A. The emerging challenge in diabetes: the "metabolic memory". *Vascul Pharmacol*. 2012; 57(5-6):133-8.
61. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr Rev* 2004; 25 (4):612-28.
62. Pop-Busui R, Sima A, Stevens M. Diabetic neuropathy and oxidative stress. *Diabetes Metab Res Rev*. 2006; 22 (4): 257-73.
63. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 2004; 142 (2): 231-55.
64. Low PA, Nickander KK, Tritschler HJ. The roles of oxidative stress and antioxidant treatment in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes*. 1997; 46 Suppl 2:S38-42.
65. Schmeichel AM, Schmelzer JD, Low PA. Oxidative injury and apoptosis of dorsal root ganglion neurons in chronic experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* 2003; 52 (1):165-71.
66. Vincent AM, McLean LL, Backus C, Feldman EL. Short-term hyperglycemia produces oxidative damage and apoptosis in neurons. *FASEB J* 2005; 19 (6): 638-40.

- 
67. Al-Nimer MS, Al-Ani FS, Ali FS. Role of nitrosative and oxidative stress in neuropathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Neurosci Rural Pract* 2012; 3 (1): 41–4
68. Kasznicki J, Kosmowski M, Sliwinska A, Mrowicka M, Stanczyk M, Majsterek I, et al. Evaluation of oxidative stress markers in pathogenesis of diabetic neuropathy. *Mol Biol Rep.* 2012; 39 (9): 8669-78
69. El Boghdady NA, Bard GA. Evaluation of oxidative stress markers and vascular risk factors in patients with diabetic peripheral neuropathy. *Cell Biochem Funct* 2012; 30 (4): 328–34 .
70. Ziegler D, Nowak H, Kempler P, Vargha P, Low PA. Treatment of symptomatic diabetic polyneuropathy with the antioxidant alpha-lipoic acid: a meta-analysis. *Diabet Med* 2004; 21 (2):114-21.
71. Mijnhout GS, Kollen BJ, Alkhalaf A, Kleefstra N, Bilo HJ. Alpha lipoic Acid for symptomatic peripheral neuropathy in patients with diabetes: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Endocrinol.* 2012:456279. doi: 10.1155/2012/456279.
72. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes—2008. *Diabetes Care.* 2008 Jan; 31 Suppl 1:S12-54.
73. Little RR. Glycated hemoglobin standardization-- (NGSP) perspective. *Clin Chem Lab Med.* 2003; 41(9):1191-8.
74. Alain CC, Poon LS, Chan CSG, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1974;20 (4): 470-5.

75. Wahlefeld AW. Triglycerides: determination after enzymatic hydrolysis, in Bergmeyer HU, de. Methods of enzymatic analysis. New York, Academic Press, Inc 1974;1831-5.
76. Manual de las Clínicas Españolas de Lípidos. Sociedad Española de Arteriosclerosis. Madrid. Jarpyo Editores S.A., 1992.
77. Marcovina SM, Albers JJ, Dati F, Ledue TB, Ritchie RF. International Federation of Clinical Chemistry standardization Project for measurements of apolipoproteins AI and B. Clin Chem 1991;37 (10 pt 1):1676-82.
78. Tewari PC, Zhang B, Bluestein BI. Analytical and clinical evaluation of the Bayer ADVIA Centaur homocysteine assay. Clin Chim Acta. 2004; 342(1-2):171-8.
79. Real JT, Martínez-Hervás S, Tormos MC, Domenech E, Pallardó FV, Sáez-Tormo G, et al. Increased oxidative stress levels and normal antioxidant enzyme activity in circulating mononuclear cells from patients of familial hypercholesterolemia. Metabolism. 2010; 59 (2): 293-8.
80. Asensi M, Sastre J, Pallardo FV, Estrela JM, Viña J. Determination of oxidized glutathione in blood: High-performance liquid chromatography. Methods in Enzymol 1994; 234, 367-71.
81. Wong SH, Knight JA, Hopfer SM, Zaharia O, Leach CN Jr, Sunderman FW Jr. Lipoperoxids in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde thiobarbituric acid adduct. Clin Chem 1987; 33 (2 pt1): 214-20.
82. Cabezas-Cerrato J. The prevalence of clinical diabetic polyneuropathy in Spain: a study in primary care and hospital clinic groups. Neuropathy Spanish Study Group of the Spanish Diabetes Society (SDS). Diabetologia. 1998; 41(11):1263-9.

83. Van Acker K, Bouhassira D, De Bacquer D, Weiss S, Matthys K, Raemen H, et al. Prevalence and impact on quality of life of peripheral neuropathy with or without neuropathic pain in type 1 and type 2 diabetic patients attending hospital outpatients clinics. *Diabetes Metab.* 2009; 35(3):206-13
84. Calcutt NA. Potential mechanisms of neuropathic pain in diabetes. *Int Rev Neurobiol* 2002; 50:205–28
85. Ceriello A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to “casual” antioxidant therapy. *Diabetes Care* 2003 26 (5):1589–96.
86. Tesfaye S, Stephens LK, Stephenson JM, Fuller JH, Plater M, Ionescu-Tirgoviste C, et al. Prevalence of diabetic peripheral neuropathy and its relation to glycaemic control and potential risk factors: the EURODIAB IDDM Complications Study. *Diabetologia* 1996; 39(11): 1377–84.
87. Adler AI, Boyko EJ, Ahroni JH, Stensel V, Forsberg RC, Smith DG. Risk factors for diabetic peripheral sensory neuropathy. Results of the Seattle Prospective Diabetic Foot Study. *Diabetes Care.* 1997; 20(7):1162-7.
88. Franklin GM, Shetterly SM, Cohen JA, Baxter J, Hamman RF. Risk factors for distal symmetric neuropathy in NIDDM. The San Luis Valley Diabetes Study. *Diabetes Care.*1994; 17(10): 1172-7.
89. Callaghan BC, Little AA, Feldman EL, Hughes RA. Enhanced glucose control for preventing and treating diabetic neuropathy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012 Jun 13;6:
90. Sands ML, Shetterly SM, Franklin GM, Hamman RF. Incidence of distal symmetric (sensory) neuropathy in NIDDM. The San Luis Valley Diabetes Study. *Diabetes Care.* 1997; 20(3):322-9.

91. Tesfaye S, Chaturvedi N, Eaton SE, Ward JD, Manes C, Ionescu-Tirgoviste C, et al. EURODIAB Prospective Complications Study Group. Vascular risk factors and diabetic neuropathy. *N Engl J Med*. 2005; 27; 352(4):341-50.
92. Won JC, Kim SS, Ko KS, Cha BY. Current Status of Diabetic Peripheral Neuropathy in Korea: Report of a Hospital-Based Study of Type 2 Diabetic Patients in Korea by the Diabetic Neuropathy Study Group of the Korean Diabetes Association. *Diabetes Metab J*. Feb 2014; 38(1): 25–31.
93. Boushey CJ. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. *JAMA*. 1995;274 (13):1049–57.
94. Burgos MI, Fenollar M, Avilés F, Parra MS. Patrón diferencial de homocisteína en pacientes con enfermedad arterial periférica. *Med Clin (Barc)*. 2010; 134 (10):467–9.
95. Vega de Cerriga M, Estallo L, Esteban Solán M, Bravo E, Izaguirre M, Barba A. Valor pronóstico de marcadores inflamatorios y perfil lipídico en pacientes con claudicación intermitente. Estudio piloto. *Med Clin (Barc)*. 2011;136 (6):244–7.
96. Pradham AD, Shrivastavas S, Cook NR, Rifai N, Creager MA, Ridker PM. Symptomatic peripheral arterial disease in women: non-traditional biomarkers of elevated risk. *Circulation* 2008; 117 (6): 823–31.
97. Jianbo L, Yuche C, Ming S, Jingrong T, Qing D, Yu Z, et al. Association of homocysteine with peripheral neuropathy in Chinese patients with type 2. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011; 93 (1):38–42.
98. Hoogeveen EK, Kostense PJ, Valk GD, Bertelsmann FW, Jakobs C, Dekker JM, et al. Hyperhomocysteinaemia is not related to risk of distal somatic polyneuropathy: the Hoorn study. *J Intern Med* 1999; 246 (6):561–6.

99. Hofmann MA, Kohl B, Zumbach MS, Borcea V, Bierhaus A, Henkes M, et al. Hyperhomocyst(e)inemia and endothelial dysfunction in IDDM. *DiabetesCare* 1998; 20:1880-6.
100. Chico A, Pérez A, Córdoba A, Arcelús R, Carreras G, de Leiva A, et al. Plasma homocysteine is related to albumin excretion rate in patients with diabetes mellitus: a new link between diabetic nephropathy and cardiovascular disease?. *Diabetologia*. 1998; 41(6): 684-93.
101. Li J, Shi M, Zhang H, Yan L, Xie M, Zhuang L, et al. Relation of homocysteine to early nephropathy in patients with Type 2 diabetes. *Clin Nephrol*. 2012; 77(4):305-10.
102. Goldstein M, Leibovitch I, Yeffimov I, Gavendo S, Sela BA, Loewenstein A. Hyperhomocysteinemia in patients with diabetes mellitus with and without diabetic retinopathy. *Eye (Lond)*. 2004 May;18(5):460-5
103. Malaguarnera G, Gagliano C, Giordano M, Salomone S, Vacante M, Bucolo C, et al. Homocysteine serum levels in diabetic patients with non proliferative, proliferative and without retinopathy. *Biomed Res Int*. 2014; 191497
104. Wile DJ, Toth C. Association of metformin, elevated homocysteine, and methylmalonic acid levels and clinically worsened diabetic peripheral neuropathy. *Diabetes Care*. 2010; 33 (1):156–61.
105. Taskinen MR, Sullivan DR, Ehnholm C, Whiting M, Zannino D, Simes RJ, FIELD study investigators. Relationships of HDL cholesterol, ApoA-I, and ApoA-II with homocysteine and creatinine in patients with type 2 diabetes treated with fenofibrate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009; 29 (6): 950–5.

106. Lever M, George PM, Slow S, Elmslie JL, Scott RS, Richards AM, et al. Fibrates may cause an abnormal urinary betaine loss which is associated with elevations in plasma homocysteine. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2009; 23 (5): 395–401.
107. Williams KT, Schalinske KL. Homocysteine metabolism and its relation to health and disease. *Biofactors.* 2010;36 (1):19–24
108. Lonn E, Yusuf S, Arnold MJ, Sheridan P, Pogue J, Micks M, et al. Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) 2 Investigators. Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *N Engl J Med.* 2006; 354 (15):1567-77.
109. Toole JF, Malinow MR, Chambless LE, Spence JD, Pettigrew LC, Howard VJ, et al. Lowering homocysteine in patients with ischemic stroke to prevent recurrent stroke, myocardial infarction, and death: the Vitamin Intervention for Stroke Prevention (VISP) randomized controlled trial. *JAMA.* 2004; 291(5):565-75.
110. House AA, Eliasziw M, Cattran DC, Churchill DN, Oliver MJ, Fine A, et al. Effect of B-vitamin therapy on progression of diabetic nephropathy: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2010 Apr 28;303(16):1603-9.
111. Herrmann W, Herrmann M, Obeid R. Hyperhomocysteinaemia: a critical review of old and new aspects. *Curr Drug Metab.* 2007 Jan;8(1):17-31
112. Jacobs AM, Cheng D. Management of diabetic small-fiber neuropathy with combination L-methylfolate, methylcobalamin, and pyridoxal 5'-phosphate. *Rev Neurol Dis.* 2011; 8(1-2):39-47.
113. Walker MJ Jr, Morris LM, Cheng D. Improvement of cutaneous sensitivity in diabetic peripheral neuropathy with combination L-methylfolate, methylcobalamin, and pyridoxal-5'-phosphate. *Rev Neurol Dis.* 2010; 7(4):132–9.

114. Jacobs AM, Cheng D. Management of diabetic small-fiber neuropathy with combination L-methylfolate, methylcobalamin, and pyridoxal 5'-phosphate. *Rev Neurol Dis.* 2011; 8 (1-2):39-47.
115. Loscalzo J. Homocysteine trials: clear outcomes for complex reasons. *N Engl J Med.* 2006; 354 (15): 1629-32.
116. Urquhart BL, Freeman DJ, Spence JD, House AA. Mesna as a nonvitamin intervention to lower plasma total homocysteine concentration: implications for assessment of the homocysteine theory of atherosclerosis. *J Clin Pharmacol.* 2007; 47(8): 991-7.
117. Cantero M, Parra T, Conejo JR. Increased hydrogen peroxide formation in polymorphonuclear leukocytes of IDDM patients. *Diabetes Care.* 1998; 21(2): 326-7.
118. Obrosova IG. How does glucose generate oxidative stress in peripheral nerve? *Int Rev Neurobiol* 2002; 50:3–35
119. Winterbourn CC. The biological chemistry of hydrogen peroxide. *Methods Enzymol.* 2013; 528:3-25
120. Hayes JD, McLellan LI. Glutathione and glutathione dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res* 1999 31:273–300.
121. Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol.* 2003; 15; 66 (8):1499-503.
122. Iwata-Ichikawa E, Kondo Y, Miyazaki I, Asanuma M, Ogawa N. Glial cells protect neurons against oxidative stress via transcriptional up-regulation of the glutathione synthesis. *J Neurochem* 1999; 72 (6): 2334-4

123. Keelan J, Allen NJ, Antcliffe D, Pal S, Duchon MR. Quantitative imaging of glutathione in hippocampal neurons and glia in culture using monochlorobimane. *J Neurosci Res* 2001; 66 (5) :873–84
124. Lodovici M, Giovannelli L, Pitozzi V, Bigagli E, Bardini G, Rotella CM. Oxidative DNA damage and plasma antioxidant capacity in type 2 diabetic patients with good and poor glycaemic control. *Mutat Res* 2008 (1-2); 638:98–102
125. Demirbag R, Yilmaz R, Kocyigi A. Relationship between DNA damage, total antioxidant capacity and coronary artery disease. *Mutat Res* 2005; 570 (2):197–203
126. Atli T, Keven K, Avci A, Kutlay S, Turkcapar N, Varli M, et al. Oxidative stress and antioxidant status in elderly diabetes mellitus and glucose intolerance patients. *Arch Gerontol Geriatr* 2004; 39 (3):269–75
127. Song F, Jia W, Yao Y, Hu Y, Lei L, Lin J, et al. Oxidative stress, antioxidant status and DNA damage in patients with impaired glucose regulation and newly diagnosed Type 2 diabetes. *Clin Sci (Lond)*. 2007 Jun;112(12):599-606
128. Barbosa KB, Bressan J, Zulet MA, Martínez Hernández JA. Influence of dietary intake on plasma biomarkers of oxidative stress in humans. *An Sist Sanit Navar*. 2008; 31(3):259-80
129. Mayne ST. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J Nutr*. 2003 Mar;133 Suppl 3:933S-940S
130. Turk HM, Sevinc A, Camci C, Cigli A, Buyukberber S, Savli H, et al. Plasma lipid peroxidation products and antioxidant enzyme activities in patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol*. 2002; 39 (3):117-22.

131. Ahmed FN, Naqvi FN, Shafiq F. Lipid peroxidation and serum antioxidant enzymes in patients with type 2 diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1084:481-9.
132. Kesavulu MM, Rao BK, Giri R, Vijaya J, Subramanyam G, Apparao C. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme status in Type 2 diabetics with coronary heart disease. *Diabetes Res Clin Pract.* 2001;53(1):33-9.
133. Uchida K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med.* 2000; 28(12):1685-96.
134. Kesavulu MM, Giri R, Kameswara Rao B, Apparao C. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in type 2 diabetics with microvascular complications. *Diabetes Metab.* 2000;26(5):387-92
135. Martínez-Blasco A, Bosch-Morell F, Trenor C, Romero FJ. Experimental diabetic neuropathy: role of oxidative stress and mechanisms involved. *Biofactors.* 1998; 8 (1-2):41-3.
136. Pop-Busui R, Sullivan KA, Van Huysen C, Bayer L, Cao X, Towns R, et al. Depletion of taurine in experimental diabetic neuropathy: implications for nerve metabolic, vascular, and functional deficits. *Exp Neurol* 2001; 168:259–72
137. van Dam PS, van Asbeck BS, Van Oirschot JF, Biessels GJ, Hamers FP, Marx JJ. Glutathione and alpha-lipoate in diabetic rats: nerve function, blood flow and oxidative state. *Eur J Clin Invest.* 2001;31(5):417-24.
138. Vareniuk I, Pavlov IA, Drel VR, Lyzogubov VV, Ilnytska O, Bell SR, et al. Nitrosative stress and peripheral diabetic neuropathy in leptin-deficient (ob/ob) mice. *Exp Neurol.* 2007; 205(2):425-36.

139. Kishi Y, Nickander KK, Schmelzer JD, Low PA. Gene expression of antioxidant enzymes in experimental diabetic neuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 2000; 5:11–18
140. Hamilton RT, Bhattacharya A, Walsh ME, Shi Y, Wei R, Zhang Y, et al. Elevated protein carbonylation, and misfolding in sciatic nerve from db/db and Sod1(-/-) mice: plausible link between oxidative stress and demyelination. *PLoS One*. 2013 Jun 4;8(6):e65725
141. Russell JW, Berent-Spillson A, Vincent AM, Freimann CL, Sullivan KA, Feldman EL. Oxidative injury and neuropathy in diabetes and impaired glucose tolerance. *Neurobiol Dis*. 2008;30 (3):420-9
142. Russell JW, Golovoy D, Vincent AM, Mahendru P, Olzmann JA, Mentzer A, et al. High glucose induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurons. *FASEB J* 2002; 16:1738–48
143. Sampson MJ, Gopaul N, Davies IR, Hughes DA, Carrier MJ. Plasma F2 isoprostanes: direct evidence of increased free radical damage during acute hyperglycemia in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2002; 25:537–41.
144. Wang X, Chang X, Li J, Yin L, Sun K. DNA methylation of microRNA-375 in impaired glucose tolerance. *Exp Ther Med*. 2014 Sep;8(3):775-780.
145. Temple IK, Gardner RJ, Mackay DJ, Barber JC, Robinson DO, Shield JP. Transient neonatal diabetes: widening the understanding of the etiopathogenesis of diabetes. *Diabetes* 2000; 49: 1359–66.
146. Villeneuve LM, Natarajan R. The role of epigenetics in the pathology of diabetic complications. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 Jul;299(1):F14-25.

147. Maier S, Olek A. Diabetes: a candidate disease for efficient DNA methylation profiling. *J Nutr.* 2002 Aug;132(8 Suppl):2440S-2443S.
148. Kim ES, Isoda F, Kurland I, Mobbs CV. Glucose-induced metabolic memory in Schwann cells: prevention by PPAR agonists. *Endocrinology.* 2013; 154(9):3054-66
149. Stevens MJ, Obrosova I, Cao X, Van Huysen C, Greene DA. Effects of DL-alpha-lipoic acid on peripheral nerve conduction, blood flow, energy metabolism, and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes.* 2000; 49 (6):1006-15.
150. Ametov AS, Barinov A, Dyck PJ, Hermann R, Kozlova N, Litchy WJ, et al. SYDNEY Trial Study Group. The sensory symptoms of diabetic polyneuropathy are improved with alpha-lipoic acid: the SYDNEY trial. *Diabetes Care.* 2003; 26 (3):770-6.
151. Osawa T, Kato Y. Protective role of antioxidative food factors in oxidative stress caused by hyperglycemia. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1043: 440-51.
152. Liu F, Ma F, Kong G, Wu K, Deng Z, Wang H. Zinc supplementation alleviates diabetic peripheral neuropathy by inhibiting oxidative stress and upregulating metallothionein in peripheral nerves of diabetic rats. *Biol Trace Elem Res.* 2014; 158(2):211-8
153. Yamamoto T, Takakura S, Kawamura I, Seki J, Goto T. The effects of zenarestat, an aldose reductase inhibitor, on minimal F-wave latency and nerve blood flow in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci* 2001; 68 (12):1439–48
154. Schemmel KE, Padiyara RS, D'Souza JJ. Aldose reductase inhibitors in the treatment of diabetic peripheral neuropathy: a review. *J Diabetes Complications.* 2010; 24(5): 354-60.