



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

---

FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA

DEPARTAMENT DE MEDICINA

Programa de Doctorado 3139. Medicina

TESIS DOCTORAL

**INFLAMACIÓN Y POLINEUROPATÍA EN LA  
DIABETES MELLITUS TIPO 2**

**Antonia Pilar Ascaso Pechuán**

**Dirigida por:**

**Dr. Juan F. Ascaso Gimilio y Dr. José T. Real Collado**

**Valencia, marzo de 2017**

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 València.

Certifican:

Que Dña. Antonia Pilar Ascaso Pechuán, graduada en fisioterapia, ha realizado bajo nuestra dirección la tesis doctoral titulada: "Inflamación y polineuropatía en la diabetes mellitus tipo 2" y que reúne todos los requisitos para ser presentada y defendida para optar al Grado de Doctor por la Universitat de València.

Valencia, 23 de marzo de 2017.

Fdo. Dr. Juan F. Ascaso

Fdo. Dr. José T. Real

## **Agradecimientos**

A mis directores

Al Prof. Juan F Ascaso, mi padre, por su dedicación y apoyo a mi formación profesional y personal y por confiar en mí y darme la oportunidad de realizar este trabajo, para mí es un ejemplo a seguir.

Al Prof. José T. Real por compartir sus ideas y conocimiento conmigo, por favorecer la investigación y mostrar siempre interés en apoyar y promover el equipo multidisciplinar.

A Laura Piqueras Ruiz (INCLIVA) por su colaboración desinteresada y disposición; y por algo muy importante, cederme su tiempo.

Mi agradecimiento a todos los profesionales del Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Clínico de Valencia por facilitarme los medios para realizar esta tesis, todos directa o indirectamente han formado parte de este proyecto.

A toda mi familia que siempre me ha ayudado.

## Abreviaturas utilizadas.

ACV = accidente cerebral vascular

ADA = Asociación Americana de Diabetes

AGE = productos finales de glicación avanzada

ApoB = apolipoproteína B

ATPasa = enzima hidrolítica del adenosin trifosfato

CBS = cistation beta-sintetasa

CC = quimioquinas grupo CC

cLDL = colesterol-LDL o de las lipoproteínas de baja densidad

CS = cistationina  $\beta$ -sintetasa

CT = Colesterol total

CXC = quimioquinas grupo CXC

CXCL = quimioquina del grupo CXC

CXCL10/ IP-10 = Interferon gamma-induced protein 10

CXCL11/I-TAC = Interferon gamma-induced protein 9

CXCL9/MIG = Monokine induced by gamma interferon

CXCR = Receptor de las quimioquinas

CXCR3 = receptor de los ligandos CXCL10, 9 y 11

cHDL = colesterol-HDL o de las lipoproteínas de alta densidad

DM2 = diabetes mellitus tipo 2

EO = estrés oxidativo

EPOC = enfermedad pulmonary obstructiva crónica

ERK 1/2 = quinasas relacionadas con las proteína-serina/treonina “protein-serine/threonine kinases”

FGe = filtrado glomerular estimado

GR = glutation reductasa

GGT = gamma glutamil transpeptidasa

Glucemia B = glucemia basal o en ayuno

GOT = Transaminasa Glutámico-oxalacética o AST = aspartato aminotransferasa

GPT = transaminasa glutámico-pirúvica o ALT = alanina amino transferasa

GSH = glutatión

GSSG = glutatión oxidado

H = hombres

HbA1c = Hemoglobina glicada

HIV = virus de la inmunodeficiencia humana

HMT =homocisteína metil transferasa

HTA = hipertensión arterial

IAM = infarto de miocardio

IMC = índice de masa corporal ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ).

ITB = prueba índice tobillo brazo

M = Mujeres

MS = metionina sintetasa

MTHFR = metilen tetra hidrofolato reductasa

NDS = “Neuropathy Disability Score” o puntuación de discapacidad por neuropatía

NADH = Nicotinamida adenina dinucleótido

NADPH = Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido

NADP<sup>-</sup> = forma oxidada

NAD<sup>+</sup> = Nicotinamida adenina dinucleótido en su forma oxidada

NFkB = factor nuclear kappa B o potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

NO = óxido nítrico

NSS = “Neuropathy Symptom Score” o puntuación de síntomas de neuropatía

NYHA = New York Heart Association

PAD = presión arterial diastólica

PAS = presión arterial sistólica

PKC = proteína quinasa C

PND = polineuropatía periférica diabética

RAGE = receptores de los productos finales de glicación avanzada

ROS = especies reactivas de oxígeno

SW = SemmesWeinstein o prueba del monofilamento de SemmesWeinstein

TG = Triglicéridos

THF = tetrahidrofolato

Thnp = precursor de Th;

Th1 = linfocitos T helper que activan los macrófagos e inflamación

Th2 = linfocitos T helper con efecto transcriptor génico y controlador del efecto de Th1

Th17 = linfocitos helper relacionado con enfermedades inflamatorias y autoinmunes

Tr1 = linfocitos con función en el mantenimiento de la autotolerancia.

TSH = hormona tirotrópica o estimulante tiroidea

VB = vitamina B12

VEGF = factor de crecimiento del endotelio vascular

## Listado de figuras

Figura 1: Clasificación de la neuropatía diabética

Figura 2: Mecanismos lesionales de los nervios periféricos relacionados con la hiperglucemia

Figura 3: Vía metabólica de los polioles (sorbitol)

Figura 4: Metabolismo de la homocisteína

Figura 5: Representación de la interacción de la ruta del poliol, la glicosilación avanzada y el estrés oxidativo y sus efectos sobre la función vascular en diabéticos

Figura 6: Diagrama simplificado de las quimioquinas CXC y su receptor

Figura 7: Receptor humano CXCR3 y sus ligandos

Figura 8: Quimioquinas CXCL9, 10, 11 y su función sobre los linfocitos T CD4+

Figura 9: Factores relacionados con la presencia de neuropatía

Figura 10: Número de sujetos con diferentes tratamientos

Figura 11: Relación entre la clasificación de neuropatía diagnosticada con monofilamento y las escalas NDS y NSS

Figura 12: Factores inflamatorios (CXC) en el grupo de DM2 con y sin neuropatía (NP)

Figura 12bis: Factores inflamatorios (CXC) en el grupo de DM2 con y sin neuropatía (excluyendo valores extremos)

Figura 13: Factores inflamatorios en el grupo DM2 según escala NDS

Figura 14: Quimioquinas CXC en el grupo DM2 según la escala NSS

## Listado de tablas

Tabla 1. Quimioquinas CXC y su función

Tabla 2. Ligandos del receptor humano CXCR3: CXCL4, CXCL9, CXCL10, CXCL11

Tabla 3. Patologías relacionadas con el sistema CXCL9, 10 y 11 / CXCR3

Tabla 4. Índice NDS “Neurological Disability Score” o Índice de alteraciones neurológicas

Tabla 5. Índice NSS “Neuropathy Symptom Score” o Índice de síntomas neurológicos

Tabla 6. Características generales del grupo estudiado

Tabla 7. Características generales de ambos grupos de sujetos con diabetes tipo 2 con y sin neuropatía

Tabla 8. Parámetros bioquímicos y leucocitos en ambos grupos de sujetos con diabetes tipo 2 con y sin neuropatía

Tabla 9. Factores de riesgo cardiovascular y de neuropatía en ambos grupos de sujetos diabéticos tipo 2 con y sin neuropatía

Tabla 10. Comparación de ambos grupos de sujetos con diabetes tipo 2 con y sin neuropatía, con las escalas NDS y NSS

Tabla 11. Población control, no diabética, no obesa

Tabla 12. Comparación de los valores de quimioquinas entre controles y diabéticos.

Tabla 13. Quimioquinas plasmáticas CXCL ligandos del receptor CXCR3 en ambos grupos de sujetos con diabetes tipo 2, divididos en aquellos con y sin neuropatía

Tabla 14. Quimioquinas plasmáticas CXCL ligandos del receptor CXCR3 en ambos grupos de sujetos con diabetes tipo 2, divididos en aquellos con y sin neuropatía (excluidos valores extremos)

Tabla 15. Características generales de los sujetos divididos por escala NDS

Tabla 16. Estudio de los parámetros bioquímicos en los sujetos divididos por escala NDS



Tabla 17. Valores de quimioquinas en los sujetos divididos por escala NDS

Tabla 18. Características generales de los sujetos divididos por escala NSS

Tabla 19. Parámetros bioquímicos de los sujetos divididos por escala NSS

Tabla 20. Quimiocinas en los sujetos divididos según la escala NSS

## INDICE

---

## Índice

<b>Introducción</b>	<b>13</b>
<b>1. Diabetes Mellitus</b>	<b>14</b>
1.1. Definición	14
1.2. Diagnóstico de la diabetes	14
1.3. Diabetes Mellitus tipo 2	15
1.4. Prevalencia de la diabetes mellitus tipo 2	16
1.5. Clínica y complicaciones diabéticas	16
<b>2. Neuropatía diabética</b>	<b>18</b>
2.1. Prevalencia	18
2.2. Clasificación clínica y principales cuadros	19
2.3. Diagnóstico de la neuropatía periférica diabética	23
2.4. Causas y mecanismos de neuropatía diabética	24
2.4.1. Factores clásicos	24
2.4.2. Factores nuevos o no clásicos	29
2.4.2.1. Hiperhomocisteinemia	29
2.4.2.2. Estrés oxidativo	32
2.4.2.3. Inflamación crónica	34
<b>3. Papel de las CXC en la inflamación y angiogénesis</b>	<b>35</b>
<b>4. Grupo de las quimioquinas ligando del receptor CXCR3</b>	<b>39</b>

---

5. El sistema CXCL9, CXCL10 Y CXCL11 y su receptor CXCR3 y su relación con múltiples enfermedades	43
<b>Hipótesis</b>	51
<b>Sujetos y métodos</b>	53
1. Tipo de estudio	54
2. Sujetos	54
3. Parámetros clínicos	55
4. Estudio de la neuropatía	57
5. Parámetros bioquímicos	60
6. Niveles de las quimioquinas circulantes	61
7. Métodos estadísticos	62
8. Aprobación Comité de Ética	62
<b>Resultados</b>	64
<b>Discusión</b>	86
<b>Conclusiones</b>	92
<b>Fortalezas y debilidades</b>	94
<b>Bibliografía</b>	95

# INTRODUCCIÓN

## Introducción

### 1. Diabetes mellitus

#### 1.1. Definición

La diabetes mellitus (DM) se define como el conjunto complejo de enfermedades caracterizadas por hiperglucemia crónica, causada por factores genéticos, epigenéticos y ambientales, que conducen a defectos en la secreción de insulina, de la acción de la insulina o a ambos y en su evolución natural, enfermedad no tratada, conduce a una serie de lesiones inicialmente funcionales y posteriormente orgánicas que afectan a numerosos órganos y sistemas (especialmente a ojos, riñones, sistema nervioso, corazón y vasos sanguíneos), estas complicaciones conllevan una elevada morbi-mortalidad<sup>1</sup>.

#### 1.2. Diagnóstico de diabetes

El diagnóstico de diabetes, desde hace unos años, ha quedado establecido por las siguientes situaciones o valores de las pruebas de laboratorio<sup>1</sup>.

- Glucemia basal (ayunas de 8 h)  $\geq 126$  mg/dL.
- Glucemia  $\geq 200$  mg/dL a las 2 horas de una prueba de tolerancia oral a la glucosa.
- Hemoglobina glicada o HbA1c  $\geq 6,5\%$

Con los 3 criterios anteriores, si las cifras no son claramente demostrativas, se requieren 2 determinaciones realizadas en diferentes días para establecer el diagnóstico.

- Síntomas de diabetes y glucemia aislada (casual)  $\geq 200$  mg/dL.

### 1.3. Diabetes mellitus tipo 2

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2), antiguamente llamada no insulino dependiente o del adulto, terminología obsoleta y que no debe utilizarse, porque algunos pacientes en su evolución necesitan insulina y puede aparecer a cualquier edad incluyendo niños y jóvenes, relacionada con la obesidad en este rango de edad.

La DM2 es un cuadro complejo caracterizado por una combinación de resistencia a la insulina y defecto en la secreción de insulina<sup>1,2</sup>. Se considera una enfermedad multifactorial, donde intervienen factores genéticos y epigenéticos y ambientales o adquiridos, principalmente la obesidad, sedentarismo y el envejecimiento, y representa la forma más frecuente de diabetes.

Las principales alteraciones coexistentes son la insulinoresistencia y la alteración funcional de la célula beta y estas dos alteraciones están relacionadas entre sí, ya cada una de estas alteraciones puede conducir a la otra, por lo que se ha discutido durante mucho tiempo que era primario y que podía ser secundario. Hoy se conoce que ambos procesos son primarios, pero con diferente penetración de uno u otro lo que conlleva a diferentes fenotipos clínicos y evolutivos de la DM2<sup>3,4</sup>.

Posiblemente, en la mayoría de los pacientes con diabetes tipo 2 el peso en el desarrollo de la enfermedad corresponde en un 50% a los factores genéticos, aunque con los datos aportados por estudios modernos esta cifra varía entre 25-80%. El riesgo de desarrollar DM2 varía en un 40% para el que tiene un progenitor con diabetes y un 70% si ambos progenitores son diabéticos. Los factores adquiridos (obesidad abdominal, sedentarismo, envejecimiento, etc.) tendrían un peso que correspondería a la diferencia con el de los factores genéticos. En un 85-90% de los pacientes con DM2 predomina la resistencia a la insulina, predominantemente en aquellos con obesidad abdominal, estos sujetos cursan con las características típicas del síndrome metabólico (obesidad, dislipemia, hipertensión, inflamación crónica, estado procoagulante y alto riesgo cardiovascular). En un 10-15% predomina la alteración de la secreción de insulina con hipoinsulinismo, habitualmente en aquellos

sin obesidad y con menor grado de resistencia a la insulina<sup>5</sup>.

#### **1.4. Prevalencia de la diabetes mellitus tipo 2**

La prevalencia de la diabetes es variable y oscila entre un 6-14% de la población general. El estudio Valencia realizado en la Comunidad Valenciana en 2010<sup>6</sup> encontró, en sujetos mayores de 18 años, una prevalencia de diabetes del 14%, del total de sujetos con diabetes más del 90% eran DM2 y de estos con diabetes tipo 2 solo un 50% era conocida por los sujetos estudiados, porcentaje similar al encontrado en otros estudios. Estos datos coinciden con los reportados ese mismo año en el conjunto de la población de España con el estudio Di@bet.es<sup>7</sup> donde encontraron, en población adulta, una prevalencia de diabetes del 13,8%.

Esta alta prevalencia de diabetes representa un incremento muy importante y progresivo en los últimos años, por ello se le considera una “epidemia” en todos los países del mundo<sup>8</sup>.

En el estudio epidemiológico mencionado, [Di@bet.es](http://Di@bet.es) realizado por el CIBERDEM, un 30% de la población estudiada tenía alguna alteración de metabolismo de la glucosa o situación de prediabetes, representando un grupo de muy alto riesgo para el desarrollo de diabetes y de complicaciones diabéticas en los próximos años<sup>9</sup>.

#### **1.5. Clínica y complicaciones crónicas en la diabetes mellitus tipo 2**

Clínicamente la DM2 pasa varios años totalmente asintomática, por ello aproximadamente un 50% de los casos no han sido diagnosticados, pasados varios años, habitualmente 10 o más, aparece clínica hiperglucémica leve y solo después de una larga evolución 20 o más años puede aparecer déficit de insulina y clínica hiperglucémica más importante.

Sin embargo, desde su instauración, en fase asintomática o no diagnosticada, el riesgo de complicaciones crónicas es alto. Estas complicaciones son la causa de la elevada morbilidad que tiene esta enfermedad que es muy alta a partir a los diez años del diagnóstico. Estas complicaciones son:



- Arteriosclerosis o macroangiopatía con afectación coronaria, cerebral, periférica, aortica, o en otras localizaciones. Esta complicación es la causa de muerte en el 70-80% de los sujetos con diabetes. La importancia de esta complicación hace que la diabetes tipo 2 sea considerada como una situación de alto riesgo cardiovascular.
- Microangiopatía o afectación de los pequeños vasos: arteriolas, capilares y vénulas. Produce engrosamiento y aumento de la permeabilidad de la membrana basal, disminución de la luz vascular e hipoxia del territorio irrigado. Afecta a todos los tejidos y territorios orgánicos, pero las principales alteraciones son aquellas que conducen a manifestaciones clínicas y complicaciones como son la afectación ocular, especialmente la retina, la lesión de los capilares glomerulares, de los vasa-nervorum, músculo cardíaco y estriado, piel, otros.

La retinopatía o afectación microvascular de la retina está presente aproximadamente en el 30% de los sujetos con DM2<sup>10,11</sup>; su prevalencia depende del tiempo de evolución de la diabetes y afecta al 15-50% de los sujetos con diabetes según la duración de la enfermedad; en un 10% de los casos cursa con retinopatía proliferativa y alto riesgo de pérdida de visión<sup>12</sup>. La prevalencia de nefropatía o glomerulopatía diabética oscila entre el 3 y 35% de los pacientes con diabetes tipo 2<sup>13</sup>, conduciendo a insuficiencia renal en un 8% de los casos<sup>14</sup>.

- Neuropatía: periférica (25%) es la complicación más frecuente de la DM2, y alrededor del 40% de los diabéticos presentan algún tipo de alteración neuropática en el momento del diagnóstico<sup>15</sup>.

Los principales factores responsables de las complicaciones diabéticas son: el grado de hiperglucemia y el tiempo de evolución de la diabetes (hiperglucemia) y, por otro lado, tiene una importancia añadida los factores de riesgo cardiovascular asociados, fundamentalmente la hipertensión arterial, la dislipemia, el consumo de tabaco, la

---

presencia de obesidad abdominal, etc<sup>16,17</sup>.

## **2. Neuropatía diabética**

La neuropatía diabética es definida por la “American Diabetes Association” como la presencia de síntomas y/o signos de disfunción de los nervios periféricos en personas con diabetes después de la exclusión de otras causas. Los principales factores de riesgo son la presencia y gravedad de la hiperglucemia crónica mantenida y el tiempo de evolución de la diabetes, aunque no se descarta la predisposición genética a desarrollar esta complicación de la diabetes<sup>18</sup>.

Las neuropatías diabéticas son un grupo heterogéneo de trastornos con diversas manifestaciones clínicas.

### **2.1. Prevalencia**

La neuropatía diabética es probablemente la complicación diabética más frecuente y habitualmente infradiagnosticada, y conlleva una elevada tasa de malestar para el paciente, discapacidad en menor o mayor grado e incluso una alta morbi-mortalidad<sup>18,19</sup>.

La prevalencia varía según el criterio y método utilizado en el diagnóstico: clínicamente se encuentra en el 10-50% de los pacientes, dependiendo del control metabólico y años de evolución de la diabetes (0-20 años).

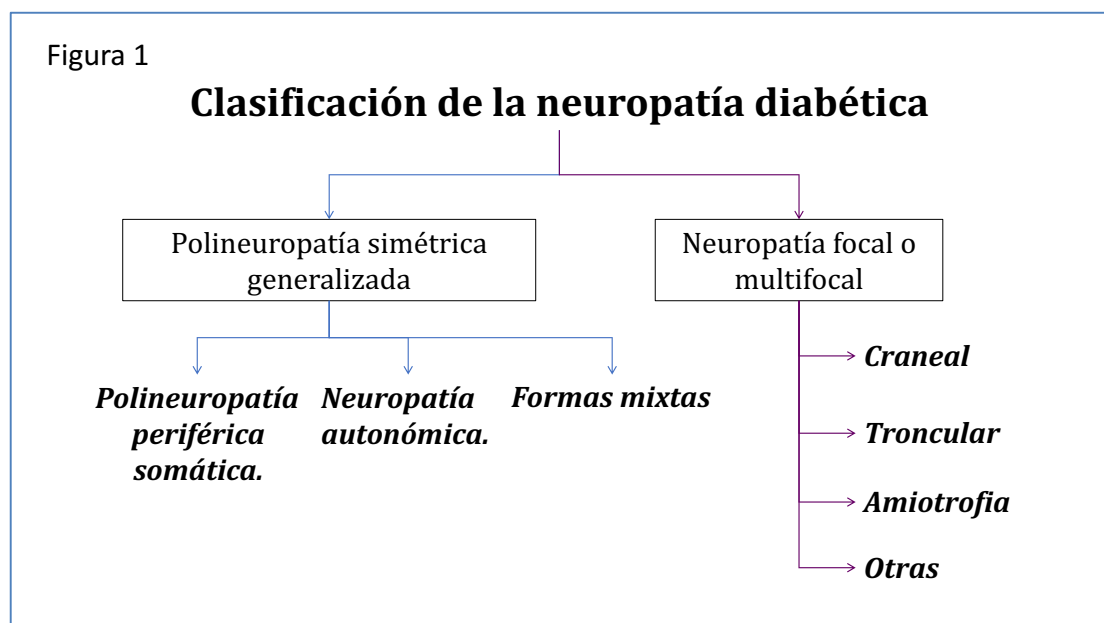
Otros estudios encuentran una prevalencia de la PND que oscila entre el 30-60%, la media independiente de la edad, es decir, en el conjunto de la población diabética, es del 45%, aumentando progresivamente con la evolución de mal control metabólico y con el tiempo de evolución de la diabetes<sup>20</sup>. Algunos autores establecen una frecuencia entre el 50-60%, siendo la complicación más frecuente de la diabetes mellitus<sup>21</sup>.

Algunos estudios han encontrado con métodos electrofisiológicos hasta un 70-80% en pacientes con 10 años de evolución de la diabetes. Además, en la DM2, que cursa asintomática en sus primeros estadios puede estar presente en el momento del diagnóstico e incluso ser la primera manifestación de la diabetes<sup>21,22</sup>.

## 2.2. Clasificación clínica y principales cuadros

La diabetes puede afectar a todo el sistema nervioso: encéfalo, médula, raíces medulares y a los nervios periféricos tanto somáticos como autonómicos.

La neuropatía o polineuropatía diabética (PND), o afectación de los nervios periféricos, puede adoptar diversas formas que vienen recogidas en la figura 1.



La forma más frecuente es la polineuropatía periférica somática (PND) de tipo sensitivo-motora, con predominio sensitivo, de localización bilateral, distal y simétrica, con afectación de fibras pequeñas y grandes.

Los síntomas varían según la clase de fibras sensitivas implicadas. Los síntomas precoces más frecuentes son inducidos por la participación de fibras pequeñas e incluyen dolor y disestesias (sensación desagradable de quemazón y hormigueo). La participación de fibras grandes puede causar entumecimiento y pérdida de la sensibilidad protectora y es un factor de riesgo para la ulceración del pie diabético. Las siguientes pruebas clínicas se pueden utilizar para evaluar la función de las fibras pequeñas y grandes y la sensación protectora:

- La función de las fibras pequeñas está relacionada con la sensibilidad al pinchazo y la sensación de temperatura.
- La función de las fibras grandes se relaciona con la percepción de vibración, la sensibilidad a la exploración con el monofilamento de 10 g y con la respuesta de los reflejos osteotendinosos.
- La sensación de protección esta también relacionada con la respuesta tras la exploración con el monofilamento de 10 g.

Como hemos comentado, afecta a miembros inferiores, con un comienzo muy lento y distal, fundamentalmente en la planta del pie, posteriormente afecta al pie y más tarde al tercio inferior de pierna (localización en calcetín). En su lenta y larga evolución progresa hacia la región proximal y puede afectar también a los miembros superiores.

**Clínicamente** se caracteriza por manifestaciones sensitivas<sup>23</sup>:

- Parestesias (sensación de frío, quemazón plantar, hormigueos, etc)
- Dolor (pinchazos, intenso, quemante; aumenta por la noche y mejora con la deambulación).
- Hasta un 50% pueden ser asintomática, caracterizada solo por alteraciones en la exploración.

### **Exploración física:**

- Disminución o abolición de la sensibilidad (hipostesia o anestesia), térmica, dolorosa, vibratoria, etc.
- Hipo o arreflexia aquilea y posteriormente patelar.
- Finalmente aparecen manifestaciones motoras: con disminución de la fuerza muscular, con dificultad al caminar de talones o agachado y atrofia, típicamente de los músculos interóseos en pies y manos.

### **Exploración instrumental**

Se basa en la demostración de una alteración en la sensibilidad, con disminución o abolición:

- A la presión con monofilamento (10 g de presión).
- Discriminación térmica, comparación con los ojos cerrados de calor y frío.
- Percepción de la vibración, exploración con diapasón de 128 Hz.

Todas las pruebas se harán, al menos, en la base de la uña de los 2 primeros dedos.

Disminución de respuesta a abolición del reflejo aquileo.

### **Complicaciones**

Las complicaciones más frecuentes relacionadas con la PND son:

- Artropatía diabética de Charcot consecuencia de pérdida de la sensibilidad propioceptiva y dolorosa con conservación de la fuerza motora, produciéndose una presión crónica al caminar y mal soporte con pequeños y repetidos traumas articulares que conducen a la destrucción crónica y

progresiva del pie, que se manifiesta por: aumento de la anchura del pie y disminución del arco plantar y más tarde pérdida que es evidente con el sujeto en bipedestación. Posteriormente, eritema, edema y grandes deformidades con destrucción ósea y articular<sup>24,25</sup>.

- Úlcera neuropática por la presión sobre zonas no habituales con ausencia de dolor, pasando por la fase de callosidad, úlcera indolora, infección secundaria y amputación.

Las úlceras neuropáticas característicamente son de tamaño variable, están rodeadas de un grueso callo y son indoloras, no hay dolor espontáneo ni en la exploración o presión sobre la úlcera. La aparición de la úlcera en el pie diabético se asocia a la presencia de los síntomas neurológicos negativos (hipoestesia o anestesia), lo supone la pérdida de la sensación protectora en los pies y resultará en un trauma no percibido en el pie; siendo el principal factor que conduce al desarrollo de heridas en el pie. Sin la percepción de los estímulos dolorosos estos eventos traumáticos (presión patológica repetitiva, microtrauma) pueden presentarse como lesiones de la piel o en la ruptura profunda del tejido. La alteración de la sensibilidad y conservación de la irrigación vascular, pulsos normales, pueden llevar a heridas sangrantes; cuando estas se infectan puede existir fetidez y supuración. Habitualmente localizadas en la cabeza del primer metatarsiano o en la región plantar llamadas “mal perforante plantar”, están en zonas de presión o de roce por deformidad del pie. Las úlceras en caras laterales del pie son por roce con calzado inadecuado.

La ulceración del pie, en pacientes diabéticos, precede a la amputación de las extremidades inferiores en aproximadamente el 85% de los casos. Las lesiones neuropáticas y del pie suponen una carga personal, social y económica, por su tratamiento y por la posibilidad de complicaciones, necesitando en ocasiones la amputación<sup>26</sup>.

### 2.3. Diagnóstico de la neuropatía periférica diabética

La neuropatía diabética es un diagnóstico de exclusión. Las neuropatías no diabéticas pueden estar presentes en pacientes con diabetes y deben ser diagnosticadas ya que pueden tener un tratamiento específico<sup>27</sup>.

Clínicamente el diagnóstico se basaba en la interpretación subjetiva de las manifestaciones y de los signos descritos. Sin embargo, hasta el 50% de los casos de neuropatía periférica diabética puede ser asintomática, como hemos comentado, e incluso en esos casos hay un alto riesgo de sufrir lesiones o traumas en los pies que deriven en consecuencias tan graves como la amputación.

Esta amplia variabilidad clínica dificulta su diagnóstico, por ello, varios grupos de trabajo de diferentes sociedades científicas han intentado desde 1988 establecer unos criterios diagnósticos basados en datos clínicos y fundamentalmente en la exploración física, ya que estudios electrofisiológicos son de difícil uso en la práctica clínica habitual<sup>28</sup>.

Se han propuesto diversas escalas diagnósticas, por su sencillez, reproductibilidad y aplicabilidad en la práctica clínica, se utilizan preferentemente dos escalas: la “Neuropathy Symptom Score” (NSS) que 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 gravedad de la neuropatía y detectar la presencia de neuropatía periférica en aquellos diabéticos asintomáticos<sup>28</sup>.

Por otra parte, la prueba del **monofilamento de Semmes Weinstein (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 PND y con alto riesgo de ulceración y futura amputación<sup>29,30</sup>.

En todos los pacientes con diabetes y PND se deben considerar y descartar otras causas de neuropatía, incluidas las tóxicas (alcohol), los fármacos neurotóxicos

(quimioterapia), la deficiencia de vitamina B12, el hipotiroidismo, la nefropatía, las neoplasias (mieloma múltiple, carcinoma de pulmón), infecciones (HIV), neuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, neuropatías hereditarias y vasculitis<sup>31,32</sup>.

## **2.4. Causas y mecanismos de PND**

Aunque los mecanismos fisiopatológicos que la producen no son del todo conocidos, distintas teorías relacionan factores metabólicos (hiperglucemia crónica), vasculares (isquemia nerviosa) y alteraciones en los mecanismos de la reparación nerviosa<sup>33-35</sup>.

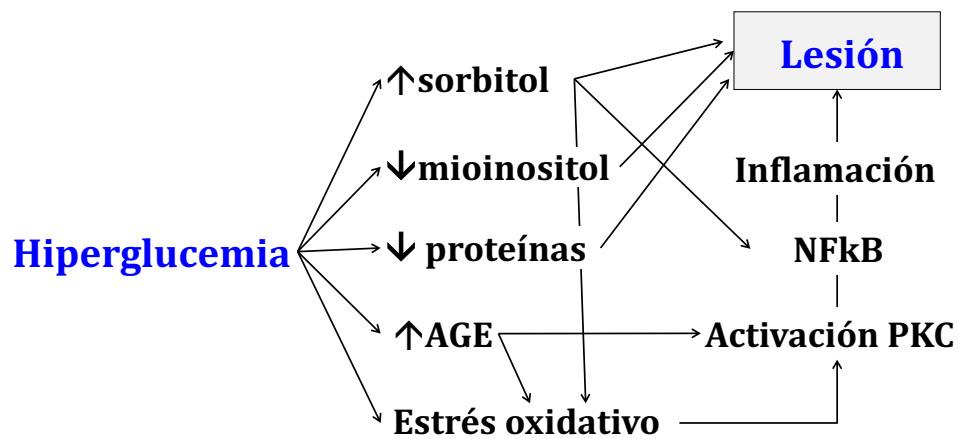
### **2.4.1. Factores clásicos**

La aparición de PND está asociada al control metabólico y edad de duración de la diabetes o tiempo de evolución con un control inadecuado de la diabetes.

La teoría patogénica clásica relaciona la hiperglucemia y aumento de los niveles de HbA1c con una serie de alteraciones que conducen a lesión de los nervios periféricos, entre ellas están: el acúmulo de sorbitol, alteraciones metabólicas del mioinositol, el déficit de síntesis proteica (entre otras de mielina), la glicosilación de las proteínas, los productos finales de glicación avanzada y el estrés oxidativo (figura 2). Las células nerviosas son propensas a lesiones causadas por hiperglucemia ya que la captación de glucosa neuronal se basa en la concentración de glucosa externa<sup>36</sup>.



Figura 2  
**Mecanismos lesionales de los nervios periféricos relacionados con la hiperglucemia**



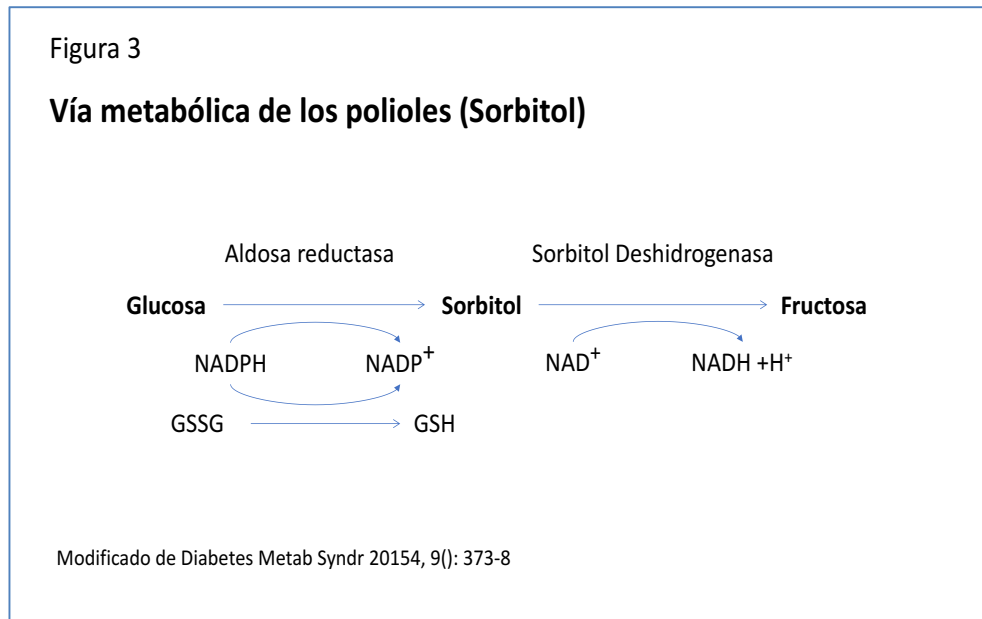
**Pie de figura 2.** AGE = productos finales de glicación avanzada; PKC = protein quinasa C; NFkB = factor nuclear kapa B.

- Acúmulo de sorbitol en el tejido nervioso (independiente de la insulina), este acúmulo de sorbitol en el nervio produce edema y disfunción celular, por efecto tóxico directo y por efecto osmótico que produce edema del nervio<sup>37,38</sup>.

La hiperglucemia induce un aumento del metabolismo de la glucosa a través de la vía poliólica. En esta se produce la conversión de glucosa en sorbitol y fructosa (azúcares poliólicos) a través de la activación de las enzimas aldosa reductasa con el cofactor nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) y sorbitol deshidrogenasa con nicotinamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>) como cofactor; respectivamente<sup>39</sup>.

El aumento de actividad de esta vía de los polioles conlleva la acumulación del sorbitol en el interior de las células con la consecuente depleción de NADPH, por aumento de su consumo. Esto provoca en el interior celular un aumento de la osmolaridad y edema. A la vez, el agotamiento del NADPH paraliza la

regeneración del glutatión (GSH) que es una antioxidante natural, impidiendo la neutralización de los radicales oxidantes (ROS) y nitrosilantes (NOS), lo que supone un aumento de la susceptibilidad celular al estrés oxidativo (figura 3).



**Pie de figura 3.** NADPH = Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido; NADP<sup>+</sup> = forma oxidada; NAD<sup>+</sup> = Nicotinamida adenina dinucleótido en su forma oxidada; NADH = Nicotinamida adenina dinucleótido; GSH = glutatión; GSSG = glutatión oxidado

- Déficit de mioinositol en plasma y en las células nerviosas, que se normaliza después de la administración de insulina, conduce a alteración de la actividad ATPasa y a disfunción en la conducción nerviosa. En general las alteraciones en el metabolismo del inositol están asociadas con la resistencia a la insulina, así como con las complicaciones microvasculares, neuropatía y cataratas<sup>40,41</sup>.
- Déficit de síntesis proteica (entre otras de mielina). La degeneración distal de las fibras de los nervios periféricos, es consecuencia de la pérdida de mielina y falta de regeneración de las fibras nerviosas<sup>42</sup>.

- La glicosilación de las proteínas y el estrés oxidativo (alteraciones típicas de la diabetes), están relacionadas con la activación de la protein quinasa C (PKC) que es un importante mecanismo lesional<sup>43</sup>. La activación de la vía los productos finales de glicación avanzada (AGE) que actúan sobre receptores específicos (RAGE) presentes en monocitos y células endoteliales llevan a la producción de citoquinas y de moléculas de adhesión. Se ha demostrado que los AGE tienen un efecto sobre las metaloproteinasas de matriz y podrían dañar directamente las fibras nerviosas<sup>44,45</sup>. Pueden dar lugar a cambios estructurales en la matriz extracelular que llevaría a producir alteraciones funcionales nerviosas, por la glicosilación de la tubulina que altera el transporte axonal

Por otro lado, los AGE producen cambios en las células endoteliales arteriales, que darán lugar a microangiopatía endoneural<sup>46</sup>. Además, tras un proceso de isquemia, por estos cambios estructurales y funcionales producidos por la presencia de los AGE llevarán a un proceso de neovascularización en pacientes diabéticos que se traduce en la incapacidad de realizar vasculogénesis compensatoria adecuada en respuesta a eventos vasculares oclusivos agudos.

Estudios de laboratorio con animales diabéticos encuentran una disminución de la densidad vascular tras isquemia en el miembro inferior. Estudios angiográficos en humanos demuestran menos vasos colaterales en pacientes diabéticos en comparación con controles no diabéticos. Clínicamente, la incapacidad de vasculogénesis compensatoria adecuada en respuesta a la isquemia contribuye a un aumento de las tasas de amputación. Los AGE parecen desempeñar un papel central en este fracaso<sup>47</sup>.

Otra consecuencia del aumento de los niveles de AGE es la activación de NF- $\kappa$ B potente inductor de un estímulo génico que conduce a una importante respuesta de citoquinas proinflamatorias<sup>48</sup>.

El tratamiento intensivo de la diabetes, tanto tipo 1 como tipo 2, ha demostrado prevenir y retrasar la progresión de la NPD<sup>49</sup>, aunque las lesiones largamente establecidas pueden ser irreversibles a pesar de una mejoría del control metabólico y del control de los factores de riesgo vascular.

El **factor vascular**, está también relacionado con algunas lesiones nerviosas a través de la microangiopatía de los “vasa vasorum” de los nervios que produce hipoxia y alteración isquémica del nervio<sup>50</sup>. Se ha demostrado al examen con microscópica electrónica vasos ocluidos por plaquetas degranuladas en pacientes cuyo estudio electrofisiológico mostró un patrón de denervación asimétrico y distal predominante en algunos pacientes, lo que sugiere que la neuropatía, al menos en parte, se relaciona con múltiples infartos de los pequeños vasos<sup>51</sup>.

El endotelio vascular es un órgano muy activo donde sus células ejercen funciones que van desde la vasodilatación y vasoconstricción hasta funciones pro y anti inflamatorias al ser capaz de sintetizar moléculas con múltiples funciones vasoactivas y hormonales, neurotransmisores, citoquinas, factores de crecimiento, factores quimio-atrayentes, moléculas de adhesión celular y receptores de membrana<sup>49</sup> esto nos explica que la disfunción endotelial tenga relevancia en las complicaciones vasculares en la diabetes y a su vez pudiera tener un papel relevante en la fisiopatogenia de la PND<sup>52</sup>.

La célula endotelial expresa en su membrana receptores específicos para AGE que unidos a estos aumentarán los radicales libres a la vez disminuirán los niveles de antioxidantes intracelulares impidiendo la neutralización de ROS y NOS. Si a este sumamos la acción de los demás factores metabólicos, acrecentando el estrés oxidativo con el consecuente daño celular progresivo favoreciendo esta disfunción endotelial.

Otros factores no relacionados directamente con la diabetes. Son factores neurotóxicos reconocidos en la población general y pueden afectar también al sujeto diabético. Los principales son: alcohol, malnutrición, estados carenciales, infecciones,

factores inmunológicos, etc<sup>53</sup>. Otras complicaciones asociadas a la diabetes tipo 2 como la hipertensión y la dislipemia pueden colaborar en el desarrollo de la PND<sup>54,55</sup>.

#### **2.4.2. Factores nuevos o no clásicos**

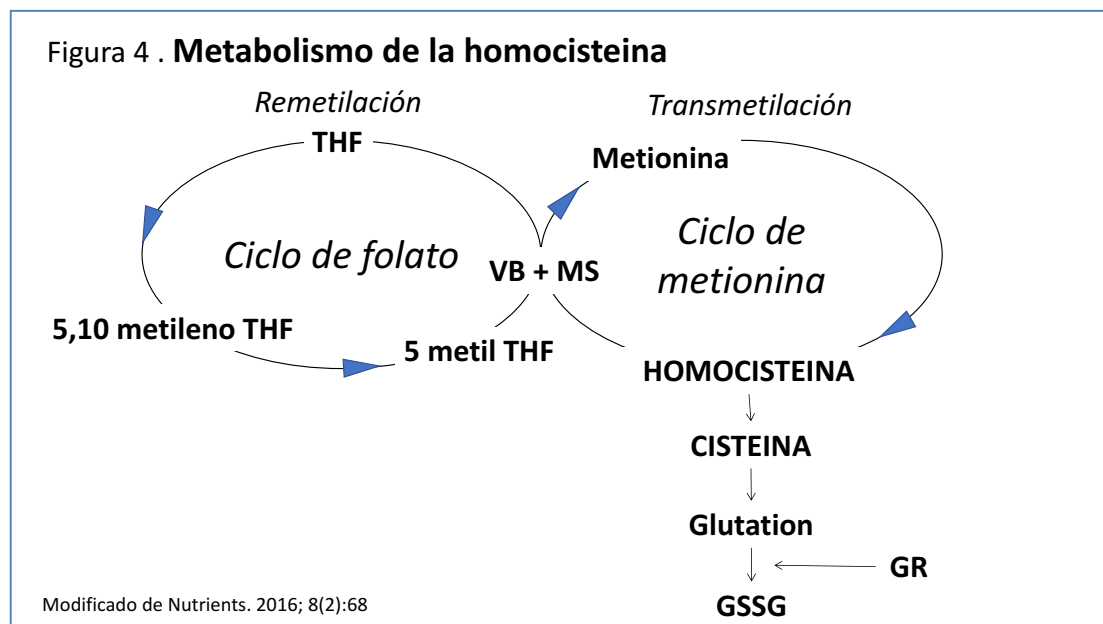
No siempre existe una buena relación entre la presencia de PND y la existencia de los factores clásicos y otros previamente descritos. Hay pacientes con una importante hiperglucemia que no desarrollan neuropatía y otros con hiperglucemia leve o moderada que desarrollan una neuropatía grave.

Los factores etiológicos clásicos no explican o explican parcialmente algunos casos de polineuropatía diabética por lo que diversos autores han intentado buscar nuevos factores que expliquen el desarrollo de neuropatía en algunos casos o que podrían estar relacionados con todos los casos de neuropatía diabética.

Entre estos nuevos factores podemos incluir:

##### **2.4.2.1. La hiperhomocisteinemia.**

La homocisteína o ácido 2-amino-4-sulfamil butanoico, es un aminoácido azufrado importante en la transferencia de grupos metilos en el metabolismo celular y cuyo metabolismo se encuentra en la intersección de 2 vías: la remetilación a metionina que requiere ácido fólico y vitamina B12 y la transsulfuración a cistatión que requiere vitamina B6, coordinadas por la S-adenosilmetionina que actúa como inhibidor alostérico de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) y como activador de la cistatión beta-sintetasa (CBS)<sup>56</sup>, figura 4.



**Pie de figura 4.** THF = tetrahidrofolato; VB = vitamina B12; MS = metionina sintetasa; GR = glutatión reductasa; GSSG = glutatión disulfato u oxidado

Los factores que aumentan las concentraciones plasmáticas de homocisteína, es decir relacionados con la hiperhomocisteinemia, son múltiples y pueden agruparse en:

- Mutaciones enzimáticas relacionadas con la metilentetrahydrofolato reductasa (MTHFR), con la homocisteinametiltransferasa (HMT) y la cistationina  $\beta$ -sintetasa (CS).
- Deficiencia de folatos, piridoxina y fallos en la absorción de la vitamina B12.
- Alteraciones sistémicas como: insuficiencia renal y hepática, hipotiroidismo, neoplasias y trasplantes.
- Factores farmacológicos y tóxicos como el consumo desmesurado de café y alcohol, tabaquismo, administración de metionina oral y algunos inhibidores<sup>4</sup>.

- Presencia plasmática de oxisterol, proveniente de la ingesta de alimentos de origen animal.

La hiperhomocistinemia se considera un factor de riesgo para la enfermedad cardiovascular y renal <sup>57,58</sup>. Por diversos mecanismos como lesión del endotelio vascular mediado por un incremento del estrés oxidativo (EO) y por la activación de mediadores inflamatorios de la pared vascular. La asociación de hiperhomocisteinemia con lesiones tisulares en diversos territorios ha sido también descrita en sujetos con diabetes tipo 2<sup>59</sup>.

Finalmente, algunos autores han relacionado la hiperhomocisteinemia con la PND, aunque sigue opiniones encontradas.

Recientemente nuestro grupo ha demostrado una asociación independiente entre los niveles de homocisteína con la PND.

Se encontró una asociación independiente de los niveles plasmáticos de homocisteína con la gravedad de la PND, además, se pudo establecer 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. La relación entre la neuropatía con los niveles de homocisteína se mantuvo después de corregir los factores de confusión, como fueron HbA1c, la duración de la diabetes y la edad<sup>60</sup>.

En otro trabajo se relacionaron los niveles de homocisteína, microalbuminuria, HbA1c en pacientes diabéticos tipo 2 con ulceración de pie. Relacionando por cada aumento de 1  $\mu\text{mol}$  en los niveles de homocisteína plasmática hubo un aumento del 10% en el riesgo de ulceración del pie diabético<sup>61</sup>.

La relación entre la hiperhomocisteinemia y la PND puede deberse a diversos mecanismos entre ellos el incremento del estrés oxidativo <sup>62</sup> y, en estudios experimentales y clínicos, se ha postulado que puede afectar la función nerviosa por efecto citotóxico directo o por daño oxidativo de la célula endotelial de los pequeños vasos de la pared del nervio<sup>63,64</sup>.

#### 2.4.2.2. Estrés oxidativo

Los factores metabólicos, anteriormente citados, confluyen en una misma vía o mecanismo de actuación que es la agresión oxidativa o estrés oxidativo, podemos decir que hay una relación entre el aumento de los radicales libres de oxígeno y la diabetes. Y si sumamos que la diabetes afecta a los mecanismos de defensa antioxidante esto nos lleva a estrés oxidativo que provoca daño neuronal. Así pues, podemos decir que otro factor implicado en la patogenia de la neuropatía diabética es el estrés oxidativo. Consideramos estrés oxidativo al desequilibrio entre la producción de radicales libres y la capacidad defensiva antioxidante<sup>65</sup>.

La mitocondria utiliza el oxígeno y los sustratos, principalmente derivados de la glucosa, para producir energía celular en forma de ATP; de esta manera, los electrones provenientes de los sustratos oxidados son transferidos al oxígeno, por una serie de reacciones de reducción para generar agua. El oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) se caracteriza por tener dos electrones desapareados, su reducción se lleva a cabo en cuatro reacciones seriadas (cadena respiratoria mitocondrial), lo que da lugar a la formación de intermediarios altamente reactivos que son conocidos como especies reactivas de oxígeno para llegar finalmente hasta la formación de agua y ATP.

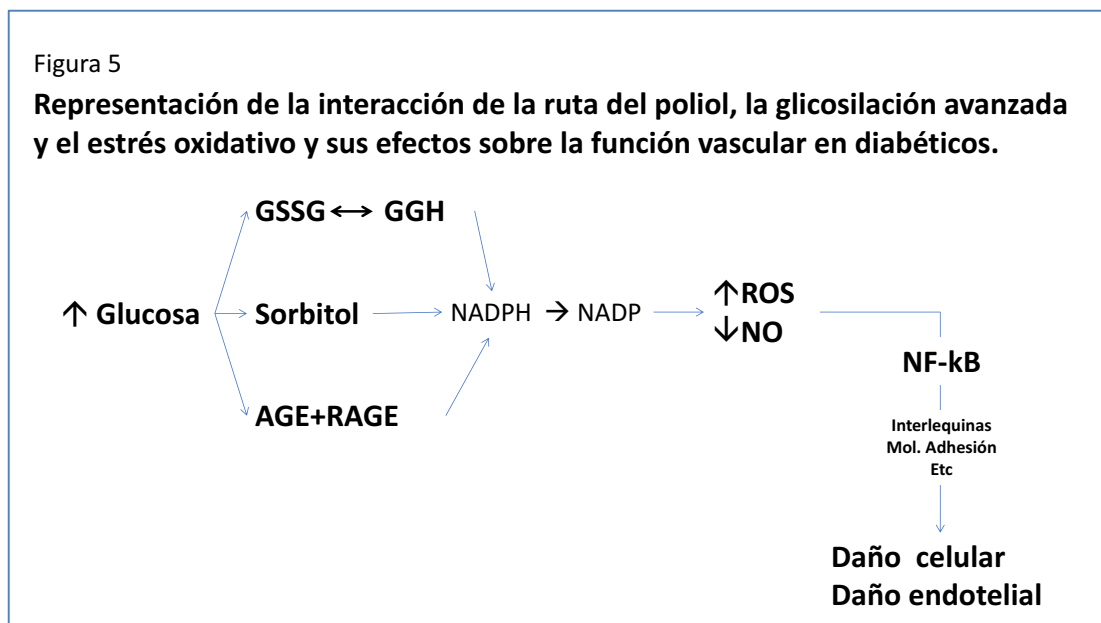
En la diabetes la hiperglucemia es precursora de los mecanismos metabólicos descritos anteriormente, estos mecanismos favorecen la formación de ROS en la cadena respiratoria mitocondrial al producir altas concentraciones de donantes de electrones como NADH y FADH<sub>2</sub>, particularmente debido a la vía del poliol; la activación de la PKC también ayuda a la sobreproducción de O<sub>2</sub><sup>-</sup>.

El exceso de las especies reactivas de oxígeno, generadas por las mitocondrias, al acumularse se relacionan con incremento del estrés oxidativo que conlleva la alteración en el funcionamiento mitocondrial, procesos apoptóticos, acumulación de agregados intracelulares, lesión del DNA mitocondrial y excitotoxicidad con anomalías en el transporte axónico y edema en las terminales axónicas de nervios del sistema nervioso periférico que llevan a la degeneración neuronal<sup>66</sup>.



Este proceso dependiente de la mitocondria se postula como un mediador de las complicaciones por estrés oxidativo de la diabetes. Por otra parte, existe una vía común que añade el estrés oxidativo con la microangiopatía para incrementar la lesión en el nervio. Este factor relacionado con la microangiopatía en el nervio incluye la alteración en el flujo sanguíneo y la hipoxia endoneural.

La existencia de un punto común en el que la disfunción mitocondrial y el subsiguiente estrés oxidativo pueden conducir y potenciar los cambios vasculares que llevarían a generar el daño vascular responsable de la microangiopatía de la diabetes. Y que al darse en las células nerviosas podrían considerarse otro factor en el daño al tejido nervioso que favorecerá la génesis de la neuropatía (figura 5).



**Pie de figura 5.** GSSG = glutatión oxidado; GGH = glutatión; ROS = especies reactivas de oxígeno; NO = óxido nítrico; AGE = productos finales de glicación avanzada; RAGE = receptores de los AGE; NADPH = nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; NADP<sup>-</sup> = forma reducida

El estrés oxidativo mediado por la hiperglucemia también activa otras vías celulares como Nrf2 y NFkB. La activación de la vía Nrf2 o factor nuclear derivado de eritrocitos tipo 2 regula la expresión de proteínas antioxidantes y citoprotectoras que protegen

de la lesión y la inflamación, a través de los mecanismos antioxidantes, esto es un mecanismo protector, pero la activación persistente y prolongada mediada por la hiperglucemia crónica lleva al agotamiento del sistema y a una situación de desprotección, por otro lado, la activación de NFkB o *factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas* y su unión a la región kappa del genoma, facilita la transcripción de esta región kappa del genoma aumentando la producción de citoquinas inflamatorias<sup>67,68</sup>. Se sabe que factores inflamatorios y el EO confluyen en una vía común de lesión a través de NFkB es un complejo proteico que controla la transcripción del ADN, como respuesta a estímulos celulares nocivos<sup>69,70</sup>.

En estudios anteriores de nuestro grupo encontró un aumento del estrés oxidativo relacionado con la polineuropatía periférica.

#### **2.4.2.3. Mecanismos de inflamación crónica**

La inflamación, como respuesta homeostática de los tejidos vascularizados a un estímulo nocivo, puede darse para: restaurar la función normal de un tejido o para eliminar un agente nocivo.

Uno de los factores fisiopatológicos de la neuropatía diabética está relacionado con la incapacidad de regeneración de la célula nerviosa y esto podría radicar en un proceso inflamatorio alterado o disfuncional. Cuando este proceso inflamatorio tiende a perpetuarse convirtiéndose en un proceso crónico, la inflamación deja de ser un proceso de restauración tisular pasando a la destrucción del tejido nervioso con su consecuente pérdida de función.

La inflamación crónica se caracteriza por el infiltrado de linfocitos y macrófagos, a la vez que se da la presencia simultánea de procesos lesivos y de reparación. En el proceso inflamatorio intervienen muchos mediadores; variará en función de los distintos tipos de células de los infiltrados y de la participación de distintos mediadores químicos.

NF- $\kappa$ B es un importante modulador de la inflamación ya que desarrolla un papel central en la expresión de muchos genes clave en la respuesta inflamatoria<sup>71</sup>, regula la transcripción de moléculas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-2, TNF- $\alpha$ , entre otras), moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM, E-selectina) y enzimas (óxido nítrico sintetasa inducida y la ciclooxigenasa 2)<sup>72</sup>, que tienen un importante papel en la regulación de la respuesta inmunitaria e inflamatoria. Como consecuencia de la interacción de todos estos productos con receptores de membrana específicos se desencadena una cascada de reacciones bioquímicas en el interior de la célula diana que determina su acción biológica<sup>73</sup>.

Como hemos mencionado, es necesario conocer nuevos factores que se asocien con la patogenia de la PND, a fin de facilitar su prevención y tratamiento. Si conocemos como se relacionan los fenómenos inflamatorios con la PND, podremos identificar nuevas estrategias y dianas terapéuticas. Recordemos que no existen tratamientos específicos para evitar la progresión de la PND.

### **3. Papel de CXC en la inflamación y la angiogénesis**

Las quimioquinas son pequeñas proteínas no mayores de 8–10 kDa, que forman una familia de citoquinas quimioattractivas que tras la unión a sus receptores específicos son capaces de controlar la migración y residencia de todas las células inmunes, e intervienen en muy diversas funciones inmunes y no inmunes, participando en múltiples funciones fisiológicas y patológicas. Al inducir la migración de células inmunes juegan un papel crítico en la inmunidad innata, así como el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa y el mantenimiento de la inflamación crónica<sup>74</sup>. Algunas quimioquinas se consideran pro-inflamatorias, y están relacionadas con infecciones e inflamación, mientras que otras se consideran homeostáticas y participan en el control de la migración celular durante el desarrollo de tejidos o durante su mantenimiento<sup>75,76</sup>. Actualmente, sabemos que las quimioquinas están involucradas en numerosos procesos biológicos no bien conocidos, además, para

aumentar su complejidad fisiológica, conocemos que su función in situ puede ser influenciada significativamente por la formación de heterodímeros<sup>77</sup>.

La importancia fisiológica de esta familia de mediadores depende de su especificidad, las principales sub-familias de quimioquinas se clasifican según la posición de los 2 primeros residuos de cisteína y son denominadas CXC, CC, C y CX3C. El subgrupo CXC, que tiene dos residuos con cisteína separados por otros residuos (C-X-C) es el mayor y como regla general son quimiotácticas para los neutrófilos y otras células inmunes (monocitos y linfocitos)<sup>78</sup>. La clasificación de las quimioquinas CXC y sus funciones vienen en la tabla 1<sup>79</sup>.

Tabla 1		
Quimioquinas CXC y su función		
Quimioquina	Otro nombre	Función inmune
CXCL1	GROalfa	Trafico de neutrófilos
CXCL2	GRObeta	Trafico de neutrófilo
CXCL3	GROgamma	Trafico de neutrófilo
CXCL4	PF4	Procoagulante
CXCL5	ENA7B	Trafico de neutrófilo
CXCL6	GCP-2	Trafico de neutrófilo
CXCL7	NAP-2	Trafico de neutrófilo
CXCL8	IL-8	Trafico de neutrófilo
CXCL9	MIG	Respuesta de Th1 y tráfico de Th1, CD8 y NK
CXCL10	IP-10	Respuesta de Th1 y tráfico de Th1, CD8 y NK
CXCL11	I-TAC	Respuesta de Th1 y tráfico de Th1, CD8 y NK
CXCL12	SDF-1	Médula ósea
CXCL13	BLC	Posicionamiento de cel B y Tfh
CXCL14	BRAK	Acción sobre macrófagos
CXCL15	Lungkine	¿?

Tabla 1

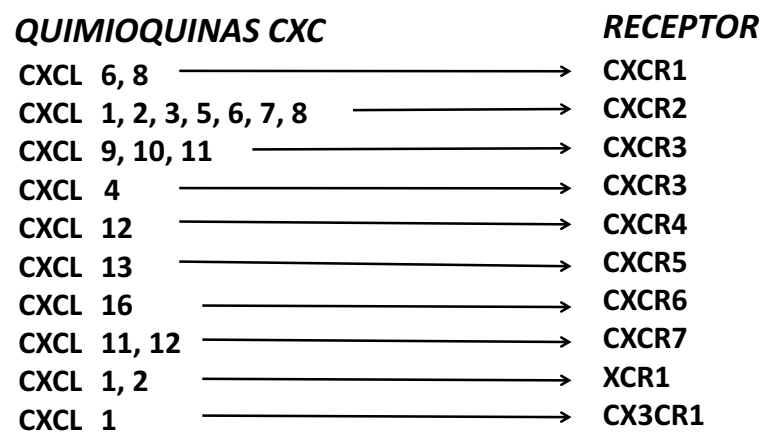
**Quimioquinas CXC y su función**

Quimioquina	Otro nombre	Función inmune
CXCL16	5R-PSOX	Migración y supervivencia de NK y ILC
CXCL17	DMC	¿?
XCL1	SCM-1alfa	Presentación de CD8+
XCL2	SCM-1beta	Presentación de CD8+
CX3CL1	Fractalkina	NK, monocitos y migración cel T

La mayoría de sus efectos se producen por señalización tras unión a receptores de las quimioquinas, son receptores acoplados a la proteína G (GPCR), de forma resumida exponemos la relación entre quimioquinas CXC y su receptor, figura 6.

Figura 6

**Diagrama simplificado de las quimioquinas CXC y su receptor**



Modificado de Zlotnik *et al.* *Genome Biology* 2006 y Altara *et al.* *Clin Sci (Lond)*. 2016

La situación es, en ocasiones, confusa, porque las quimioquinas y sus receptores son promiscuos y con interacciones complejas, una quimioquina puede actuar sobre

diferentes receptores y un receptor puede ser activado por diferentes ligandos (quimioquinas)<sup>80</sup>

Muchas quimioquinas y sus receptores se agrupan en localizaciones cromosómicas definidas. Se han reconocido dos grupos principales que codifican las quimioquinas inflamatorias esenciales: el grupo CXC, localizado en el cromosoma 4q12-21, y el grupo CC, localizado en el cromosoma 17q11.2. Las quimioquinas que se mapean en los grupos CXC y CC parecen mantener algunas funciones específicas, que ya hemos comentado, las quimioquinas del grupo CXC reclutan principalmente neutrófilos mientras que los miembros del grupo CC típicamente atraen células mononucleares<sup>76</sup>.

Algunos miembros de la familia CXC presentan otra diferencia estructural el denominado ERL, se trata de una secuencia de tres aminoácidos Glu-Leu-Arg que precede a la primera cisteína, y que condiciona su capacidad para actuar como moléculas angiogénicas, es decir, para promover la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros existentes. CXCL8 (IL-8) y CXCL1 (Gro- $\alpha$ ) son ejemplos de quimioquinas con ERL que actúan a través del receptor CXCR2. Para las quimioquinas sin ERL, como CXCL4 (PF4), CXCL9 (Mig), CXCL10 (IP-10) y CXCL11 (ITAC), que actúan a través del receptor CXCR3, se ha descrito actividad angiostática, es decir, capacidad de bloquear la formación de nuevos vasos<sup>81</sup>. Estas quimioquinas despiertan un especial interés dado que suman su acción angiostática con la de la migración celular en procesos inflamatorios.

En general, las quimioquinas CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7 y CXCL8 son clasificadas como inflamatorias; CXCL12 y CXCL13 como homeostáticas. CXCL9, CXCL10, CXCL11 y CXCL16 como duales con función inflamatoria y homeostática<sup>82</sup>.

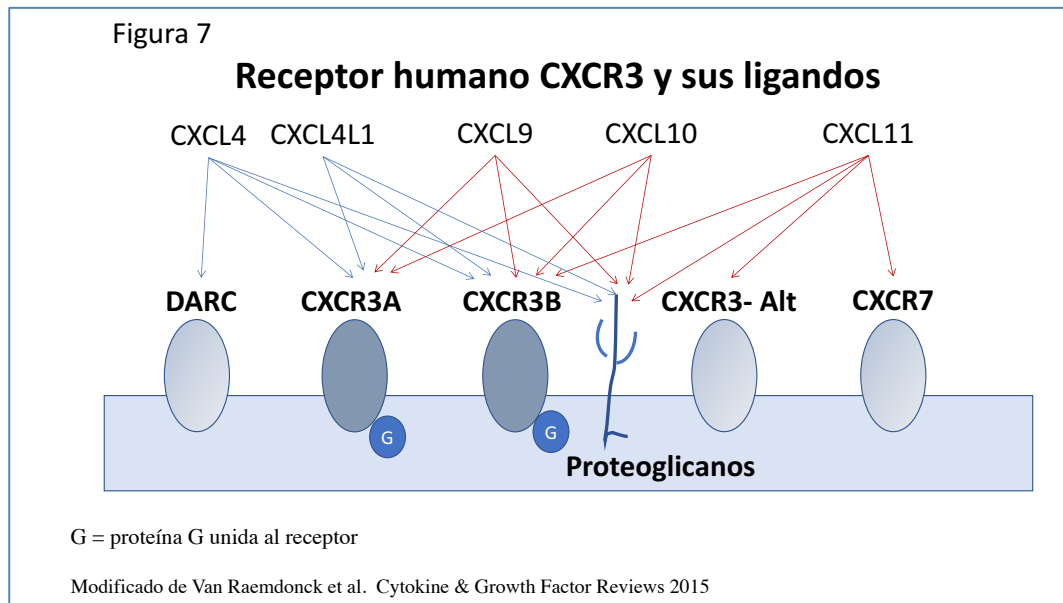
Sin embargo, su papel no está totalmente aclarado, por ejemplo, la CXCL13 parece ser el principal determinante para el reclutamiento de células B en el sistema nervioso central en diferentes enfermedades neuroinflamatorias. Por lo tanto, los niveles elevados de CXCL13 en líquido cefalorraquídeo reflejan más bien una

importante respuesta inmune humoral en el compartimento en entidades específicas<sup>83</sup>.

#### **4. Grupo de quimioquinas ligandos del receptor CXCR3**

El grupo de quimioquinas CXCL9/MIG (*Monokine induced by gamma interferon*), CXCL10/IP-10 (*Interferon gamma-induced protein 10*), CXCL11/I-TAC (*Interferon gamma-induced protein 9*) son, como hemos expuesto, son los ligandos del receptor CXCR3, y representan un grupo diferenciado de quimioquinas inflamatorias y angiostaticos. Compiten con diferentes factores angiogénicos como “vascular endothelial growth factor” (VEGF) y el “basic fibroblast growth factor” (FGF2) uniéndose a los proteoglicanos presentes en las células endoteliales.

El receptor CXCR3, al contrario que otros receptores de quimioquinas, está regulado por un gen situado en el cromosoma X, en la región q13<sup>84</sup>. Este receptor se expresa en diferentes células del sistema inmune y en otras células no inmunes. La expresión también varía por la existencia de diferentes variantes de CXCR3. En la mayoría de las células, incluyendo los leucocitos, la forma predominante es la CXCR3A, en contra en las células endoteliales la variante que expresan es CXCR3B, estas formas explican la diferencia de actividad de los ligandos. Posteriormente se describió en humanos una tercera forma CXCR3-alt. Los ligandos actúan uniéndose a diferentes formas del receptor (figura 7).



**Pie de figura 7:** CXCR3 = receptor de quimioquinas tipo CXC tipo 3; CXCR3A, CXCR3B, CXCR3-Alt = subtipos A, B y Alt del receptor CXCR3; DARC = Receptor para la quimioquina tipo 4 o CXCL4; CXCR7 = receptor de quimioquinas tipo CXC tipo 7; CXCL4 CXCL4L1, CXC 9, 10 y 11 = quimioquinas del grupo CXC.

Los efectos de estas quimioquinas, como hemos comentado, se deben a la activación del receptor CXCR3 que se expresa en la superficie de diferentes células, se ha descrito en linfocitos T activados, células dendríticas, células “*natural killer*”, fibroblastos, células epiteliales, células de músculo liso y en células endoteliales<sup>80</sup>.

La activación de los receptores de las quimioquinas induce una serie de vías de señalización, así como la activación de integrinas, quinasas relacionadas con proteínas G y la unión de beta-arrestina<sup>85</sup>. La quimioquina CXCL10 ha mostrado actividad agonista completa regulada por señal extracelular ERK 1/2 fosforilación y actividad agonista parcial para el reclutamiento de beta-arrestina<sup>86</sup>.

Los ligandos de este receptor (CXCR3) y sus variantes son producidos por diferentes células tras ser inducidos por diversos factores (tabla 2).

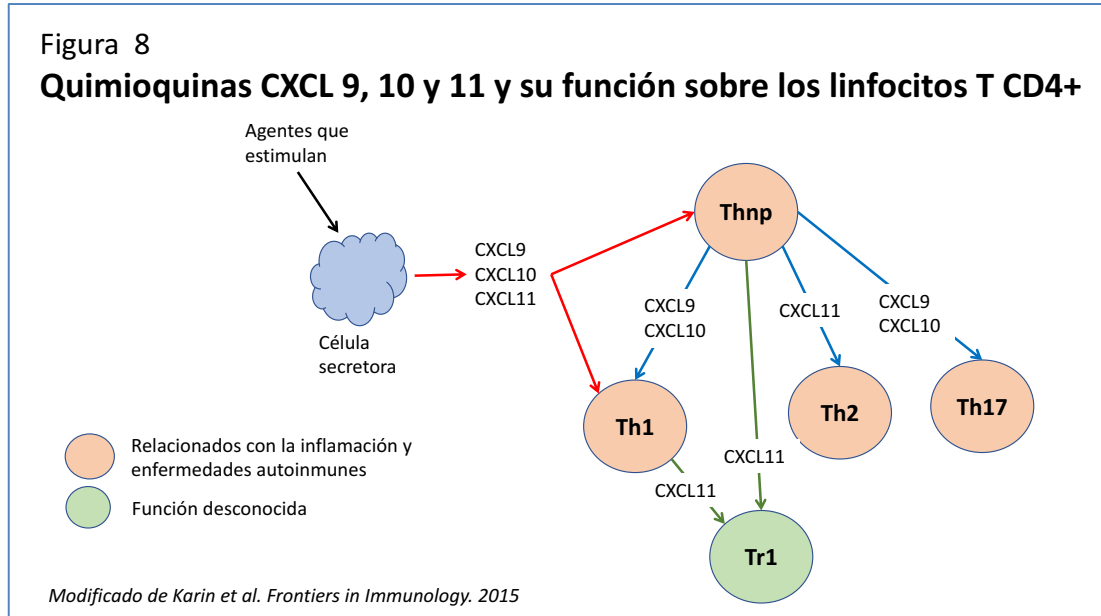


Tabla 2 Ligandos del receptor humano CXCR3: CXCL4, CXCL9, CXCL10 y CXCL11				
	CXCL4	CXCL9	CXCL10	CXCL11
<b>Principales células productoras</b>	Plaquetas Monocitos Linfocitos T	Células endoteliales de pequeños vasos Macrófagos Células mononucleares periféricas	Células endoteliales de pequeños vasos Fibroblastos Monocitos Linfocitos T Células cutáneas	Fibroblastos Astrocitos Células mononucleares periféricas
<b>Inductores</b>	Trombina (plaquetas) Linfocitos T	IFN-gamma	TNF-alfa (fibroblastos) IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gamma	TNF-alfa (fibroblastos) IFN-gamma, IFN-beta

Dado su naturaleza pleiotrópica, los ligandos de CXCR3, el grupo de quimioquinas CXCL10, CXCL9 y CXCL11 son inflamatorias y angiostáticas<sup>87</sup>. Juegan un papel importante en la inmunidad y la angiogénesis y por lo tanto desempeñan un papel fundamental en la salud y en diversas patologías relacionadas con la angiogénesis y con alteraciones inmunológicas (autoinmunidad, infecciones, cáncer) y la actuación sobre estos factores se ha establecido como posibles tratamientos de estas patologías.

Estudios sobre la función de estas quimioquinas, indican que el receptor CXCR3 activado por sus ligandos CXCL10 y CXCL9 puede activar distintas vías inflamatorias, mientras que CXCL11 predominantemente podría inducir fisiológicamente la internalización de CXCR3<sup>74</sup>. Como hemos expuesto en la tabla 1 las quimioquinas CXCL9, CXCL10 y CXCL11 participan en la respuesta de las células inflamatorias Th1 (linfocitos cooperadores), CD8 (linfocitos citotóxicos) y NK (linfocitos destructores de

la célula diana o “natural killer”). La acción de las quimioquinas sobre la activación de linfocitos T CD4+ (células Th) viene en la figura 8.



**Pie de figura 8.** CXCL = quimioquina del grupo CXCL; Thnp = precursor de Th; Th1 = linfocitos T helper que activan los macrófagos e inflamación; Th2 = linfocitos T helper con efecto transcriptor génico y controlador del efecto de Th1; Th17 = linfocitos helper relacionado con enfermedades inflamatorias y autoinmunes; Tr1 = linfocitos con función en el mantenimiento de la autotolerancia.

Indicando la modulación de estas quimioquinas sobre los linfocitos Th y las funciones y patología con ellos relacionada.

Recientemente, los ligandos de CXCR3 han demostrado efectos diferentes y podríamos considerar a CXCL9 y CXCL10 una acción proinflamatoria, ejercida a través de que inducen a las células Th1 / Th17 efectoras para promover la inflamación, esta acción inflamatoria se ha demostrado incluso en ratones transgénicos carentes de CXCR3, y se han relacionado con la gravedad de diferentes enfermedades autoinmunes, incluyendo la diabetes mellitus tipo I y la encefalomiелitis autoinmune experimental. La CXCL11, con una afinidad de unión relativamente mayor a CXCR3, impulsa la inhibición de esta vía y por lo tanto, podría amortiguar la inflamación. Por

lo que CXCL9 / CXCL10 activa una cascada de señalización diferente de CXCL11, a pesar de la unión al mismo receptor, CXCR3, lo que resulta en estas diversas actividades biológicas<sup>88</sup>.

### **5. El sistema CXCL9, CXCL10 y CXCL11 y su receptor CXCR3 y su relación con múltiples enfermedades:**

La CXCL10 y su unión al receptor CXCR3 parecen contribuir a la patogénesis de muchas enfermedades autoinmunes organoespecíficas, como diabetes tipo 1, la enfermedad de Graves y la oftalmopatía de Graves) o sistémicas como lupus eritematoso sistémico, crioglobulinemia mixta, síndrome de Sjogren o esclerosis sistémica. La secreción de CXCL10 por CD4 +, CD8 +, y natural “killer” es dependiente de IFN- $\gamma$ . El aumento de los niveles plasmáticos de CXCL10 es un marcador de una respuesta inmune agresiva<sup>89</sup>. La patología relacionada con el sistema de quimioquinas relacionadas con el receptor CXCR3 vienen en la tabla 3.

Tabla 3 <b>Patologías relacionadas con el sistema CXCL9, 10 y 11 / CXCR3</b>	
Cáncer	Carcinoma y sarcoma cáncer de mama, melanoma, colon, esófago, renal, ovario. Leucemias, linfomas y mielomas Trombocitopenia
E. autoinmunes organoespecíficas	Diabetes tipo 1 Hepatitis crónica autoinmune Enfermedad de Graves. Oftalmopatía de Graves Tiroiditis de Hashimoto

Tabla 3 <b>Patologías relacionadas con el sistema CXCL9, 10 y 11 / CXCR3</b>	
E. autoinmunes /inflamatorias sistémicas	Artritis reumatoide Lupus eritematoso sistémico Crioglobulinemia mixta Síndrome de Sjogren
E. cardiovascular	Arteriosclerosis Hipertensión Hipertrofia cardíaca Insuficiencia cardíaca
E. inflamatoria intestinal	Enfermedad de Crohn Colitis ulcerosa
S. nerviosos	Encefalomiелitis autoinmune Esclerosis múltiple Enfermedad de Alzheimer Síndrome de Opsoclonus-mioclonus
Otras	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica HIV Dermatosis inflamatorias. Psoriasis Malaria Rechazó de trasplantes

Estas quimioquinas estimulan los factores inflamatorios en diversas patologías, tan diferentes como: La enfermedad pulmonar obstructiva crónica<sup>90</sup>; la hepatitis crónica autoinmune<sup>91</sup> y están relacionadas con su evolución<sup>92</sup>; también se han relacionado con la carga viral mantenida en pacientes con HIV<sup>93</sup>; con algunas dermatosis inflamatorias<sup>94</sup>; e incluso con rinitis alérgicas<sup>95</sup>. Por otro lado, se han relacionado con la psoriasis, buscando la posibilidad de inhibir el eje CXCR3/CXCL10 para controlar esta enfermedad<sup>96</sup>.

La **artritis reumatoide** ha sido relacionada con este sistema de quimioquinas, y en estos pacientes se ha encontrado un aumento del reclutamiento de células T que expresan CXCR3 en el tejido sinovial inflamado, con un aumento de CXCL9 y CXCL10 en el líquido sinovial y en el tejido articular<sup>97</sup>. Encontrando también lesiones endoteliales en esta patología inflamatoria.

La **enfermedad inflamatoria intestinal** ha sido también relacionada con alteración del sistema controlado por CXCR3 tanto la enfermedad de Crohn como la colitis ulcerosa. Se ha encontrado aumento de los niveles de CXCL4 y de CXCL10 en los brotes de estas enfermedades inflamatorias, con acúmulo en mucosa intestinal de células inflamatorias<sup>98</sup>. Considerando que estas quimioquinas inducibles por IFN-gamma podrían contribuir a la progresión de la enfermedad inflamatoria intestinal y podrían desarrollarse nuevas estrategias terapéuticas basadas en este eje<sup>99</sup>.

**Neoplasias.** Estas quimioquinas se han relacionado con gran variedad de carcinomas y sarcomas. Además, la angiogénesis tiene un importante papel en el crecimiento y extensión de las neoplasias<sup>100</sup>. Posiblemente este sistema quimioquinas-receptor puede intervenir en la extensión tumoral y, por otro lado, algunos ligandos pueden suprimir la angiogénesis y actuar como agentes antitumorales<sup>101</sup>.

Se han relacionado con muchos tumores humanos y con mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama, melanoma, cáncer de colon y neoplasias renales. Otras neoplasias hematopoyéticas que afectan a los leucocitos y sus progenitores como la leucemia, linfomas y mielomas están también relacionadas con estas quimioquinas<sup>102</sup>.

De las tres variantes del receptor CXCR3 (CXCR3-A, CXCR3-B y CXCR3-alt). Las dos primeras CXCR3-A y CXCR3-B pueden tener funciones fisiológicas opuestas, mientras CXCR3-A, la forma predominante en las células hematopoyéticas, parece mediar la proliferación celular, la invasión y las metástasis; la CXCR3-B, parece mediar la señalización de parada del tumor, es decir la supresión del crecimiento, la apoptosis

y la involución vascular. Como vemos, faltan muchos datos para conocer bien el papel fisiológico y en patología de este sistema tan complejo<sup>103</sup>.

Otro estudio<sup>104</sup>, encuentra una relación entre alta expresión de CXCL10 con el desarrollo de tumores y puede afectar el pronóstico en varios cánceres. En este estudio se encontró que CXCL10 fue un factor pronóstico independiente y se pudo predecir con una supervivencia general favorable a 5 años. Concluyendo, que el aumento de la expresión de CXCL10 es un factor pronóstico independiente en el carcinoma esofágico. Recientemente CXCL9 y 10 se han relacionado con inhibición en el cáncer de ovario<sup>105</sup>, y con las metástasis en el cáncer de mama<sup>106</sup>, Así como con la evolución de múltiples tumores.

Algunos autores encuentran implicaciones clínicas potenciales para la terapia de autoinmunidad en la enfermedad de injerto contra huésped y en múltiples tipos de cáncer<sup>107</sup>.

Parece que también pueden intervenir en el dolor del cáncer óseo, a través de la inducción y mantenimiento del dolor<sup>108</sup>. Siguiendo estas líneas se han desarrollado pequeñas moléculas antagonistas CXCR3 y está en investigación su papel terapéutico<sup>109</sup>.

**Enfermedades endocrino-metabólicas.** Las funciones de las quimioquinas siguen siendo investigadas, se ha postulado el posible papel de CXCL10 en la facilitación de la autoinmunidad y en el desarrollo de la diabetes tipo 1<sup>110</sup>. Muchos estudios han sugerido que los receptores de quimioquinas CXCR3, CXCR5, CXCR6 y CXCR7 son determinantes en el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 1, especialmente en la autoinmunidad y la destrucción de las células  $\beta$ . En particular, los niveles circulantes de CXCL10 es alto en pacientes DM1, lo que sugiere que CXCL10 podría ser un candidato para un marcador predictivo y que el bloqueo del eje CXCL10 / CXCR3 en la fase inicial de la diabetes parece que podría ser una estrategia para el tratamiento de la DM1<sup>111</sup>.

Las quimioquinas CXCL9, CXCL10 y CXCL11, a través de la activación del sistema PPAR se ha descrito que podrían contribuir en el desarrollo de patología tiroidea como es la tiroiditis autoinmune y la enfermedad de Graves y, además, podrían contribuir al desarrollo de la oftalmopatía de Graves. Los agonistas de PPAR- $\gamma$  muestran un fuerte efecto inhibitor sobre la expresión y liberación de quimioquinas ligandos de CXCR3, se ha demostrado in vitro, en diversos tipos de células, tiroideas, en fibroblastos orbitarios, preadipocitos y mioblastos de pacientes con oftalmopatía de Graves<sup>112</sup>.

**Patología cardiovascular.** Las quimiocinas que activan el receptor CXCR3, se han relacionado con alteraciones inmunitarias e inflamatorias en el músculo liso vascular y en las células endoteliales y tienen una importante función vascular fisiológica. En la última década, la evidencia de estudios preclínicos y clínicos ha revelado la participación de CXCR3 y sus ligandos en múltiples enfermedades cardiovasculares (ECV) de diferentes etiologías<sup>113</sup>, incluyendo aterosclerosis, hipertensión arterial, cardiopatía hipertrófica y en la insuficiencia cardíaca. Además, pueden tener utilidad como biomarcadores diagnósticos y pronósticos<sup>114</sup>. Se han relacionado incluso con los mecanismos del rechazo cardíaco tras trasplante<sup>115</sup>.

El eje CXC se ha implicado en patologías frecuentes como la aterosclerosis. De hecho, se ha observado una mayor infiltración de linfocitos T activados en la placa aterosclerótica en respuesta a las quimioquinas CXCL9, CXCL10 y CXCL11<sup>116</sup>. Estos hallazgos demuestran que ligandos de CXCR3, a través de diferentes mecanismos, contribuyen a la progresión de la arteriosclerosis<sup>Error! Marcador no definido.,117</sup>.

Las quimioquinas modulan la respuesta inflamatoria en pacientes con arteriosclerosis, interviniendo en la vulnerabilidad de la placa y en el infarto cerebral. Así como en el proceso post-isquémico cerebral, las quimioquinas intervienen tanto en la lesión como en la reparación, modulan procesos cruciales, como el reclutamiento y la activación de las células inflamatorias, la supervivencia neuronal y la neoangiogénesis. Por otro lado, las quimioquinas CXC también podrían modular las células madre, favoreciendo así la reparación tisular<sup>118</sup>, estos conocimientos han

abierto un nuevo campo en el desarrollo de nuevos tratamientos en este campo de la isquemia cerebral.

### **Sistema nervioso central**

En la esclerosis múltiple la activación de la microglia y de los macrófagos desempeñan un papel importante en el desarrollo de la desmielinización, pero los factores desencadenantes son mal conocidos. Las quimioquinas y especialmente CXCL10 incrementan la liberación de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, IL-1 $\beta$  y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Altos niveles de CXCL9, CXCL10, CXCL11 se expresaban selectivamente en infiltrados inflamatorios en áreas de desmielinización<sup>119</sup>, faltan estudios para conocer a fondo el papel de las quimioquinas y las posibilidades terapéuticas basadas en la intervención sobre esta vía.

En la enfermedad de Alzheimer también se ha demostrado que los astrocitos segregan múltiples quimioquinas que pueden producir un trastorno inflamatorio crónico del sistema nervioso central. El nivel de quimioquinas y sus receptores en suero, líquido cefalorraquídeo y tejido cerebral se ha visto significativamente alterado en pacientes con enfermedad de Alzheimer. Se ha estudiado la participación de las quimioquinas y sus receptores en la enfermedad de Alzheimer, entre las implicadas están MCP-1/CCR2, fractalkine/CX3CR1, SDF-1 $\alpha$ /CXCR4, MIP-1 $\alpha$ /CCR5, IP-10/CXCR3, IL-8/CXCR1, CXCR2, RANTES/CCR1, CCR3, CCR5, para algunos autores estos conocimientos proporcionarían una nueva estrategia y objetivos más específicos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer<sup>120</sup>.

Estas quimioquinas se han relacionado, también, con el síndrome de Opsoclonus-mioclonus (OMS) infantil, trastorno neuroinflamatorio asociado remotamente con el cáncer y está relacionado con estas quimioquinas<sup>121</sup>.

Como hemos comentado en cada patología inflamatoria relacionada con los ligandos de CXCR3, se abre un nuevo campo de posibilidades terapéuticas basadas en la prevención o detención de la progresión de estas enfermedades, modificando la expresión de los ligandos o del receptor CXCR3, todas las posibilidades, como inhibición de la



activación de CXCR3 o administración de péptidos (ligandos) no estimulantes y que bloquen al receptor, están actualmente siendo investigadas.

### **Sistema nervioso periférico**

Estas quimioquinas y particularmente la CXCL10, modulan la quimiotaxis, la apoptosis, la angiogénesis y el crecimiento celular. Sobre la posible participación de las quimioquinas en la neuropatía y fundamentalmente en el dolor neuropático, ha sido estudiado en el modelo animal, en ratones con diabetes experimental tras estreptozotocina, donde el aumento de los niveles espinales de quimioquinas, tras inyección intratecal, aumenta el dolor neuropático, los autores de este estudio concluyen que la neuropatía es un trastorno neuroinflamatorio, y debe estudiarse el papel de las quimioquinas<sup>122</sup>.

Un trabajo de 2013<sup>123</sup> estudiando células humanas periféricas demostró que la hiperglucemia se relaciona con un aumento de la expresión de CXCR3 en los linfocitos activados CD8<sup>+</sup>T activando la vía p38MAK-Kinasas e induciendo apoptosis en las células de Schwann, indicando que estas células pueden ser tóxicas para estas células y producir neuropatía.

Las quimioquinas CXCL9, 10 y 11, ligandos de este receptor, son inducidas por citoquinas inflamatorias (IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) y la activación de CXCR3 activa a su vez en los linfocitos B y T, células NK y endoteliales y podrían jugar un papel en la neuropatía periférica.

Sin embargo, el papel del receptor CXCR3 y sus ligandos (CXCL10, CXCL9, CXCL11) en la neuropatía de la diabetes no ha sido explorado y puede tener un papel importante en el desarrollo de las lesiones neuropáticas.

Por ello el estudio de los niveles de las quimioquinas, CXCL10, CXCL9, CXCL11 en plasma puede contribuir a mejorar el conocimiento de las casusas de la PND. Estas quimioquinas, como hemos descrito, se relacionan con la angiogénesis y la regulación inflamatoria local vascular. Esto hace pensar que podrían tener un papel en el

desarrollo de las lesiones microvasculares que afectan a la mielina y el axón en la PND.

## **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

## Hipótesis de trabajo

Con las premisas antes comentadas, y no teniendo datos previos, nos planteamos la siguiente **hipótesis de trabajo**: En los pacientes diabéticos tipo 2 con neuropatía periférica diabética (NPD) deben tener un aumento de factores inflamatorios (CXCL10, CXCL9, CXCL11) relacionados con la vía de activación de la inflamación (NFkB) y la angiogénesis.

### Objetivo principal

Estudiar la asociación de diferentes factores inflamatorios CXCL10/IP-10, CXCL9/MIG, CXCL11/I-TAC con la presencia de neuropatía periférica en una cohorte de pacientes con diabetes tipo 2.

### Objetivo secundario

Conocer si el grado de inflamación crónica se relaciona con la gravedad de la PND.

Este objetivo intenta demostrar, si el objetivo 1 encuentra la relación de estas quimioquinas con la PND, que a mayor grado de inflamación debería existir mayor grado de PND. Reforzando así la hipótesis planteada.

## **SUJETOS Y METODOS**

## Sujetos y métodos

### 1. Tipo de estudio

Estudio preliminar de casos / controles. Considerando casos a los diabéticos con polineuropatía diabética (PND) y controles a diabéticos sin PND. Apareados ambos grupos por edad, parámetros antropométricos, control de la diabetes y tiempo de evolución de la diabetes.

### 2. Sujetos

La población estudiada son los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DM2), y como población de estudio los pacientes que acuden a la Unidad de Diabetes del Hospital Clínico de Valencia.

La selección de los pacientes se realizó por muestreo aleatorio simple, con la misma posibilidad de ser elegidos entre todos los presentados, según técnica por tablas de muestreo aleatorio<sup>124</sup>.

#### Criterios de inclusión

- 1.- Sujetos con diabetes mellitus tipo 2, según criterios de la ADA-2016.
- 2.- Edad mayor o igual a 40 y menor de 70 años.
- 3.- Hombre o mujer.

#### Criterios de exclusión

- 1.- Diabetes mellitus tipo 1, MODY y diabetes secundarias.

- 2.- Edad menor de 40 años o mayor de 70 años.
- 3.- Amputación bilateral en miembros inferiores
- 4.- Enfermedad avanzada:
  - Cardíaca (insuficiencia cardíaca NYHA grado II o superior).
  - Renal (aclaramiento de creatinina  $<30$  mL/min/1,73<sup>2</sup>).
  - Hepática (cirrosis o GPT  $>2$  veces el límite superior de la normalidad).
  - Hipotiroidismo o TSH  $>5$   $\mu$ U/L.
  - Neumológica (EPOC).
  - Neurológica (neuropatías de otro origen o antecedentes personales de neuropatía previa a la diabetes o antecedentes familiares de neuropatía).
  - Enfermedades neoplásicas.
  - Enfermedades inflamatorias de cualquier tipo.
- 5.- Consumo de alcohol superior a 20 g día en el hombre o 15 g día en la mujer.
- 6.- Artropatía de Charcot o amputaciones.

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

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.

### **3. Parámetros clínicos**

Se realizó una entrevista y exploración clínica para la recogida de factores clínicos y antropométricos. Entre estos destacan:

- Edad y sexo.
- Hábito tabáquico.
- Consumo de alcohol.
- Ejercicio físico.
- Tiempo de evolución de la diabetes.
- Enfermedades cardiovasculares.
- Factores de riesgo cardiovascular asociados: hipertensión y dislipemia.
- Tratamiento habitual.
- Peso en kilogramos (kg) mediante una báscula electrónica, la talla en metros (m) y el cálculo del índice de masa corporal (IMC)  $\text{kg}/\text{m}^2$ .
- Perímetro de cintura abdominal: medido 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 enfermedad arterial periférica (EAP) sintomática y realización de la prueba índice tobillo brazo (ITB): cociente entre presión arterial sistólica en tobillo y arteria braquial medidas con esfigmógrafo de mercurio y un eco-doppler (Bi-directional Smartdrop<sup>TM</sup> 20) tras 5-10 minutos de reposo.

La EAP fue definida por un ITB  $< 0,9$  en cada pierna, considerando grave si los valores eran inferiores a 0,5. Una ratio superior a 1,2 se deben posiblemente a rigidez arterial y fueron excluidos del análisis estadístico.



Todas las mediciones fueron hechas por personal sanitario de la Unidad de Investigación, previamente entrenado y con un protocolo definido y similar en todas las exploraciones.

#### **4. Estudio de la neuropatía periférica**

La afectación de neuropatía periférica se estableció con la prueba del monofilamento tal y como se detalla en Gonzalez R et al<sup>61</sup> y la gravedad y criterios clínicos atendiendo a la clasificación internacional basada en las escalas: NDS "*Neurological Disability Score*" o *índice de alteraciones neurológicas* y NSS "*Neuropathy Symptom Score*" o *índice de síntomas neurológicos*<sup>125</sup>.

##### **Prueba del monofilamento**

La presencia de neuropatía se estableció con 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 y con ojos cerrados, se presionó con el filamento durante 1 a 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. 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.

**La exploración neurológica** general se basó en pruebas estandarizadas por nuestro grupo<sup>126</sup>:

**a) Sensibilidad superficial.**

Se inició por la zona más distal (pulpejos de los dedos de los pies) y se exploró:

La sensibilidad táctil se exploró con el paciente tumbado y con los ojos cerrados usando una torunda de algodón.

La dolorosa utilizando una aguja con punta roma.

La térmica por la discriminación al comparar al contacto con metal (frío) y plástico (cálido).

**b) Sensibilidad profunda.**

**Prueba del monofilamento de Semmes Weinstein.** Descrita arriba, la pérdida de la sensación a la presión con el monofilamento de diámetro 5,07, indica afectación neuropática y en estos casos el riesgo de lesiones en pie se multiplica por 10, con una sensibilidad entre el 88 y 100%. El monofilamento se aplica en las zonas antes descritas y en diferentes zonas de la planta y del dorso del pie, como hemos descrito en un trabajo anterior de nuestro grupo<sup>127</sup>.

**Prueba de la sensibilidad vibratoria con diapasón de 128 Hz o graduado de Rydel-Seiffer,** la percepción de la sensibilidad vibratoria, habitualmente es la primera que se afecta en el paciente diabético y, por tanto, esta prueba es muy sensible para detectar precozmente la alteración de la sensibilidad. Se aplica sobre la articulación interfalángica del primer dedo y siempre en zona libre de callosidades, se considera patológico cuando el paciente deja de notar la vibración por debajo de 6.

**Reflejo osteotendinoso 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, como la maniobra de Jendrassik que consiste en tirar fuertemente una mano contra la otra con los dedos flexionados<sup>128</sup>.

La **gravedad de la neuropatía** se estableció con las escalas NDS y NSS<sup>125</sup>. El índice NDS “*Neurological Disability Score*” o *Índice de alteraciones neurológicas* se establece por el resultado de la exploración en ambos miembros inferiores con estudio de la sensibilidad dolorosa, vibratoria, térmica y la respuesta de los reflejos aquileos. El índice NSS “*Neuropathy Sympton Score*” o *índice de síntomas neurológicos* se establece por la clínica que presenta el paciente basado en síntomas como cansancio, calambres, dolor, quemazón, adormecimiento y hormigueos, en su localización y situación en la que empeoran o mejoran estos síntomas, tablas 4 y 5

<b>Tabla 4</b>						
<b>Índice NDS “Neurological Disability Score” o Índice de alteraciones neurológicas</b>						
	<i>Izquierda</i>			<i>Derecha</i>		
<i>Sensibilidad</i>	<i>Normal</i>	<i>Anormal</i>		<i>Normal</i>	<i>Anormal</i>	
<i>Dolorosa (aguja)</i>	0	1		0	1	
<i>Vibratoria (128 Hz)</i>	0	1		0	1	
<i>Temperatura (frío metal)</i>	0	1		0	1	
<i>Reflejos aquileos</i>	<i>Presente</i>	<i>PCR</i>	<i>Ausente</i>	<i>Presente</i>	<i>PCR</i>	<i>Ausente</i>
	0	1	2	0	1	2
<b>Índice = ( 0 – 10 )</b>						
<b>Sumando las puntuaciones: 3-5 PND leve, 6-8 moderada, 8-10 grave</b>						
La sensibilidad se explora sobre el dorso de la primera articulación metatarso-falángica						
PCR = Positivo con maniobra de refuerzo						

<b>Tabla 5</b>		
<b>Índice NSS "Neuropathy Sympton Score" o Índice de síntomas neurológicos</b>		
		<i>PUNTOS</i>
<i>Cansancio, calambres, dolor</i>		<i>1</i>
<i>Quemazón, adormecimiento, hormigueos</i>		<i>2</i>
<i>Síntomas anteriores</i>	<i>En pie</i>	<i>2</i>
	<i>En pierna</i>	<i>1</i>
<i>Aumentan</i>	<i>Por la noche</i>	<i>2</i>
	<i>Durante el día y noche</i>	<i>1</i>
<i>Mejoran</i>	<i>Al caminar</i>	<i>2</i>
	<i>Con la bipedestación</i>	<i>1</i>
<i>Suma de puntos de 0 a 9</i>		
<i>Neuropatía leve 3-4 puntos</i>		
<i>Neuropatía moderada 5-6 puntos</i>		
<i>Neuropatía grave 7-9 puntos</i>		

## 5. Parámetros bioquímicos

Los estudios bioquímicos se realizaron a todos los pacientes incluidos en el estudio, tras un periodo de 10 horas de ayuno nocturno, la extracción se realizó en la Unidad de Pruebas Funcionales de nuestro Servicio en condiciones óptimas: sentado, con punción en la vena antecubital y en una situación sin estrés físico o emocional con una bránula de plástico, con uso de torniquete (menor de 1 minuto) para evitar cambios en el pH sanguíneo, recogiéndose en los tubos adecuados para cada determinación (EDTA, heparina, seco,...) y las muestras fueron analizadas en el Laboratorio Central de nuestro Hospital y en el Instituto de Investigación – INCLIVA.

Incluyendo los siguientes parámetros, las determinaciones se realizaron con metodología previamente descrita por el grupo<sup>129</sup>:

- Hemograma (recuento y fórmula leucocitaria), estándar de coagulación, enzimas hepáticas, creatinina (métodos enzimáticos), filtrado glomerular, glucemia.
- Colesterol total y triglicéridos (métodos enzimáticos), colesterol-HDL (cHDL) (precipitación con polianiones), Apo B y A1 (inmunoturbidimetría). Ácido úrico (método enzimático fotolorimétrico).
- HbA1c mediante HPLC, método estandarizado y certificado según National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP)<sup>130</sup>.
- Determinación de microalbuminuria.

## **6. Niveles de las quimioquinas circulantes**

Los niveles de CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 y CXCL11/I-TAC en el plasma de los pacientes diabéticos con y sin PND, se determinaron mediante ELISA.

Las quimioquinas humanas CXCL9, CXCL10 y CXCL11 se midieron usando pares de anticuerpos de R & D Systems (kits ELISA DuoSet, Abingdon, Reino Unido). Después de revestir las placas durante la noche con el anticuerpo primario, los sitios de unión no específicos se bloquearon con BSA al 3% durante 1 h. Se añadieron plasma y patrones a PBS / 0,5% / BSA / azida de sodio al 0,05% durante 2 h. Se añadieron anticuerpos detectores biotinilados durante 2 h, seguido de neutravidina-HRP durante 1 h. Todos los lavados en placas se llevaron a cabo en cuatro ciclos con PBS recién preparado / Tween20 al 0,2%. Se añadió sustrato de tetrametilbenzidina K-Blue mejorado durante 30 min y la reacción enzimática se detuvo por adición de ácido sulfúrico 0,19 M. La absorbancia se leyó a 450 nm. Los resultados se expresan como quimioquinas pg/mL en el plasma.

Se realizó la determinación en un grupo de sujetos no diabéticos, no obesos y sanos para tener valores de referencia.

## **7. Métodos estadísticos**

El tamaño muestral se ha calculado en 70 sujetos diabéticos, 35 con PND y 35 sin PND con similar edad, distribución de género, control glucémico y función renal.

La distribución normal de las variables se estudió mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

Las medias de las variables cuantitativas se comparan entre grupos con la prueba t de Student para datos no apareados para variables con distribución normal y con pruebas no paramétricas para las variables de distribución no normal con la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la de Wilcoxon para 2 muestras independientes. Para el estudio de tres variables se utilizó la prueba de la varianza o con la prueba anova de una vía.

Para estudiar la asociación entre variables cualitativas se empleará la prueba de Chi-cuadrado, utilizándose la prueba exacta de Fisher cuando las condiciones de la muestra lo requirieren.

Las variables se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. Se consideró estadísticamente significativo una probabilidad menor al 5%. Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SPSS v.12.1.3 (SPSS Chicago, IL).

## **8. Aprobación del Comité de Ética**

Este trabajo fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínic Universitari de València en fecha 25 de febrero de 2016. Acordando que reúne las características adecuadas referentes a información a los pacientes y cumplimiento de los criterios éticos para la investigación médica y biomédica establecidos en la Declaración de Helsinki (Junio 1964, Helsinki, Finlandia) de la Asamblea Médica

Mundial, y sus revisiones (Octubre 1975, Tokio, Japón), (Octubre 1983, Venecia, Italia), (Septiembre 1989, Hong Kong), (Octubre 1996, Somerset West, Sudafrica), (Octubre 2000, Edimburgo), (Octubre 2008 Seúl, Corea) y (Octubre 2013 Fortaleza, Brasil) y en la Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos del Hombre de la UNESCO y los acuerdos del Protocolo Adicional del Consejo de Europa para la protección de los Derechos del Hombre y de la dignidad del ser humano frente a las aplicaciones de la biología y de la medicina (París 12-1-1998, ratificado el 23-7-1999).

## **RESULTADOS**



## Resultados

### **Población estudiada.**

Se estudiaron setenta y tres sujetos con diabetes mellitus tipo 2, 47 hombres y 26 mujeres, con una edad de  $63,5 \pm 10,9$  años y con un tiempo de evolución de la diabetes de  $11,7 \pm 10,2$  años. El IMC del grupo estudiado fue  $31,3 \pm 5,3$  y el perímetro de cintura  $107,7 \pm 11,3$  cm para ambos sexos. La presión arterial sistólica fue de  $148,7 \pm 20,2$  mm Hg y la diastólica de  $82,9 \pm 12,8$  mm Hg. Eran fumadores el 35,6%. Estaban tratados con diferentes pautas terapéuticas: dieta, antidiabéticos orales (ADO), insulina o combinación de insulina y ADO.

Al dividir el conjunto de los 73 sujetos diabéticos incluidos en el estudio, por género (hombres y mujeres) vemos las características generales: edad, años de evolución de la diabetes, IMC, perímetro de cintura (cm), presión arterial sistólica y diastólica, control de la diabetes (glucemia basal y HbA1c) y el filtrado glomerular estimado, que están recogidas en la tabla 6.

No hubo diferencias significativas entre los principales parámetros de control de la diabetes, tiempo de evolución de la misma y filtrado glomerular, principales parámetros de la evolución de la diabetes que podían influir en la presencia de neuropatía, por lo que tratamos a hombres y mujeres como un grupo único, como habíamos previsto en el diseño, y consideramos adecuado el número de sujetos diabéticos incluidos en el estudio.

<b>Tabla 6</b>			
<b>Características generales del grupo estudiado</b>			
	<b>Hombres</b>	<b>Mujeres</b>	
<b>N</b>	47	26	
<b>Edad</b>	63,4±11,3	64,9±10,4	NS
<b>Años de evolución DM</b>	12,5±10,7	10,7±9,1	NS
<b>IMC</b>	33,3±5,6	30,3±4,9	p 0,034
<b>Perímetro cintura (cm)</b>	108,4±10,9	106,6±11,1	NS
<b>PAS</b>	149,6±16,9	147,0±25,3	NS
<b>PAD</b>	83,3±13,5	82,4±11,7	NS
<b>Glucemia basal (mg/dL)</b>	160,3±49,7	160,9±50,9	NS
<b>HbA1c (%)</b>	7,6±1,6	7,9±1,7	NS
<b>FGe (mL/min/1,73<sup>2</sup>)</b>	105,2±47,1	94,7±50,9	NS
<i>DM = diabetes mellitus; IMC = índice de masa corporal, PAS = presión arterial sistólica y PAD = presión arterial diastólica; HbA1c = hemoglobina glicosilada; FGe = filtrado glomerular estimado.</i>			

**Los sujetos con diabetes tipo 2 fueron divididos, según los criterios definidos en este estudio, por la presencia o ausencia de neuropatía periférica, diagnosticada por la exploración con el monofilamento.**

Estudio con el monofilamento

Monofilamento 0 = grupo de sujetos con alteración o pérdida de sensibilidad, considerado grupo con neuropatía

Monofilamento 1 = grupo de pacientes diabéticos con sensibilidad conservada o grupo sin neuropatía

Los pacientes estudiados fueron distribuidos en 2 grupos: 36 pacientes diabéticos con neuropatía (22 H y 14 M) llamado monofilamento 0 y 37 sin neuropatía (25 H y 12 M) grupo monofilamento 1. No hubo diferencias significativas en la distribución por número y sexo entre ambos grupos (tabla 7).

Las características generales: edad, años de evolución de la diabetes, índice de masa corporal, perímetro de cintura, presión arterial sistólica y diastólica, de ambos grupos de sujetos diabéticos con y sin neuropatía periférica, vienen expuestas en la tabla 7, observando solo diferencias estadísticamente significativas en la edad expresada en años,  $68,5 \pm 7,9$  y  $59,4 \pm 11,6$ , en los grupos con y sin neuropatía, respectivamente, con  $p < 0,001$ . Como hemos comentado no hubo diferencias estadísticamente significativas en el resto de parámetros.

Por lo que consideramos que ambos grupos fueron comparables, para estudiar los factores asociados a neuropatía.

<b>Tabla 7</b>			
<b>Características de ambos grupos de sujetos con diabetes tipo 2 con y sin neuropatía</b>			
	<b>CON NEUROPATIA Monofilamento 0</b>	<b>SIN NEUROPATIA Monofilamento 1</b>	
<b>N</b>	36	37	NS
<b>Hombres (N)</b>	22	25	NS
<b>Mujeres (N)</b>	14	12	NS
<b>Edad (años)</b>	$68,5 \pm 7,9$	$59,4 \pm 11,6$	$p < 0,001$
<b>Años de evolución DM</b>	$13,6 \pm 10,8$	$9,8 \pm 9,4$	NS
<b>IMC</b>	$30,6 \pm 4,6$	$31,9 \pm 5,8$	NS
<b>Perímetro cintura (cm)</b>	$106,7 \pm 9,6$	$108,7 \pm 12,7$	NS

<b>Tabla 7</b> <b>Características de ambos grupos de sujetos con diabetes tipo 2 con y sin neuropatía</b>			
	<b>CON NEUROPATIA Monofilamento 0</b>	<b>SIN NEUROPATIA Monofilamento 1</b>	
<b>PAS</b> (mm Hg)	151,7±20,5	145,7±19,7	NS
<b>PAD</b> (mm Hg)	80,7±12,7	85,2±12,6	NS
<i>DM = diabetes mellitus; IMC = índice de masa corporal, PAS = presión arterial sistólica y PAD = presión arterial diastólica</i>			

Los parámetros bioquímicos de los grupos con y sin neuropatía se incluyen en la tabla 8. No hubo diferencias estadísticamente significativas al comparar glucemia basal, hemoglobina glicosilada y creatinina. Encontramos diferencias en el filtrado glomerular estimado, FGe 87,5±35,4 y 115,4±55,7 (p 0,013), en los grupos con y sin neuropatía, respectivamente. También hubo diferencias significativas en las enzimas hepáticas (AST/ALT) pero encontrándose en límites de la normalidad, en ambos grupos. Al comparar los niveles lipídicos en plasma (CT, TG, cHDL, cLDL y apoB) tampoco se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos.

<b>Tabla 8</b> <b>Parámetros bioquímicos y leucocitos en ambos grupos de sujetos con diabetes tipo 2 con y sin neuropatía</b>			
	<b>CON NEUROPATIA Monofilamento 0</b>	<b>SIN NEUROPATIA Monofilamento 1</b>	
<b>Glucemia basal</b> (mg/dL)	162,5±48,6	158,6±51,6	NS
<b>HbA1c</b> (%)	7,9±1,6	7,5±1,6	NS

<b>Tabla 8</b>			
<b>Parámetros bioquímicos y leucocitos en ambos grupos de sujetos con diabetes tipo 2 con y sin neuropatía</b>			
	<b>CON NEUROPATIA Monofilamento 0</b>	<b>SIN NEUROPATIA Monofilamento 1</b>	
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0,98±0,36	0,91±0,31	NS
<b>FGe (mL/min/1,73<sup>2</sup>)</b>	87,5±35,4	115,4±55,7	0,013
<b>CT (mg/dL)</b>	191,1±37,0	185,5±46,4	NS
<b>TG (mg/dL)</b>	151,4±71,3	144,1±89,3	NS
<b>cHDL (mg/dL)</b>	49,6±13,3	47,6±11,3	NS
<b>cLDL (mg/dL)</b>	112,1±28,6	109,4±42,5	NS
<b>ApoB (mg/dL)</b>	91,7±19,1	89,3±26,1	NS
<b>AST (U/L)</b>	19,3±6,5	23,8±9,0	0,022
<b>ALT (U/L)</b>	20,3±13,1	29,3±9,0	0,010
<b>GGT (U/L)</b>	31,9±19,5	40,3±41,2	NS
<b>Leucocitos x10<sup>3</sup>/μL</b>	7,7±2,1	8,3±2,2	NS
<i>HBA1c = hemoglobina glicosilada; FGe = filtrado glomerular estimado; CT = colesterol total; TG = triglicéridos, cLDL = colesterol de las lipoproteínas de baja densidad; cHDL = colesterol de las lipoproteínas de alta densidad; apoB = apolipoproteína B; AST = aspartato aminotransferasa; ALT = alanina aminotransferasa; GGT= gamma glutamil transpeptidasa.</i>			

En la siguiente tabla se encuentran las diferencias entre ambos grupos, con y sin neuropatía (tabla 9) respecto a los factores de riesgo (tabaco, consumo de alcohol, sujetos con hipertensión y aquellos tratados, y sujetos con dislipemia y con tratamiento hipolipemiente), número de sujetos con enfermedad cardiovascular y el tipo de tratamiento de la diabetes.

En la figura 9 se incluyen los factores de riesgo relacionados con la neuropatía en ambos grupos y en la 10, se expone gráficamente el tipo de tratamiento que llevaban estos pacientes.

<b>Tabla 9</b>				
<b>Factores de riesgo cardiovascular y de neuropatía en ambos grupos de sujetos diabéticos tipo 2 con y sin neuropatía</b>				
		<b>CON NEUROPATIA Monofilamento 0</b>	<b>SIN NEUROPATIA Monofilamento 1</b>	
<b>N</b>		36	37	NS
<b>Hombres (N)</b>		22	25	NS
<b>Mujeres (N)</b>		14	12	NS
<b>Tabaco (n)</b>	Fumadores	4	10	NS
	Exfumadores	18	15	
	No fumadores	14	12	
<b>Consumo de alcohol (n)</b>	no	34	31	NS
	si	2	6	
<b>HTA (n)</b>	No	9	13	NS
	SI	27	24	
<b>Tratamiento de la HTA (n)</b>		26	23	NS
<b>Dislipemia (n)</b>	No	10	8	NS
	Si	26	29	
<b>Tratamiento dislipemia (n)</b>		22	25	NS
<b>Antecedentes ACV</b>		10 (27,8%)	4 (10,8%)	p 0,06
<b>Antecedentes IAM</b>		18 (50,0%)	12(32,4%)	NS
<b>ITB</b>		0,850,2	0,880,2	NS
<b>Tratamiento diabetes</b>				p=0,021
	Dieta (n)	2	3	

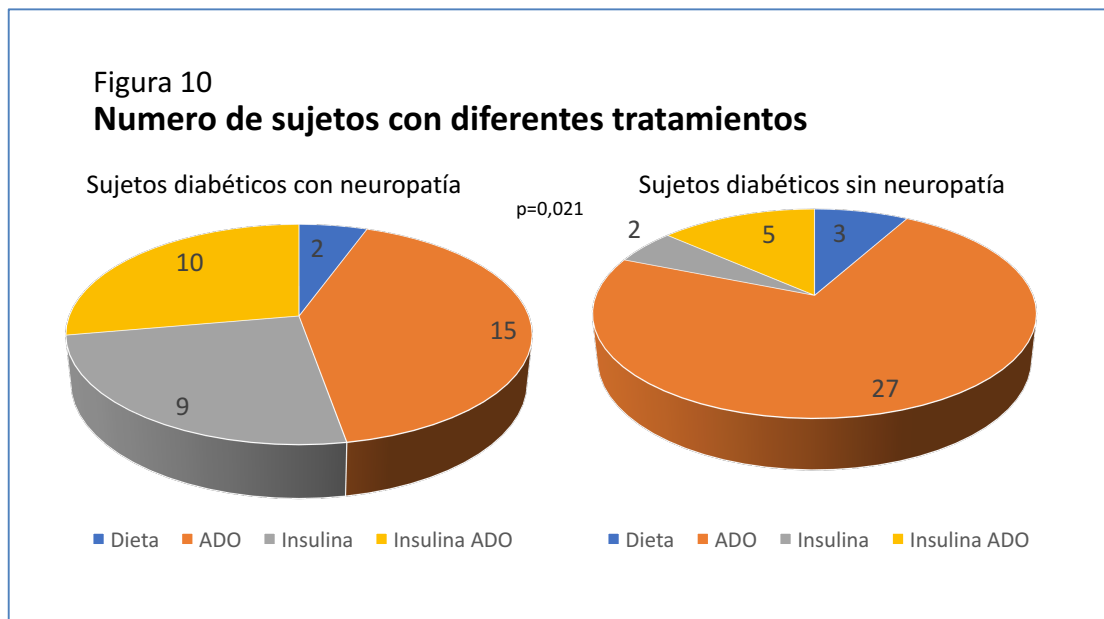
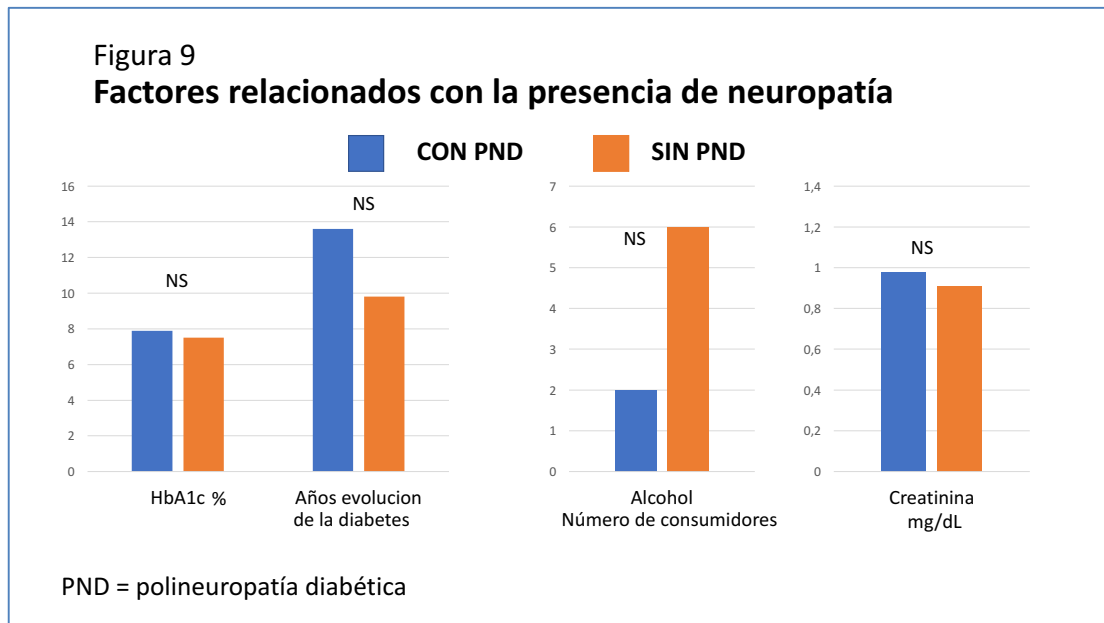
**Tabla 9**  
**Factores de riesgo cardiovascular y de neuropatía en ambos grupos de sujetos diabéticos tipo 2 con y sin neuropatía**

	<b>CON NEUROPATIA</b> <b>Monofilamento 0</b>	<b>SIN NEUROPATIA</b> <b>Monofilamento 1</b>	
ADO (n)	15	27	
Insulina (n)	9	2	
Insulina + ADO (n)	10	5	

*ADO = antidiabéticos orales o no insulina; HTA = hipertensión arterial; ACV = accidente cardiovascular; IAM = infarto agudo de miocardio; ITB = índice tobillo brazo*  
*Monofilamento 0 = sujetos con neuropatía, falta de respuesta al monofilamento y monofilamento 1 = respuesta normal, sujetos sin neuropatía*

No encontramos diferencias en el consumo de tabaco (61% en el grupo con neuropatía y 57% en el grupo sin neuropatía), ni en el consumo de alcohol (5,5% y 16%, con y sin NP, respectivamente) aunque el consumo fue bajo por los criterios de inclusión (<20 g día en H y <15 g día en M). Tampoco hubo diferencias en el porcentaje de sujetos hipertensos (75% y 64,8%, en los sujetos con y sin NP, respectivamente) y aquellos con tratamiento hipotensor. No encontramos diferencias en el porcentaje de sujetos con dislipemia 72,2% y 78,4%, respectivamente, ni en aquellos con tratamiento hipolipemiante.

Hubo diferencias en el tratamiento en ambos grupos (p 0,021) con mayor proporción de sujetos tratados con insulina en el grupo de sujetos con neuropatía (52,7%), respecto con grupo sin NP (18,9%).



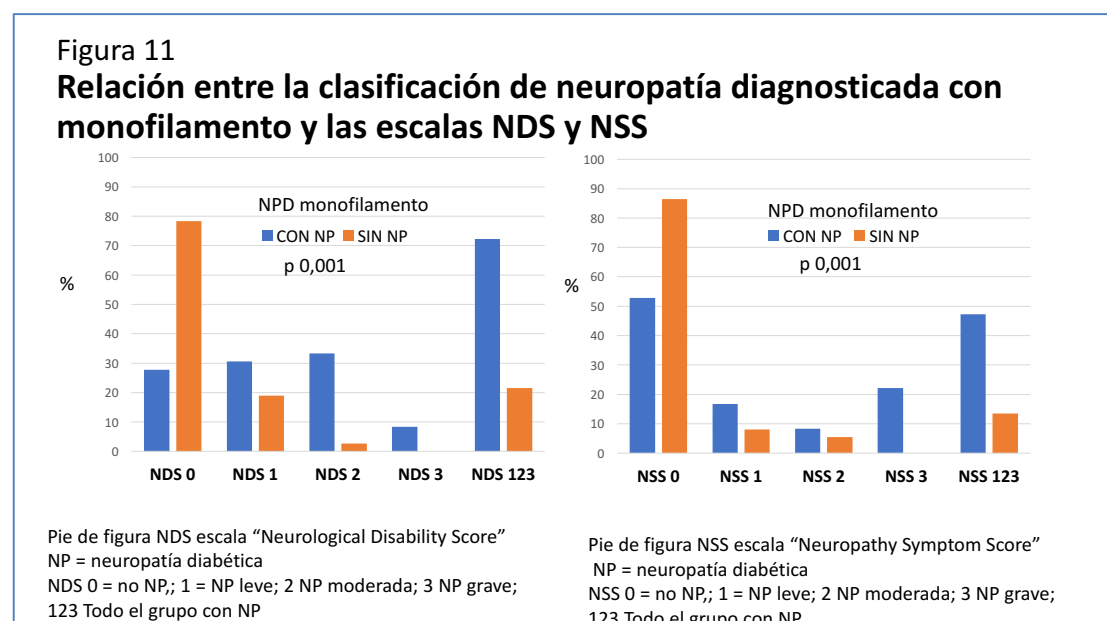
Al comparar los sujetos con neuropatía, clasificados por alteración en la exploración con el monofilamento (tabla 10), con la encontrada con las escalas NDS y NSS hubo diferencias significativas con la clasificación con NDS y NSS (figura 11). Encontrando



una buena relación entre la clasificación según respuesta al monofilamento y los índices NDS y NSS.

**Tabla 10**  
**Comparación de ambos grupos de sujetos con diabetes tipo 2 con y sin neuropatía, con las escalas NDS y NSS**

		CON NEUROPATIA Monofilamento 0	SIN NEUROPATIA Monofilamento 1	
<b>NDS</b>	<b>0</b>	10 (27,8%)	29 (78,4%)	P <0,001
	<b>1</b>	11 (30,6%)	7 (18,9%)	
	<b>2</b>	12 (33,3%)	1 (2,7%)	
	<b>3</b>	3 (8,3%)	0 (0,0%)	
<b>NSS</b>	<b>0</b>	19 (52,8%)	32 (86,5%)	p <0,001
	<b>1</b>	6 (16,7%)	3 (8,1%)	
	<b>2</b>	3 (8,3%)	2 (5,4%)	
	<b>3</b>	8 (22,2%)	0 (0,0%)	



### Quimioquinas CXCL9, CXCL10 y CXCL11 en población control

Para conocer los valores de las quimioquinas CXCL9, CXCL10 y CXCL11 y su reproductibilidad con nuestro método en población sana, se estudió un grupo de sujetos libres de cualquier enfermedad, no diabéticos y no obesos. Cuyas características antropométricas y parámetros bioquímicos vienen expuestos en la tabla 11.

<b>Tabla 11</b>	
<b>Población control, no diabética, no obesa</b>	
N	25 (10 H y 15 M)
Edad (años)	44,9±10,5
Índice de masa muscular (IMC)	23,1±2,4
Perímetro de cintura (cm)	81,6±8,7
Glucosa plasmática en ayunas (mg/dL)	85,2±5,9
HbA1c %	5,1±0,2
Colesterol total (mg/dL)	85,2±23,1
Triglicéridos (mg/dL)	74,6±33,8
<b>Valores de quimioquinas</b>	
CXCL9 (pg/mL)	135,0±78,8
CXCL10 (pg/mL)	48,8±27,6
CXCL11 (pg/mL)	46,7±39,9

Tras este análisis, comparamos los valores de las quimioquinas referidas en el grupo de controles sanos con el conjunto de los sujetos diabéticos estudiados en esta tesis, encontrando diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ) entre ambos grupos, con valores superiores en el grupo de sujetos diabéticos, para los valores de CXCL9 y CXCL11 (tabla 12). No encontramos diferencias en los valores de CXCL10.

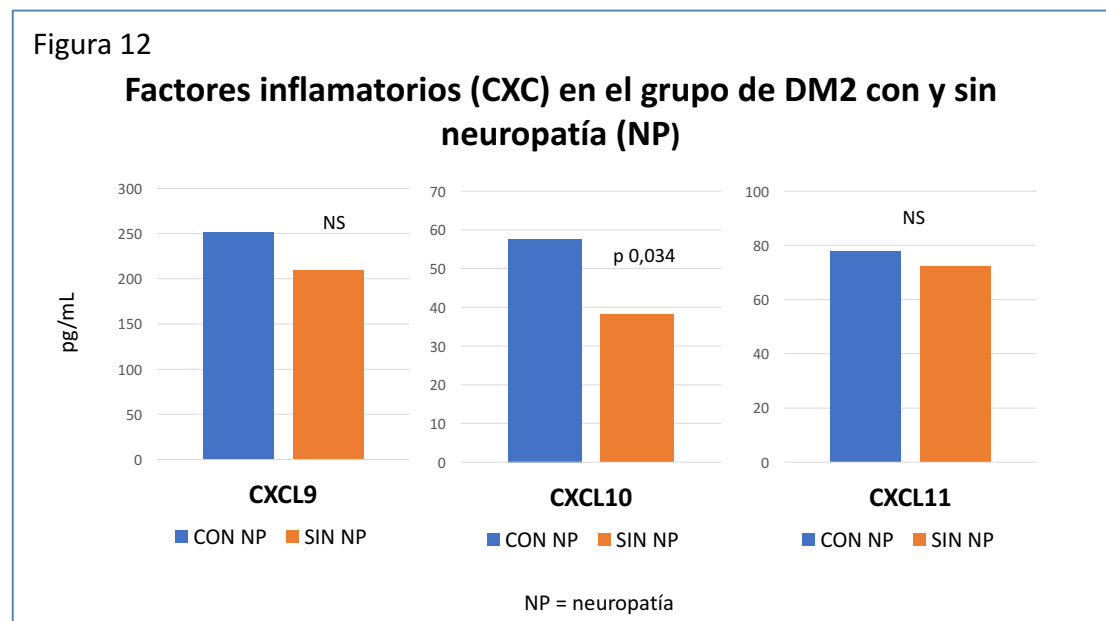
<b>Tabla 12</b>			
<b>Comparación de los valores de quimioquinas entre controles y diabéticos.</b>			
	<b>Controles</b>	<b>Diabéticos</b>	<b>p</b>
<b>CXCL9</b> (pg/mL)	135,0±78,8	240,4±247,4	0,01
<b>CXCL10</b> (pg/mL)	48,8±27,6	52,1±36,3	NS
<b>CXCL11</b> (pg/mL)	46,7±39,9	88,3±90,6	0,01

Posteriormente estudiamos, como era el objetivo de esta tesis, la relación de estas quimioquinas incluidas en este trabajo CXCL9, CXCL10, CXCL11, entre los sujetos diabéticos con y sin neuropatía, según respuesta al estudio con el monofilamento, tabla 13 y figura 12.

Encontramos diferencias significativas entre los sujetos con neuropatía y aquellos sin neuropatía para los valores plasmáticos de CXCL10 57,6±38,3 pg/mL en el grupo con NP y 38,1±33,4 pg/mL en el grupo sin NP,  $p < 0,034$ . Aunque hubo una tendencia a aumentar en los pacientes con NP respecto a los que no tenían esta complicación con la quimioquinas CXCL9 y CXCL 11, no alcanzaron significación estadísticamente significativa.

**Tabla 13**  
**Quimioquinas plasmáticas CXCL ligandos del receptor CXCR3 en ambos grupos de sujetos con diabetes tipo 2, divididos en aquellos con y sin neuropatía**

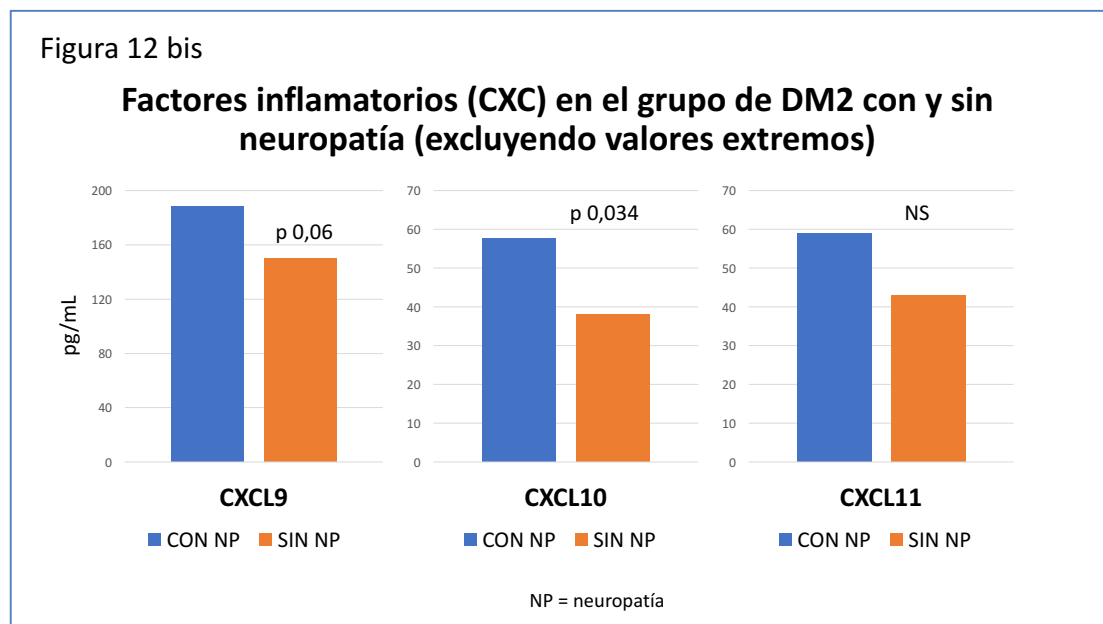
	CON NEUROPATIA Monofilamento 0	SIN NEUROPATIA Monofilamento 1	
N	36	37	
CXCL9 (pg/mL)	251,7±168,9	210,0±305,8	NS
CXCL10 ( pg/mL)	57,6±38,3	38,1±33,4	0,034
CXCL11(pg/mL)	77,6±93,4	72,1±83,7	NS



Reanalizando estos datos y excluyendo valores extremos (tabla 14 y figura 12bis), se mantuvo las diferencias significativas entre ambos grupos para la quimioquina CXCL10, para la CXCL9 aumentaron las diferencias sin alcanzar significación

estadística (p0,06). En la figura 12bis se observa gráficamente esta tendencia, que no alcanzó significación.

<b>Tabla 14</b>			
<b>Quimioquinas plasmáticas CXCL ligandos del receptor CXCR3 en ambos grupos de sujetos con diabetes tipo 2, divididos en aquellos con y sin neuropatía (excluidos valores extremos)</b>			
	Monofilamento 0 N 32	Monofilamento 1 N 32	
<b>CXCL10</b> (pg/mL)	57,6±38,3	38,1±33,4	0,034
	Monofilamento 0 N 27	Monofilamento 1 N 33	
<b>CXCL9</b> (pg/mL)	188,1±72,7	150,4±83,6	0,06
	Monofilamento 0 N 33	Monofilamento 1 N 32	
<b>CXCL11</b> (pg/mL)	59,0±50,8	43,0±36,5	NS
<i>Monofilamento 0 = sujetos con neuropatía, falta de respuesta al monofilamento y monofilamento 1 = respuesta normal, sujetos sin neuropatía</i>			



El segundo objetivo o secundario fue ver la relación de las quimioquinas con la **gravedad de la polineuropatía**, para ello dividimos los sujetos según los resultados de los índices NDS y NSS.

A) Para el estudio de la gravedad de la PND se utilizó la escala NDS “Neurological Disability Score”, con lo que se dividieron los sujetos estudiados en 3 grupos:

0 = no neuropatía

1 = neuropatía leve (3-5 puntos de la escala NDS)

2 = neuropatía moderada-grave (6-9 puntos de la escala NDS)

según los criterios expuestos en la tabla 2.

Las características generales de los pacientes agrupados según los grupos clasificados con la escala NDS vienen en la tabla 15, observando solo diferencias significativas en la edad y años de evolución de la diabetes, no en el resto de parámetros estudiados (IMC, perímetro de cintura, presión arterial sistólica y diastólica, porcentaje de fumadores y de bebedores (<20 g día en hombre y <15 g día en mujeres).

<b>Tabla 15</b>				
<b>Características generales de los sujetos divididos por escala NDS</b>				
	<b>Sin neuropatía</b>	<b>Con neuropatía</b>		
	Grupo 0	Grupo 1	Grupo 2	estadística
<b>N (H/M)</b>	39 (26/13)	18 (12/6)	16 (9/7)	NS
<b>Edad (años)</b>	60,9±12,6	67,8±7,2	66,8±8,0	p 0,040
<b>Años evolución DM</b>	8,5±7,0	14,5±12,3	16,2±11,7	p 0,020
<b>IMC</b>	31,2±5,4	33,3±4,8	29,4±4,8	NS
<b>PC (cm)</b>	107,2±11,5	112,5±9,7	103±11,1	NS
<b>PAS (mm Hg)</b>	146,7±19,6	155,9±21,3	145,2±19,6	NS
<b>PAD (mm Hg)</b>	85,4±12,8	81,4±13,4	79,2±11,4	NS
<b>Fumadores (%)</b>	33,3	33,3	43,8	NS
<b>Alcohol &gt;20g día (%)</b>	15,4	11,1	0	NS
<p>Pie de tabla: Grupo 0 = no neuropatía; grupo 1 = neuropatía leve (3-5 puntos de la escala NDS) y grupo 2 = neuropatía moderada-grave (6-9 puntos de la escala NDS)            N = número; H = hombres; M = mujeres; IMC = índice de masa muscular; PC = perímetro de cintura; PAS = presión arterial sistólica; PAD = presión arterial diastólica.</p>				

Los parámetros bioquímicos estudiados en los grupos divididos según escala NDS vienen en la tabla 16, no observando diferencias entre grupos.

**Tabla 16**  
**Estudio de los parámetros bioquímicos en los sujetos divididos por escala NDS**

	Sin neuropatía	Con neuropatía		
	Grupo 0	Grupo 1	Grupo 2	estadística
<b>N (H/M)</b>	39 (26/13)	18 (12/6)	16 (9/7)	NS
<b>Glucemia B (mg/dL)</b>	149,6±44,7	171,2±58,0	174,7±48,3	NS
<b>HbA1c (%)</b>	7,6±1,6	8,1±1,8	7,7±1,6	NS
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0,9±0,3	1,1±0,5	0,9±0,4	NS
<b>CT (mg/dL)</b>	190,2±46,6	186,4±38,9	187,4±34,3	NS
<b>TG (mg/dL)</b>	148,7±91,8	148,0±83,9	145,1±42,3	NS
<b>cHDL (mg/dL)</b>	48,9±14,3	49,0±9,7	47,5±9,9	NS
<b>cLDL (mg/dL)</b>	111,6±42,9	108,4±26,4	111,3±28,7	NS
<b>ApoB (mg/dL)</b>	90,5±27,0	88,8±17,9	91,1±17,1	NS
<b>AST (U/L)</b>	23,5±9,1	19,5±7,7	18,8±4,0	NS
<b>ALT (U/L)</b>	29,5±17,7	20,8±10,0	18,1±6,9	NS
<b>GGT (U/L)</b>	37,7±40,6	35,8±20,2	32,5±20,1	NS
<b>PCR<sub>as</sub> (mg/dL)</b>	3,8±3,3	8,9±8,5	11,9±28,9	NS

Pie de tabla: Grupo 0 = no neuropatía; grupo 1 = neuropatía leve (3-5 puntos de la escala NDS) y grupo 2 = neuropatía moderada-grave (6-9 puntos de la escala NDS)  
Glucemia B = glucemia basal; HbA1c = hemoglobina glicosilada; FGe = filtrado glomerular estimado; CT = colesterol total; TG = triglicéridos, cLDL = colesterol de las lipoproteínas de baja densidad; cHDL = colesterol de las lipoproteínas de alta densidad; apoB = apolipoproteína B; AST = aspartato aminotransferasa; ALT = alanina aminotransferasa; GGT= gamma glutamil transpeptidasa; PCR<sub>as</sub> = proteína C reactiva de alta sensibilidad.

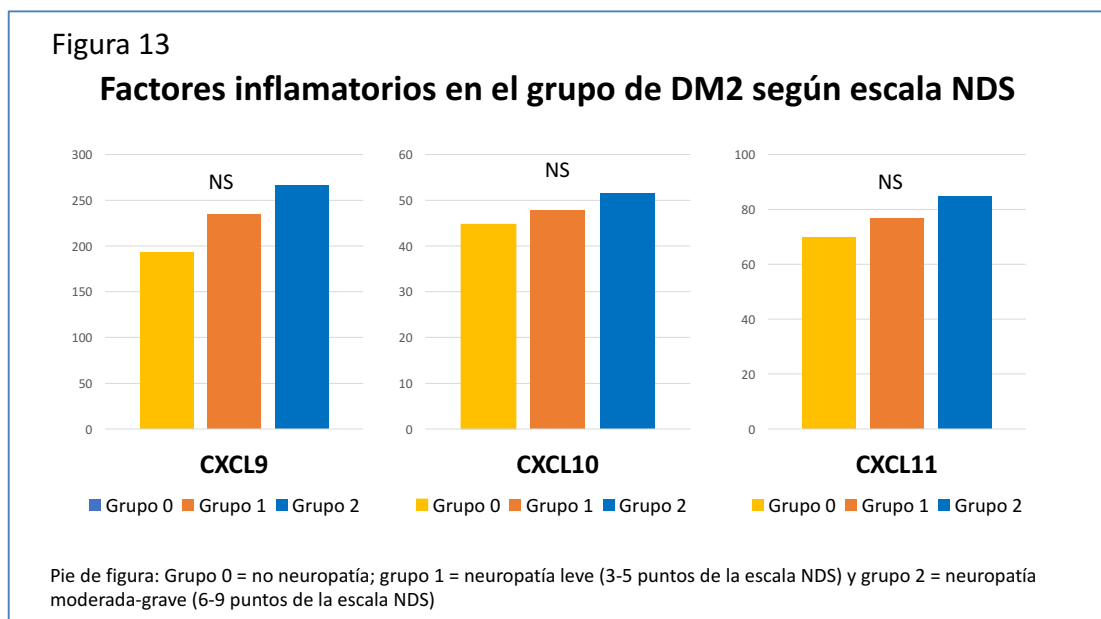


No se observaron diferencias en las quimioquinas CXCL10/IP-10, CXCL9/MIG, CXCL11/I-TAC, estudiadas en los grupos divididos según escala NDS (tabla 17 y figura 13).

**Tabla 17**  
**Valores de quimioquinas en los sujetos divididos por escala NDS**

	Sin neuropatía		Con neuropatía		
	Grupo 0	Grupo 1	Grupo 2		estadística
<b>N (H/M)</b>	39 (26/13)	18 (12/6)	16 (9/7)		NS
<b>CXCL10 (pg/mL)</b>	44,7±24,7	47,8±45,4	51,4±23,9		NS
<b>CXCL11 (pg/mL)</b>	69,7±80,6	76,7±61,4	84,7±126,3		NS
<b>CXCL9 (mg/mL)</b>	193,1±103,5	235,1±295,5	265,9±240,5		NS

Pie de tabla: Grupo 0 = no neuropatía; grupo 1 = neuropatía leve (3-5 puntos de la escala NDS) y grupo 2 = neuropatía moderada-grave (6-9 puntos de la escala NDS)



B) Para establecer los grupos de **sujetos diabéticos clasificados según la presencia o ausencia de sintomatología de polineuropatía, escala NSS.**

Clasificados según los criterios NSS (0 = normal, 1 = clínica neuropática leve, 2 = clínica moderada-grave).

Las características generales en los grupos según escala NSS vienen en la tabla 18, no observando diferencias entre grupos en los parámetros estudiados (edad, años evolución de la diabetes, presión arterial sistólica y diastólica, porcentaje de fumadores y bebedores moderados de alcohol).

<b>Tabla 18</b>				
<b>Características generales de los sujetos divididos por escala NSS</b>				
	<b>Sin neuropatía</b>	<b>Con neuropatía</b>		
	<b>Grupo 0</b>	<b>Grupo 1</b>	<b>Grupo 2</b>	<b>estadística</b>
<b>N</b>	49	9	15	NS
<b>Edad (años)</b>	61,9±11,3	62,6±8,3	63,9±10,9	NS
<b>Años evolución DM</b>	11,3±10,4	10,6±10,7	11,7±10,2	NS
<b>IMC</b>	31,1±5,4	32,2±3,2	31,3±5,9	NS
<b>PC (cm)</b>	107,3±11,5	109,4±8,7	106,1±12,2	NS
<b>PAS (mm Hg)</b>	146,7±19,6	155,9±21,3	145,2±19,6	NS
<b>PAD (mm Hg)</b>	85,4±12,8	81,4±13,4	79,2±11,4	NS
<b>Fumadores (%)</b>	33,3	33,3	43,8	NS
<b>Alcohol &gt;20g día (%)</b>	15,4	11,1	0	NS

**Tabla 18**  
**Características generales de los sujetos divididos por escala NSS**

	Sin neuropatía	Con neuropatía		
	Grupo 0	Grupo 1	Grupo 2	estadística
Grupo 0 = sin clínica de neuropatía; grupo 1 = clínica neuropática leve; grupo 2 = clínica moderada-grave). Clasificados según los criterios NSS (tabla 3)				
N = número; H = hombres; M = mujeres; IMC = índice de masa muscular; PC = perímetro de cintura; PAS = presión arterial sistólica; PAD = presión arterial diastólica.				

Los parámetros bioquímicos estudiados (glucemia, HbA1c, creatinina, parámetros lipídicos, enzimas hepáticas, GGT y proteína C reactiva) en los grupos divididos según escala NSS vienen en la tabla 19, no observando diferencias entre grupos en ninguno de los parámetros estudiados.

**Tabla 19**  
**Parámetros bioquímicos de los sujetos divididos por escala NSS**

	Sin neuropatía	Con neuropatía		
	Grupo 0	Grupo 1	Grupo 2	estadística
<b>Glucemia B (mg/dL)</b>	157,7±48,8	165,8±57,3	166,6±51,2	NS
<b>HbA1c (%)</b>	7,8±1,7	7,1±0,7	7,9±1,6	NS
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0,97±0,4	0,99±0,3	0,86±0,2	NS
<b>CT (mg/dL)</b>	188,6±46,4	189,1±28,3	188,2±33,8	NS
<b>TG (mg/dL)</b>	147,5±92,7	135,7±63,2	147,7±80,4	NS
<b>cHDL (mg/dL)</b>	49,5±13,1	48,0±13,6	45,8±8,2	NS

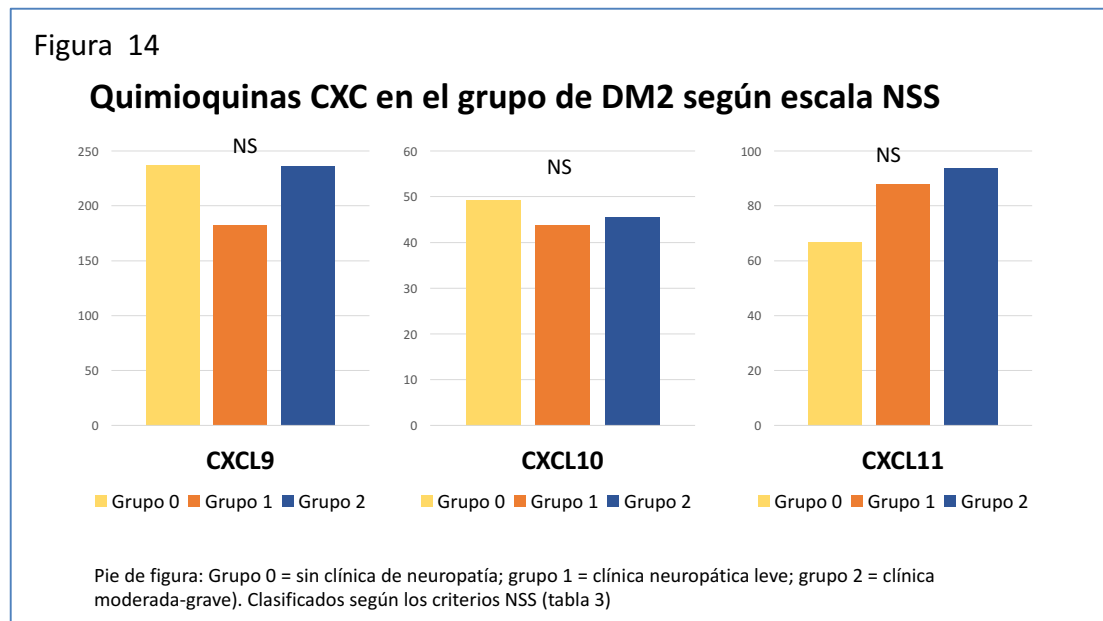
<b>Tabla 19</b>				
<b>Parámetros bioquímicos de los sujetos divididos por escala NSS</b>				
	<b>Sin neuropatía</b>	<b>Con neuropatía</b>		
	<b>Grupo 0</b>	<b>Grupo 1</b>	<b>Grupo 2</b>	estadística
<b>cLDL (mg/dL)</b>	109,9±38,9	114,1±33,2	111,3±29,9	NS
<b>ApoB (mg/dL)</b>	90,1±25,9	89,0±16,5	92,5±14,2	NS
<b>AST (U/L)</b>	21,3±8,3	23,0±9,5	20,5±6,9	NS
<b>ALT (U/L)</b>	25,2±15,6	25,3±17,9	22,8±10,8	NS
<b>GGT (U/L)</b>	38,3±36,8	29,6±15,8	32,5±21,8	NS
<b>PCR<sub>as</sub> (mg/dL)</b>	4,7±4,6	7,4±0,3	12,6±28,6	NS
<p>Grupo 0 = sin clínica de neuropatía; grupo 1 = clínica neuropática leve; grupo 2 = clínica moderada-grave). Clasificados según los criterios NSS (tabla 3)</p> <p>Glucemia B = glucemia basal; HBA1c = hemoglobina glicosilada; FGe = filtrado glomerular estimado; CT = colesterol total; TG = triglicéridos, cLDL = colesterol de las lipoproteínas de baja densidad; cHDL = colesterol de las lipoproteínas de alta densidad; apoB = apolipoproteína B; AST = aspartato aminotransferasa; ALT = alanina aminotransferasa; GGT= gamma glutamil transpeptidasa; PCR<sub>as</sub> = proteína C reactiva de alta sensibilidad.</p>				

Las quimioquinas del sistema CXCL (CXCL10/IP-10, CXCL9/MIG, CXCL11/I-TAC), tabla 20 y figura 14, estudiados en los grupos divididos según escala NSS vienen en la tabla abajo insertada, no observando diferencias entre grupos.

**Tabla 20**  
**Quimiocinas en los sujetos divididos según la escala NSS**

	Sin neuropatía	Con neuropatía		
	Grupo 0	Grupo 1	Grupo 2	estadística
CXCL10 (pg/mL)	49,3±41,2	43,7±27,8	45,6±27,8	NS
CXCL11 (pg/mL)	66,8±73,6	88,1±74,1	93,7±131,2	NS
CXCL9 (mg/mL)	237,5±272,3	182,0±42,9	236,1±228,9	NS

Grupo 0 = sin clínica de neuropatía; grupo 1 = clínica neuropática leve; grupo 2 = clínica moderada-grave). Clasificados según los criterios NSS (tabla 3)



## DISCUSIÓN

## Discusión

El número de casos estudiados no es muy elevado (n 73) lo que puede haber influido en los resultados, pero se trata de un estudio preliminar, para conocer si existe relación entre la quimioquinas mencionadas y la polineuropatía diabética, ya que hasta el momento de hacer la revisión no había ninguna referencia bibliográfica en Pub-Med, por lo que consideramos un estudio original y novedoso.

Los sujetos incluidos en el estudio con diabetes tipo 2, se dividieron como estaba protocolizado en 2 grupos con y sin neuropatía, siendo ambos grupos comparables, en cuanto a los factores que podían influir en el desarrollo de neuropatía, similar control metabólico, sin diferencias en el tiempo de evolución de la diabetes, ni en la función renal o el consumo de alcohol. No hubo diferencias entre sexos por lo que estudiamos al grupo de diabéticos sin separación por género, como teníamos proyectado en nuestro trabajo.

En un estudio del registro de diabetes del sistema Catalán de Salud<sup>131</sup> con 343.969 diabéticos en 2013, entre 30 y 90 años, el valor medio de la hemoglobina glicada (HbA1c) fue de alrededor del 7,2%. Nuestro grupo tenía una HbA1c media de 7,7%. En este grupo de sujetos diabéticos del sistema Catalán de Salud un 18,6% no seguían tratamiento farmacológico, en nuestro estudio estaban tratados solo con dieta el 6,8%, y recibieron tratamiento farmacológico con diferentes antidiabéticos, diferentes de insulina, el 61,6% e insulina sola o en combinación con otros antidiabéticos el 20%. En nuestro grupo el 57,5% recibían tratamiento farmacológico no insulínico y el 35% tratamiento con insulina sola o asociada a otros antidiabéticos. La población estudiada por nosotros tiene unas características que podemos considerar similares a las de la población general con diabetes.

El establecimiento de diagnóstico de neuropatía se basó en la respuesta al monofilamento, como ha sido aceptado y publicado por nuestro grupo y otros autores<sup>29,132-134</sup>. En nuestro trabajo se correlacionó significativamente ( $p < 0,001$ ) con los índices propuestos por la mayoría de sociedades científicas (NDS y NSS) (tabla 7), por lo que mantuvimos este método como sensible y adecuado para este estudio.

Otros autores<sup>135</sup>, han encontrado datos similares estableciendo una alta relación entre la exploración con el monofilamento realizada en varios puntos y el índice NDS, con una elevada sensibilidad y especificidad de la exploración con monofilamento para el diagnóstico de neuropatía. Mason et al<sup>136</sup> reportan una sensibilidad del 92% y una especificidad diagnóstica del 100% cuando se explora con el monofilamento en 10 puntos. Sin embargo, Baraz et al<sup>135</sup> mantienen que con la exploración de 3-4 puntos es suficiente, manteniendo una alta sensibilidad y especificidad diagnóstica, coincidiendo con la exploración realizada en nuestros pacientes.

Al estudiar los niveles de quimioquinas CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL11/I-TAC, entre los sujetos con neuropatía y aquellos sin neuropatía (monofilamento), encontramos diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,034$ ) en CXCL10  $57,6 \pm 38,3$  en el grupo con neuropatía y  $38,1 \pm 33,4$  pg/mL en el grupo sin neuropatía. No hubo diferencias estadísticamente significativas en CXCL9  $251,7 \pm 168,9$  y  $210,0 \pm 305,8$  pg/mL, ni en CXCL11 con  $77,6 \pm 93,4$  y  $72,1 \pm 83,7$  pg/mL en los grupos con y sin neuropatía, respectivamente. Encontramos una gran variabilidad con algunos valores extremos.

Al suprimir los valores extremos de las quimioquinas CXCL9 y CXCL11. Para la CXCL9 no se alcanzó significación estadística con valores de  $188,1 \pm 72,7$  pg/mL en sujetos con neuropatía y  $150,4 \pm 83,6$  pg/mL en los que no tenían neuropatía, con una  $p$  de 0,06. No alcanzando significación estadística, pero se encontró una mayor tendencia, posiblemente la falta de diferencias significativas pudo deberse al número de sujetos estudiados. La CXCL11 también se mantuvo sin diferencias significativas, aunque hubo una tendencia con  $59,0 \pm 50,8$  pg/mL en los sujetos con neuropatía (N 33) y  $43,0 \pm 36,5$  pg/mL en aquellos sin neuropatía (N 32).

---



Podemos decir que los sujetos con neuropatía tienen un aumento significativo de CXCL10 y una tendencia a aumentar CXCL9 y CXCL11.

Cuando estudiamos la relación de estas quimioquinas con la gravedad de neuropatía estudiada con las escalas NDS y NSS, no encontramos diferencias significativas, sino de nuevo una tendencia.

La quimioquina CXCL10 se clasifica funcionalmente como una quimioquina inflamatoria y parece tener un papel fundamental en el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 1. La quimioquina CXCL10 ha sido relacionada con la destrucción de células beta, mediada por linfocitos T, en la diabetes tipo 1<sup>137</sup>. Las lesiones encontradas en el páncreas de los sujetos con diabetes tipo 1, se caracterizaron por niveles elevados de CXCL10 e infiltración de linfocitos que expresan el receptor CXCR3 de esta quimioquina, considerándose que esta quimioquina tiene un importante papel en la inflamación que conduce a la insulinitis y la destrucción de las células beta, independientemente de la infección viral local<sup>138</sup>.

Esta quimioquina CXCL10 puede desempeñar un papel activo en el desencadenamiento de la destrucción de las células  $\beta$ , la apoptosis y la pérdida de función y por ello, puede tener un importante papel en el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 1 y 2. Muchos estudios demuestran cómo las citoquinas y quimioquinas tienen un papel activo en el desencadenamiento de la respuesta inmune contra la población de células  $\beta$ , estos conocimientos pueden abrir nuevos enfoques terapéuticos para combatir el inicio y la progresión de la enfermedad diabética<sup>139</sup>.

Un estudio que incluye pacientes con diabetes tipo 2 compara los niveles circulantes de CXCL1 y CXCL10 en pacientes diabéticos de tipo 2 y controles sanos, encontrando un aumento de los valores séricos de CXCL1 y CXCL10 en los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 en comparación con los controles, planteando que los niveles elevados de CXCL1 y CXCL10 podrían usarse como un marcador de inflamación y angiogénesis/angiostasis en la diabetes tipo 2<sup>140</sup>.

Estudios realizados en sujetos con diabetes tipo 2 que tienen lesiones microvasculares de la piel, encontraron que la inflamación inducida a través de la quimiotaxis CXCL10 conduce a la formación de vasos disfuncionales con capacidad reducida del drenaje linfático. Los vasos linfáticos con crecimiento aberrante podrían conducir a una disminución del drenaje de lípidos, pequeñas moléculas y células inmunitarias. Así persistiría la inflamación que dificultaría la regeneración de la piel<sup>141</sup>. El bloqueo específico de las citoquinas condujo a la regulación de un conjunto de genes que llevo a una mayor movilidad de células y macrófagos, mejorando la inflamación de la piel.

Se ha descrito que las quimioquinas inducibles por interferón, como son CXCL9 y CXCL10 son potentes inhibidoras de la angiogénesis e inductoras de la migración de linfocitos T activados y células natural "killer"<sup>142</sup>. Por lo que se ha estudiado su papel en la retinopatía diabética, en un estudio se demostró el aumento de estas quimioquinas en el vítreo de pacientes con retinopatía proliferativa y neovascularización activa. Los niveles de VEGF se correlacionaron positivamente con los de CXCL10. También, en estudios experimentales se encontró un aumento de la expresión génica de CXCL10 en las retinas de ratas diabéticas. Estos hallazgos sugieren una relación positiva entre la expresión de VEGF y quimioquinas en pacientes con retinopatía diabética proliferativa y también apuntan que CXCL10 podría estar asociada con la promoción de la fibrosis y el desarrollo de la retinopatía<sup>143</sup>.

Buscando el papel de estas quimioquinas se estudió en la encefalomiелitis autoinmune experimental y la diabetes espontanea en roedores la posibilidad de disminuir la gravedad de ambas situaciones bloqueando las quimioquinas con inmunoterapia. Estos datos dan paso a la posibilidad de la protección de diferentes enfermedades inflamatorias y tumorales con vacunas<sup>144</sup>.

Otro importante papel de estas quimioquinas está en relación con la diabetes tipo 2, diversas citoquinas y quimioquinas, que incluyen CXCL10 y CXCL 11, se asocian negativamente con la fetuina A. La fetuina-A, también conocida como glicoproteína

$\alpha$ -2 Heremans-Schmid (AHSG), es una glicoproteína expresada en varios tejidos fetales, en el adulto se expresa fundamentalmente en el hígado, siendo una proteína de secreción hepática. Tiene múltiples funciones biológicas y patológicas que incluyen la inhibición de la calcificación vascular, la regulación del metabolismo óseo, el control de la actividad proteasa, de la resistencia a la insulina, la migración de queratinocitos y la señalización proliferativa de células tumorales de mama. La fetuina-A actúa uniéndose a la subunidad  $\beta$  del receptor de insulina para inactivar el receptor tirosina quinasa que modula la señalización de la insulina<sup>145</sup>.

No se han relacionado estas quimioquinas CXCL10/IP-10, CXCL9/MIG, CXCL11/I-TAC que se caracterizan por ser el ligando fisiológico del receptor CXCR3 con la neuropatía diabética. En nuestro trabajo encontramos una asociación con la neuropatía diabética en la diabetes tipo 2, lo que abre una nueva vía de estudio con posibilidades de conocer mejor los mecanismos productores de la neuropatía y una posible vía terapéutica de gran interés, ya que actualmente no existe un tratamiento efectivo para revertir o prevenir la neuropatía, diferente a un adecuado control metabólico<sup>16</sup>, que en ocasiones no es suficiente para controlar la neuropatía y evitar su evolución.

La ADA recomienda, con un elevado nivel de evidencia, que en la diabetes tipo 1, el buen control metabólico, con glucemia casi normal, reduce de forma muy importante la incidencia de polineuropatía simétrica distal. Pero en pacientes con diabetes tipo 2 con enfermedad más avanzada y múltiples factores de riesgo y comorbilidades, el control metabólico (glucemia y HbA1C) intensivo, por sí solo, es modestamente eficaz en la prevención de la polineuropatía simétrica distal y los objetivos deben centrarse en la prevención en el estado de prediabetes y en otros factores no bien conocidos<sup>146</sup>.

## **CONCLUSIONES**

## Conclusiones

En la diabetes mellitus tipo 2

1. La polineuropatía diabética se relaciona con un aumento significativo de la quimioquina CXCL10. Cuando suprimimos los valores extremos la quimioquina CXCL9 aumenta en los sujetos con polineuropatía sin alcanzar valor estadísticamente significativo. Por lo que el papel inflamatorio y angiostático de estas quimioquinas puede ser relevante en el desarrollo de la lesión neuropática.
2. En nuestro estudio los valores de las quimioquinas CXCL10, CXCL9 y CXCL11 ligandos del receptor CXCR3 no se relacionaron con la gravedad de la polineuropatía diabética medida por las escalas NDS y NSS.

Se confirma la HIPOTESIS 0 que la quimioquina CXCL10 está relacionada con la neuropatía en la diabetes tipo 2.

## Fortalezas

Se trata de un trabajo preliminar para conocer la relación entre el sistema de quimioquinas ligandos del receptor CXCR3, las quimioquinas CXCL10, CXCL9, CXCL11, relacionadas con la inflamación, quimiotaxis, apoptosis, angiogénesis y el crecimiento celular y la neuropatía periférica.

Abre diferentes vías de investigación:

- Confirmar estos datos con un amplio número de sujetos.
- Conocer, con trabajos básicos, si estas quimioquinas están relacionadas con la etiopatogenia de la neuropatía.
- Estudiar trastornos del receptor CXCR3 (polimorfismos) y su relación con la diabetes y neuropatía.
- Entre otras.

## Debilidades

EL trabajo ha sido realizado con un pequeño número de sujetos, y probablemente la falta de resultados positivos con las quimioquinas CXCL11 son debidas al bajo número, ya que hay una tendencia casi significativa.

Con el aceptable control de los pacientes diabéticos incluidos, no hay neuropatía clínicamente grave en un número elevado de sujetos lo que podría explicar la falta de correlación entre la gravedad de la neuropatía y los niveles de quimioquinas.

## **BIBLIOGRAFIA**

## Bibliografía

---

<sup>1</sup> American Diabetes Association. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*. **2017** ;40(Suppl.1):S11–S24.

<sup>2</sup> Ascaso JF. Patogenia de la Diabetes tipo II. *Medicine (Barcelona)*. **1985**; 39:1661-8.

<sup>3</sup> Serrano Ríos M, Ascaso JF, Blázquez-Fernández, Cabezas Cerrato J, Carmena R, Escobar F, et al. La resistencia a la insulina y su implicación en múltiples factores de riesgo asociados a diabetes tipo 2. *Med Clin (Barc)*. **2002**; 119(12):458-63.

<sup>4</sup> Van Haeften TW, Pimenta W, Mitrakou A, Korytkowski M, Jenssen T, Yki-Jarvinen H, et al. Disturbances in beta-cell function in impaired fasting glycemia. *Diabetes*. **2002**; 51(suppl 1):S265-70.

<sup>5</sup> Ascaso JF. La diabetes mellitus: un problema mundial con una importante base genética. *Real Academia de Medicina de la Comunidad Valenciana*. Depósito Legal V.1.148-2016. Valencia, Artes Gráficas Soler SL, 2016.

<sup>6</sup> Estudio Valencia: investigación de la prevalencia de diabetes mellitus y síndrome metabólico. *Plan de Diabetes de la Comunitat Valenciana 2006-2010*. Generalitat Valenciana. Conselleria de Sanitat. ISBN: 978-84-482-3917-6. Valencia, CSGV, 2010.

<sup>7</sup> Soriguer F, Rojo-Martínez G, Almaraz MC, Esteva I, Ruiz de Adana MS, Morcillo S et al. Incidence of type 2 diabetes in southern Spain (Pizarra Study). *Eur J Clin Invest*. **2008**; 38(2):126-33.

<sup>8</sup> International Diabetes Federation. *Diabetes Atlas*. Sixth edition, 2014. [www.idf.org](http://www.idf.org).



- <sup>9</sup> Ibrahim N, Ming Moy F, Awalludin IA, Mohd Ali Z, Ismail IS. Effects of a Community-Based Healthy Lifestyle Intervention Program (Co-HELP) among Adults with Prediabetes in a Developing Country: A Quasi-Experimental Study. *PLoS One*. **2016**; 11(12):e0167123
- <sup>10</sup> Thomas RL, Dunstan FD, Luzio SD, Chowdhury SR, North RV, Hale SL, et al. Prevalence of diabetic retinopathy within a national diabetic retinopathy screening service. *Br J Ophthalmol*. **2015**; 99(1):64-8.
- <sup>11</sup> Bertelsen G, Peto T, Lindekleiv H, Schirmer H, Solbu MD, Toft I, et al. Tromsø eye study: prevalence and risk factors of diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol*. **2013**; 91(8):716-21.
- <sup>12</sup> Fernández Vigo J, Macarro A, Sabugal JF, Chacón J. Diabetes ocular (I): retinopatía diabética. *Av Diabetología* **1994**; 8(6):89-106.
- <sup>13</sup> Goday A. Epidemiología de la diabetes y sus complicaciones no coronarias. *Rev Esp Cardiol*. **2002**; 55(6):657-70.
- <sup>14</sup> Alonso-Morán E, Orueta JF, Fraile Esteban JI, Arteagoitia Axpe JM, Marqués González ML, Toro Polanco N, et al. The prevalence of diabetes-related complications and multimorbidity in the population with type 2 diabetes mellitus in the Basque Country. *BMC Public Health*. **2014**; 14:1059.
- <sup>15</sup> Cabezas-Cerrato J, for the Neuropathy Spanish Study Group of the Spanish Diabetes Society. The prevalence of clinical diabetic polyneuropathy in Spain: a study in primary care and hospital clinic groups. *Diabetologia* **1998**; 41(11):1263-9.
- <sup>16</sup> Pérez-Lazaro A, Ascaso JF, Chapa MA, Hernández A, Catalá M, Carmena R. Evolución de la neuropatía diabética periférica según el control metabólico tras 6 meses de seguimiento. *Med Clin (Barc)*. **1990**; 94(18): 693-6.
- <sup>17</sup> Basanta-Alario ML, Ferri J, Civera M, Martinez-Hervas S, Ascaso JF, Real JT. Diferencias en las características clínico-biológicas y prevalencia de complicaciones
-

---

crónicas en relación con el envejecimiento de pacientes con diabetes tipo 2. ***Endocrinol Nutr.* 2016;** 63(2):79-86.

<sup>18</sup> Boulton AJM, Vinik AI, Arezzo JC, Feldman EI, Freeman R, Malik RA, et al. Diabetic neuropathies. ***Diabetes Care.* 2005;** 28(4):956-62.

<sup>19</sup> 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.

<sup>20</sup> Pascuzzi RM. Peripheral neuropathy. ***Med Clin North Am.* 2009;** 93(2):317-42.

<sup>21</sup> Huizinga MM, Peltier A. Painful diabetic neuropathy: a management-centered review. ***Clin Diabetes.* 2007;** 25(1):6-15.

<sup>22</sup> Jane SW, Lin MS, Chiu WN, Beaton ED, Chen MY. Prevalence and characteristics of painful diabetic neuropathy in a large community-based diabetic population in the U.K. ***BMJ Open.* 2016;** 6(10):e011897.

<sup>23</sup> Vinik AI, Mehrabyan A. Diabetic neuropathies. ***Med Clin North Am.* 2004;** 88(4):947-99.

<sup>24</sup> Vázquez San Miguel F, Mauricio Puente D, Viadé Juliàc J. Neuropatía diabética y pie diabético. ***Medicine.* 2016;** 12(17):971-981

<sup>25</sup> Ascaso JF, Real JT. El pie diabético. En, ***Tratado SED de Diabetes Mellitus*** (ISBN 978-84-7903-613-3). Editores: Gomis, Feliu, Rovira, Oyarzabal. Madrid, Editorial Panamericana, 1970. pp 639-647

<sup>26</sup> Weledji E, Fokam P. Treatment of the diabetic foot – to amputate or not?. ***BMC Surgery.* 2014;** 14:83-88.

<sup>27</sup> American Diabetes Association. Microvascular Complications and Foot Care. ***Diabetes Care.* 2017;** 40(Suppl. 1):S88–S98

<sup>28</sup> 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.

<sup>29</sup> Feng Y, Schlösser FJ, Sumpio BE. The Semmes Weinstein monofilament examination as a screening tool for diabetic peripheral neuropathy. ***J Vasc Surg***. **2009**; 50(3):675-82.

<sup>30</sup> 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. ***J Vasc Surgery***. **2011**; 53(1):220-6.

<sup>31</sup> Freeman R. Not all neuropathy in diabetes is of diabetic etiology: differential diagnosis of diabetic neuropathy. ***Curr Diab Rep***. **2009**; 9(6):423-31.

<sup>32</sup> Hanewinkel R, Ikram MA, Van Doorn PA. Peripheral neuropathies. ***Handb Clin Neurol***. **2016**; 138:263-82.

<sup>33</sup> Pérez-Pevida B, Llaveró M, Gargallo J, Escalada J. Complicaciones microvasculares de la diabetes. ***Medicine***. **2016**; 12(17):958-70.

<sup>34</sup> Olmos P, Niklitschek S, Olmos R, Faúndez JI, Quezada TA, Bozinovic MA, et al. Bases fisiopatológicas para una clasificación de la neuropatía diabética. ***Rev Med Chile***. **2012**; 140(12):1593-605.

<sup>35</sup> Pinés Corrales PJ, Lomas Meneses A. Neuropatías diabéticas. ***Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado***. **2012**; 11(17):1021-31.

<sup>36</sup> Sandireddy R, Yerra VG, Areti A, Komirishetty P, Kumar A. Neuroinflammation and Oxidative Stress in Diabetic Neuropathy: Futuristic Strategies Based on These Targets. ***Int J Endocrinol***. **2014**; 2014:674987.

<sup>37</sup> Chung SS, Ho EC, Lam KS, Chung SK. Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. ***J Am Soc Nephrol***. **2003**; 14(3):233-6.

- <sup>38</sup> Oates PJ. Aldose reductase, still a compelling target for diabetic neuropathy. ***Current Drug Targets.* 2008;** 9(1):14-36.
- <sup>39</sup> Shakeel M. Recent advances in understanding the role of oxidative stress in diabetic neuropathy. ***Diabetes Metab Syndr.* 2015;** 9(4):373-8.
- <sup>40</sup> Croze ML, Soulage CO. Potential role and therapeutic interests of myo-inositol in metabolic diseases. ***Biochimie.* 2013;** 95(10):1811-27.
- <sup>41</sup> Suganya N, Bhakkiyalakshmi E, Sarada DV, Ramkumar KM. Reversibility of endothelial dysfunction in diabetes: role of polyphenols. ***Br J Nutr.* 2016;** 116(2):223-46.
- <sup>42</sup> Landowski LM, Dyck PJ, Engelstad J, Taylor BV. Axonopathy in peripheral neuropathies: Mechanisms and therapeutic approaches for regeneration. ***J Chem Neuroanat.* 2016;** 76(Pt A):19-27
- <sup>43</sup> Schmid U, Stopper H, Heidland A, Schupp N. Benfotiamine exhibits direct antioxidative capacity and prevents induction of DNA damage in vitro. ***Diabetes Metab Res Rev.* 2008.** 24(5): 371-7.
- <sup>44</sup> King RH. The role of glycation in the pathogenesis of diabetic polyneuropathy. ***Mol Pathol.* 2001;** 54(6):400-8.
- <sup>45</sup> Wada R, Yagihashi S. Role of advanced glycation end products and their receptors in development of diabetic neuropathy. ***Ann NY Acad Sci* 2005;** 1043: 598-604
- <sup>46</sup> Al-Dallen S, Chavez Rodríguez T, Martínez Sánchez G, Ferreira Bega E, León Fernández O. El equilibrio redox en la diabetes y sus complicaciones. ***Acta Farm Bonaerense.* 2004;** 23(2):231-242.
- <sup>47</sup> Dorado Martínez C, Rugerio Vargas C, Rivas Arancibia S. Estrés oxidativo y neurodegeneración. ***MG Rev Fac Med UNAM.* 2003;**46(6):229-235.
- <sup>48</sup> Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. ***Circ Res.* 2010;**
-

---

107(9):1058-1070.

<sup>49</sup> 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.

<sup>50</sup> Ellenberg M. Current status of diabetic neuropathy. *Metabolism*. **1973**; 22(5):657-62.

<sup>51</sup> Timperley WR, Boulton AJ, Davies-Jones GA, Jarratt JA, Ward JD. Small vessel disease in progressive diabetic neuropathy associated with good metabolic control. *J Clin Pathol*. **1985**; 38:1030-8.

<sup>52</sup> Storino M, Contreras M, Rojano J, Serrano R, Nouel A. Complicaciones de la diabetes y su asociación con el estrés oxidativo: Un viaje hacia el daño endotelial. *Rev Colomb Cardiol*. **2014**; 21(6):392-398.

<sup>53</sup> 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.

<sup>54</sup> 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.

<sup>55</sup> Mohapatra D, Damodar KS. Glycaemia Status, Lipid Profile and Renal Parameters in Progressive Diabetic Neuropathy. *J Clin Diagn Res*. **2016**; 10(9):CC14-CC17.

<sup>56</sup> Škovierová H, Vidomanová E, Mahmood S, Sopková J, Drgová A, Červeňová T, et al. The Molecular and Cellular Effect of Homocysteine Metabolism Imbalance on Human Health. *Int J Mol Sci*. **2016**; 17(10). pii: E1733.

- <sup>57</sup> Hannibal L, Blom HJ. Homocysteine and disease: Causal associations or epiphenomenons?. *Mol Aspects Med.* **2016.** Nov 19. pii: S0098-2997(16)30091-7. doi: 10.1016/j.mam.2016.11.003.
- <sup>58</sup> Bickel C, Schnabel RB, Zengin E, Lubos E, Rupprecht H, Lackner K, et al. Homocysteine concentration in coronary artery disease: Influence of three common single nucleotide polymorphisms. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* **2016.** Sep 17. pii: S0939-4753(16)30160-0. doi: 10.1016/j.numecd.2016.09.005.
- <sup>59</sup> de Luis DA, Fernandez 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.
- <sup>60</sup> González R, Pedro T, Martínez-Hervás 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.
- <sup>61</sup> 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.
- <sup>62</sup> Papatheodorou L, Weiss N. Vascular oxidant stress and inflammation in hyperhomocysteinemia. *Antioxid Redox Signal.* **2007;** 9(11):1941-58.
- <sup>63</sup> Aguirre Errasti C, Egurbide Arberas MV, Martínez Berriotxo A. Present role of homocysteine in clinical medicine. *Med Clin (Barc).* **2009;** 133(12):472-8.
- <sup>64</sup> Wang D, Chen YM, Ruan MH, Zhou AH, Qian Y, Chen C. Homocysteine inhibits neural stem cells survival by inducing DNA interstrand cross-links via oxidative stress. *Neurosci Lett.* **2016;** 635:24-32.
-

- <sup>65</sup> Turrens J. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* **2003**; 552(2):335-44.
- <sup>66</sup> Martínez Abundis E, Sánchez Rodríguez M, El Hafidi Bentlakder M. Participación de la mitocondria en el desarrollo de estrés oxidativo en la obesidad. *Bioquímica.* **2005**; 30(3):82-9.
- <sup>67</sup> Wakabayashi N, Slocum SL, Skoko JJ, Shin S, Kensler TW. When NRF2 talks, who's listening?. *Antiox Red-Ox Signalin.* **2010**; 13(11):1649-63.
- <sup>68</sup> Cameronand NE, Cotter MA. Pro-inflammatory mechanisms in diabetic neuropathy: focus on the nuclear factor kappa B pathway. *Current Drug Targets* **2008**; 9(1): 60-7.
- <sup>69</sup> Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-κB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol.***2007**; 8(1):49-62.
- <sup>70</sup> Yousefzadeh N, Alipour MR, Soufi FG. Deregulation of NF-κB-miR-146a negative feedback loop may be involved in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *J Physiol Biochem.* **2015**; 71(1):51-8.
- <sup>71</sup> de Winther M, Kanters E, Kraal G, Hofker M. Nuclear factor κB signaling in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2005**; 25:904-14.
- <sup>72</sup> Tak P, Firestein G. NF-κB: A key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest.* **2001**; 107(1):7-11.
- <sup>73</sup> Filella X, Molina R, Ballesta A. Estructura y función de las citocinas. *Med Integral.* **2002**; 39(2):63-71.
- <sup>74</sup> Colvin RA, Campanella GS, Sun J, Luster AD. Intracellular domains of CXCR3 that mediate CXCL9, CXCL10, and CXCL11 function. *J Biol Chem.* **2004**; 279(29):30219-27.
- <sup>75</sup> Colobran R, Pujol-Borrell R, Armengol MP, Juan M. The chemokine network. I. How the genomic organization of chemokines contains clues for deciphering their

functional complexity. *Clin Exp Immunol.* **2007**; 148(2):208-17.

<sup>76</sup> Colobran R, Pujol-Borrell R, Armengol MP, Juan M. The chemokine network. II. On how polymorphisms and alternative splicing increase the number of molecular species and configure intricate patterns of disease susceptibility. *Clin Exp Immunol.* **2007**; 150(1):1-12.

<sup>77</sup> Nesmelova IV, Sham Y, Gao J, Mayo KH. CXC and CC Chemokines Form Mixed Heterodimers. Association free energies from molecular dynamics simulations and experimental correlations. *J Biol Chemistry.* **2008**; 283(35):24155-66.

<sup>78</sup> Torres Palomino DC, Cavalheiro Marti L. Chemokines and immunity. *Einstein.* **2015**; 13(3):469-73.

<sup>79</sup> Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hébert CA, Horuk R, Matsushima K, et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev.* **2000**; 52(1):145-76.

<sup>80</sup> Van Raemdonck K, Van den Steen PE, Liekens S, Van Damme J, Struyf S. CXCR3 ligands in disease and therapy. *Cytok Growth Factor Rev.* **2015**; 26(3): 311-27.

<sup>81</sup> Mellado García M, Fernández Soriano S, Rodríguez Frade J. Tráfico leucocitario. quimiocinas. moléculas de adhesión. distribución de las células del sistema inmune. *Medicine.* **2005**; 9(33):2181-8.

<sup>82</sup> Le Y, Zhou Y, Iribarren P, Wang J. Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease. *Cell Mol Immunol.* **2004**; 1(2):95-104.

<sup>83</sup> Kowarik MC, Cepok S, Sellner J, Grummel V, Weber MS, Korn T, et al. CXCL13 is the major determinant for B cell recruitment to the CSF during neuroinflammation. *J Neuroinflammation.* **2012**; 9:93-104.



- <sup>84</sup> Loetscher M, Loetscher P, Brass N, Meese E, Moser B. Lymphocyte-specific chemokine receptor CXCR3: regulation, chemokine binding and gene localization. ***Eur J Immunol.* 1998**; 28(11):3696-705.
- <sup>85</sup> Aramori I, Ferguson SS, Bieniasz PD, Zhang J, Cullen B, Caron MG. Molecular mechanism of desensitization of the chemokine receptor CCR-5: receptor signaling and internalization are dissociable from its role as an HIV-1 co-receptor. ***EMBO J.* 1997**; 16(15):4606-16.
- <sup>86</sup> Berchiche YA, Sakmar TP. CXC Chemokine Receptor 3 Alternative Splice Variants Selectively Activate Different Signaling Pathways. ***Mol Pharmacol.* 2016**; 90(4):483-95.
- <sup>87</sup> Bosisio D, Salvi V, Gagliostro V, Sozzani S. Angiogenic and antiangiogenic chemokines. ***Chem Immunol Allergy.* 2014**; 99:89-104.
- <sup>88</sup> Karin N, Wildbaum G, Thelen M. Biased signaling pathways via CXCR3 control the development and function of CD4+ T cell subsets. ***J Leukoc Biol.* 2016**; 99(6):857-62.
- <sup>89</sup> Ruffilli I, Ferrari SM, Colaci M, Ferri C, Politti U, Antonelli A, Fallahi P. CXCR3 and CXCL10 in autoimmune thyroiditis. ***Clin Ter.* 2014**; 165(3):e237-42.
- <sup>90</sup> Fenwick PS, Macedo P, Kitty IC, Barnes PJ, Donnelly LE. Effect of JAK Inhibitors on Release of CXCL9, CXCL10 and CXCL11 from Human Airway Epithelial Cells. ***PLoS One.* 2015**; 10(6):e0128757.
- <sup>91</sup> Basset L, Chevalier S, Danger Y, Arshad MI, Piquet-Pellorce C, Gascan H, Samson M. Interleukin-27 and IFN $\gamma$  regulate the expression of CXCL9, CXCL10, and CXCL11 in hepatitis. ***J Mol Med (Berl).* 2015**; 93(12):1355-67.
- <sup>92</sup> Tacke F, Zimmermann HW, Berres ML, Trautwein C, Wasmuth HE. Serum chemokine receptor CXCR3 ligands are associated with progression, organ dysfunction and complications of chronic liver diseases. ***Liver Int.* 2011**; 31(6):840-9.

- <sup>93</sup> Pineda-Tenor D, Berenguer J, Jiménez-Sousa MA, Guzmán-Fulgencio M, Aldámiz-Echevarria T, Carrero A, et al. CXCL9, CXCL10 and CXCL11 polymorphisms are associated with sustained virologic response in HIV/HCV-coinfected patients. *J Clin Virol.* **2014**; 61(3):423-9.
- <sup>94</sup> Kanda N, Shimizu T, Tada Y, Watanabe S. IL-18 enhances IFN-gamma-induced production of CXCL9, CXCL10, and CXCL11 in human keratinocytes. *Eur J Immunol.* **2007**; 37(2):338-50.
- <sup>95</sup> Tworek D, Kuna P, Młynarski W, Górski P, Pietras T, Antczak A. MIG (CXCL9), IP-10 (CXCL10) and I-TAC (CXCL11) concentrations after nasal allergen challenge in patients with allergic rhinitis. *Arch Med Sci.* **2013**; 9(5):849-53.
- <sup>96</sup> Ferrari SM, Ruffilli I, Colaci M, Antonelli A, Ferri C, Fallahi P. CXCL10 in psoriasis. *Adv Med Sci.* **2015**; 60(2):349-54.
- <sup>97</sup> Muntyanu A, Abji F, Liang K, Pollock RA, Chandran V, Gladman DD. Differential gene and protein expression of chemokines and cytokines in synovial fluid of patients with arthritis. *Arthritis Res Ther.* **2016**; 18(1):296.
- <sup>98</sup> Papadakis KA, Prehn J, Zhu D, Landers C, Gaiennie J, Fleshner PR, et al. Expression and regulation of the chemokine receptor CXCR3 on lymphocytes from normal and inflammatory bowel disease mucosa. *Inflamm Bowel Dis.* **2004**; 10(6):778-88.
- <sup>99</sup> Geffers R, Lang KS, Buer J, Büning J, Westendorf AM. IL-10 downregulates CXCR3 expression on Th1 cells and interferes with their migration to intestinal inflammatory sites. *Mucosal Immunol.* **2016**; 9(5):1263-77.
- <sup>100</sup> Cao Y. Opinion: emerging mechanisms of tumour lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Nat Rev Cancer.* **2005**; 5(9):735-43.
- <sup>101</sup> Prats AC, Van den Berghe L, Rayssac A, Ainaoui N, Morfoisse F, Pujol F, et al. CXCL4L1-fibstatin cooperation inhibits tumor angiogenesis, lymphangiogenesis and metastasis. *Microvasc Res.* **2013**; 89:25-33.
-

- <sup>102</sup> Olsnes AM, Motorin D, Rynningen A, Zaritskey AY, Bruserud O. T lymphocyte chemotactic chemokines in acute myelogenous leukemia (AML): local release by native human AML blasts and systemic levels of CXCL10 (IP- 10), CCL5 (RANTES) and CCL17 (TARC). *Cancer Immunol Immunother.* **2006**; 55(7):830-40.
- <sup>103</sup> Ma B, Khazali A, Wells A. CXCR3 in carcinoma progression. *Histol Histopathol.* **2015**; 30(7):781-92.
- <sup>104</sup> Sato Y, Motoyama S, Nanjo H, Wakita A, Yoshino K, Sasaki T, et al. CXCL10 Expression Status is Prognostic in Patients with Advances Thoracic Esophageal Squamous Cell carcinoma. *Ann Surg Oncol.* **2016**; 23(3):936-42.
- <sup>105</sup> Bronger H, Singer J, Windmüller C, Reuning U, Zech D, Delbridge C, et al. CXCL9 and CXCL10 predict survival and are regulated by cyclooxygenase inhibition in advanced serous ovarian cancer. *Br J Cancer.* **2016**; 115(5):553-63.
- <sup>106</sup> Bu H, Shu B, Gao F, Liu C, Guan X, Ke C, et al. Spinal IFN- $\gamma$ -induced protein-10 (CXCL10) mediates metastatic breast cancer-induced bone pain by activation of microglia in rat models. *Breast Cancer Res Treat.* **2014**; 143(2):255-63.
- <sup>107</sup> Karin N, Wildbaum G. Therapeutic implications in Autoimmune and Cancer Diseases. *Front Immunol.* **2015**; 6:609.
- <sup>108</sup> Zhou YQ, Gao HY, Guan XH, Yuan X, Fang GG, Chen Y, Ye DW. Chemokines and Their Receptors: Potential Therapeutic Targets for Bone Cancer Pain. *Curr Pharm Des.* **2015**; 21(34):5029-33
- <sup>109</sup> Andrews SP, Cox RJ. Small Molecule CXCR3 Antagonists. *J Med Chem.* **2016**; 59(7):2894-917.
- <sup>110</sup> Christen U, Hintermann E. Dual Role of CXCL10 as Conductor of Cellular Trafficking during Type 1 Diabetes. *Int J Biomed Sci.* **2007**; 3(2):86-92.
-

- <sup>111</sup> Fallahi P, Corrado A, Di Domenicantonio A, Frenzilli G, Antonelli A, Ferrari SM. CXCR3, CXCR5, CXCR6, and CXCR7 in Diabetes. *Curr Drug Targets*. **2016**; 17(5):515-9
- <sup>112</sup> Ferrari SM, Fallahi P, Vita R, Antonelli A, Benvenega S. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-  $\gamma$  in Thyroid Autoimmunity. *PPAR Res*. **2015**; 2015:232818
- <sup>113</sup> Altara R, Mallat Z, Booz GW, Zouein FA. The CXCL10/CXCR3 Axis and Cardiac Inflammation: Implications for Immunotherapy to Treat Infectious and Noninfectious Diseases of the Heart. *J Immunol Res*. **2016**; 2016:4396368.
- <sup>114</sup> Altara R, Manca M, Brandão RD, Zeidan A, Booz GW, Zouein FA. Emerging importance of chemokine receptor CXCR3 and its ligands in cardiovascular diseases. *Clin Sci (Lond)*. **2016**; 130(7):463-78.
- <sup>115</sup> Kobayashi H, Novick AC, Toma H, Fairchild RL. Chronic antagonism of Mig inhibits cellular infiltration and promotes survival of class II MHC disparate skin allografts. *Transplantation*. **2002**; 74(3):387-95.
- <sup>116</sup> Heller EA, Liu E, Tager AM, Yuan Q, Lin AY, Ahluwalia N, et al. Chemokine CXCL10 promotes atherogenesis by modulating the local balance of effector and regulatory T cells. *Circulation*. **2006**; 113(19):2301-12.
- <sup>117</sup> Pitsilos S, Hunt J, Mohler ER, Prabhakar AM, Poncz M, Dawicki J, et al., Platelet factor 4 localization in carotid atherosclerotic plaques: correlation with clinical parameters. *Thromb Haemost*. **2003**; 90(6):1112-20.
- <sup>118</sup> Mirabelli-Badenier M, Braunersreuther V, Viviani GL, Dallegri F, Quercioli A, Veneselli E, et al. CC and CXC chemokines are pivotal mediators of cerebral injury in ischaemic stroke. *Thromb Haemost* **2011**; 105(3):409-20.
- <sup>119</sup> Bsibsi M, Peferoen LA, Holtman IR, Nacken PJ, Gerritsen WH, Witte ME, et al. Demyelination during multiple sclerosis is associated with combined activation of microglia/macrophages by IFN- $\gamma$  and alpha B-crystallin. *Acta Neuropathol*. **2014**; 128(2):215-29.

- <sup>120</sup> Liu C, Cui G, Zhu M, Kang X, Guo H. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: chemokines produced by astrocytes and chemokine receptors. *Int J Clin Exp Pathol.* **2014**; 7(12):8342-55.
- <sup>121</sup> Pranzatelli MR, Tate ED, McGee NR, Travelstead AL, Verhulst SJ, Ransohoff RM. Expression of CXCR3 and its ligands CXCL9, -10 and -11 in paediatric opsoclonus-myoclonus syndrome. *Clin Exp Immunol.* **2013**; 172(3):427-36.
- <sup>122</sup> Zychowska M, Rojewska E, Pilat D, Mika J. The Role of Some Chemokines from the CXC Subfamily in a Mouse Model of Diabetic Neuropathy. *J Diabetes Res.* **2015**; 2015:750182:1-13.
- <sup>123</sup> Tang W, Lv Q, Chen XF, Zou JJ, Liu ZM, Shi YQ. CD8+ T Cell-Mediated Cytotoxicity toward Schwann Cells Promotes Diabetic Peripheral Neuropathy. *Cell Physiol Biochem.* **2013**; 32:827-37.
- <sup>124</sup> Ayres M, Ayres Jr M, Murcia C, Ayres DL, dos Santos AD. *BioEstat: aplicaciones estadísticas para las ciencias biológicas y médicas*. ISBN 85-85927-10-3. Brasilia. Sociedad Civil Mamiraa. 2004.
- <sup>125</sup> Boulton A J. Guidelines for diagnosis and outpatient management of diabetic peripheral neuropathy. *Diabet Met.* **1998**; 15:508-14.
- <sup>126</sup> Molina M. Estudio del estrés oxidativo en la polineuropatía diabética. *Tesis Doctoral*. Departamento de Medicina. Universitat de Valencia. 2014.
- <sup>127</sup> 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.
- <sup>128</sup> Delwaide PJ, Toulouse P. The Jendrassik maneuver: quantitative analysis of reflex reinforcement by remote voluntary muscle contraction. *Adv Neurol.* **1983**; 39:661-9.

- <sup>129</sup> Ascaso JF, Merchante A, Lorente RI, Real JT, Martinez-Valls J, Carmena R. A study of insulin resistance using the minimal model in nondiabetic familial combined hyperlipidemic patients. *Metabolism*. **1998**; 47(5):508-13.
- <sup>130</sup> Little RR. Glycated hemoglobin standardization-(NGSP) perspective. *Clin Chem Lab Med*. **2003**; 41(9):1191-8.
- <sup>131</sup> Mata-Cases M, Franch-Nadal J, Real J, Mauricio D. Glycaemic control and antidiabetic treatment trends in primary care centres in patients with type 2 diabetes mellitus during 2007–2013 in Catalonia: a population-based study. *BMJ Open*. **2016**; 6:e012463.
- <sup>132</sup> Craig AB, Strauss MB, Daniller A, Miller SS. Foot sensation testing in the patient with diabetes: introduction of the quick & easy assessment tool. *Wounds*. **2014**; 26(8):221-31.
- <sup>133</sup> Sharma S, Kerry C, Atkins H, Rayman G. The Ipswich Touch Test: a simple and novel method to screen patients with diabetes at home for increased risk of foot ulceration. *Diabet Med*. **2014**; 31(9):1100-3.
- <sup>134</sup> Lazo ML, Bernabé-Ortiz A, Pinto ME, Ticse R, Malaga G, Sacksteder K, et al. Diabetic peripheral neuropathy in ambulatory patients with type 2 diabetes in a general hospital in a middle income country: a cross-sectional study. *PLoS One*. **2014**; 9(5):e95403.
- <sup>135</sup> Baraz S, Zarea K, Shahbazian HB, Latifi SM. Comparison of the accuracy of monofilament testing at various points of feet in peripheral diabetic neuropathy screening. *J Diabetes Metab Disord*. **2014**; 13(1):19.
- <sup>136</sup> Mason J, O’Keeffe C, McIntosh A, Hutchinson A, Booth A, Young R: A systematic review of foot ulcer in patients with type 2 diabetes mellitus. I. Prevention. *Diabet Med*. **1999**; 16(10):799–800.

- <sup>137</sup> Ahmadi Z, Arababadi MK, Hassanshahi G. CXCL10 activities, biological structure, and source along with its significant role played in pathophysiology of type I diabetes mellitus. *Inflammation*. **2013**; 36(2):364-71.
- <sup>138</sup> Roep BO, Kleijwegt FS, van Halteren AG, Bonato V, Boggi U, Vendrame F, et al. Islet inflammation and CXCL10 in recent-onset type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol*. **2010**; 159(3):338-43.
- <sup>139</sup> Paroni F, Domsgen E, Maedler K. CXCL10 - a path to  $\beta$ -cell death. *Islets*. **2009**; 1(3):256-9.
- <sup>140</sup> Sajadi SM, Khoramdelazad H, Hassanshahi G, Rafatpanah H, Hosseini J, Mahmoodi M, et al. Plasma levels of CXCL1 (GRO-alpha) and CXCL10 (IP-10) are elevated in type 2 diabetic patients: evidence for the involvement of inflammation and angiogenesis/angiostasis in this disease state. *Lab*. **2013**; 59(1-2):133-7
- <sup>141</sup> Haemmerle M, Keller T, Egger G, Schachner H, Steiner CW, Stokic D, et al. Enhanced lymph vessel density, remodeling, and inflammation are reflected by gene expression signatures in dermal lymphatic endothelial cells in type 2 diabetes. *Diabetes*. **2013**; 62(7):2509-29.
- <sup>142</sup> Keeley EC, Mehrad B, Strieter RM. Chemokines as mediators of tumor angiogenesis and neovascularization. *Exp Cell Res*. **2011**; 317:685-90.
- <sup>143</sup> Nawaz MI, Van Raemdonck K, Mohammad G, Kangave D, Van Damme J, Abu El-Asrar AM, et al. Autocrine CCL2, CXCL4, CXCL9 and CXCL10 signal in retinal endothelial cells and are enhanced in diabetic retinopathy. *Exp Eye Res*. **2013**; 109:67-76.
- <sup>144</sup> O'Connor RA, Li X, Blumerman S, Anderton SM, Noelle RJ, Dalton DK. Adjuvant immunotherapy of experimental autoimmune encephalomyelitis: immature myeloid cells expressing CXCL10 and CXCL16 attract CXCR3+CXCR6+ and myelin-specific T cells to the draining lymph nodes rather than the central nervous system. *J Immunol*. **2012**; 188(5):2093-101.

---

<sup>145</sup> Mukhopadhyay S, Mondal SA, Kumar M, Dutta D. Proinflammatory and antiinflammatory attributes of fetuin-a: a novel hepatokine modulating cardiovascular and glycemic outcomes in metabolic syndrome. *Endocr Pract.* **2014**; 20(12):1345-51.

<sup>146</sup> Pop-Busui R, Boulton AJ, Feldman EL, Bril V, Freeman R, Malik RA, et al. Diabetic Neuropathy: A Position Statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care.* **2017**; 40(1):136-54.