Universitat de les Illes Balears

TESIS DOCTORAL
2019

¿Es útil la heparina de bajo peso molecular en el tratamiento de las úlceras en las extremidades inferiores del paciente diabético en atención primaria?

Manuel Carlos Valeri Rullan García

Universitat
de les Illes Balears

TESIS DOCTORAL
2019

Programa de Doctorado en Investigación Traslacional en Salud Pública y Enfermedades de Alta Prevalencia

¿Es útil la heparina de bajo peso molecular en el tratamiento de las úlceras en las extremidades inferiores del paciente diabético en atención primaria?

Manuel Carlos Valeri Rullan García

Director: Dr. Joan Llobera Cànaves
Director: Dr. Lluís Masmiquel Comas
Tutor: Dr.Miquel BennasarVeny

Publicaciones derivadas de esta tesis:

- Rullan M, Cerdà L, Frontera G, Llobera J. [Diabetic foot ulcers and treatment with low molecular weight heparin]. Med Clin (Barc). 2002 May 25; 118(19):757.

- Rullan M, Cerda L, Frontera G, Llobera J, Masmiquel L, Olea JL. [Triple-blind clinical trial with placebo control to evaluate the efficacy of a heparin of low molecular weight (bemiparin) for treating slow-responding ulcers in diabetic foot in primary care]. Aten Primaria. 2003 May 15; 31(8):539-44.

- Rullan M, Cerda L, Frontera G, Masmiquel L, Llobera J. Treatment of chronic diabetic foot ulcers with bemiparin: a randomized, triple-blind, placebo-controlled, clinical trial. Diabet Med. 2008 Sep; 25(9):1090-5.

LEMA:

En medicina y biología, los fenómenos son tan complejos que muy raras veces existe una sola interpretación (Sorgi y Hawkins, 1990).

Dedicatoria:

A mi padre y madre, a mis hijos y a las esposas que me han soportado.

Agradecimientos:

A los voluntarios del ensayo, a los que alimentamos la esperanza de curación y lograron alivio, y especialmente a los que no lo lograron.

Al Dr. Joan Llobera Cànaves, suyo es el mérito de armar, pilotar y mantener en navegación esta tesis sorteando naufragios, en larga travesía.

Al Dr. Lluís Masmiquel Comas por la labor desempeñada en la dirección de esta tesis. Su experiencia, rigor científico y espíritu crítico han sido de gran importancia para la realización del estudio. Quiero agradecer también, con especial énfasis, la confianza depositada en mí a lo largo de estos años.

A Guiem Frontera que lo pasó todo a números, me explicó el significado y aportó brillantes argumentos. Buena parte de este trabajo es de su contribución, y está impregnado de su estilo.

A la enfermera Llùcia Cerdà Provenzal, que dedicó los más exquisitos cuidados a los pacientes; de ella es el mérito de la alta adherencia de los participantes y del rigor en la obtención de datos. Así como a los profesionales de atención primaria y hospitalaria que nos dieron su apoyo y ayuda, y lo siguen dando a las iniciativas de investigación cada vez más numerosas y de mejor calidad.

A Francisco Campoamor y Fernando Rigo por compartir su espíritu investigador.

A Margarita Gómez Suau y con grato recuerdo al Dr. Horacio Rico que abrió la puerta del postgrado a desarrollar nuestras inquietudes.

A la Universitat de les Illes Balears por acoger y apoyar nuestro proyecto.

A la gerencia de atención primaria de Mallorca por su compromiso a través de las distintos equipos directivos que se han ido sucediendo hasta estos días y especialmente a su imprescindible equipo de ayuda a la investigación: Oana, Alfonso, Joana, Magdalena, Silvia, Caterina, Clara, Patricia, Ignacio, Marc.

Universitat de les Illes Balears

Dr. Joan Llobera Cànaves
Dr. Lluis Masmiquel Comas

DECLARAN:

Que la tesis doctoral que lleva por título ¿Es útil la heparina de bajo peso molecular en el tratamiento de las úlceras en extremidades inferiores del paciente diabético en atención primaria? Presentada por Manuel C. V. Rullan García para la obtención del título de doctor, ha sido dirigida bajo su supervisión.

Y para que quede constancia de ello firmo este documento.

Firma | Firma

Dr. Joan Llobera | Dr. Lluis Masmiquel

Palma,

ÍNDICE

1. LISTA DE ABREVIATURASY DEFINICIÓN DE TÉRMINOS 2

2. RESUMEN: 4

3. INTRODUCCIÓN: Estado de la cuestión.....8

3.1 La diabetes mellitus 9

3.1.1 Epidemiología de la Diabetes.....10

3.1.2 El daño vascular en la diabetes mellitus: 13

3.1.3 La disfunción endotelial: 16

3.1.4 Las complicaciones crónicas.....22

3.1.5 El pie diabético 28

3.2 Los glicosaminoglicanos 32

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....38

5. MÉTODOS 41

5.1 Diseño del estudio. 41

5.2. Población del estudio 42

5.3 Desarrollo del estudio.....44

5.4 La intervención: 48

5.5 La Información.....50

5.6. Plan de análisis 52

5.7 Aspectos éticos y de buena práctica clínica 55

6. RESULTADOS 57

7. DISCUSIÓN 85

8. CONCLUSIONES 95

9. BIBLIOGRAFÍA.....97

1. LISTA DE ABREVIATURASY DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

AA: Acontecimiento adverso

AAG: Acontecimiento adverso grave

ADA: Asociación Americana de Diabetes

AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios.

ALT: Alanina Aminotransferasa

ARR: Diferencia de proporciones absolutas

AST: Aspartato aminotransferasa

CEIC: Comité de ética de investigación clínica.

CRD: Cuaderno de recogida de datos.

CRO: Organización de investigación por contrato

DCI: Denominación Común Internacional

DM.: Diabetes Mellitus

EMEA: Agencia Europea del Medicamento

GAP: Gerencia de Atención Primaria

GGT: Gamma glutamil transpeptidasa

HbA1C: Hemoglobina glucosilada.

HBPM: Heparina de bajo peso molecular

HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos

HNF: Heparina no fraccionada

ICAM-1: Molécula de adhesión celular intercelular 1

IGF-1: Factor de crecimiento semejante a insulina.

NNT: Numero de sujetos necesarios a tratar

OMS: Organización Mundial de la Salud

OR: Odds Ratio

PAS: Presión arterial sistólica

PAD: Presión arterial diastólica

PCR: Proteína C reactiva

PM: Peso molecular

RR: Riesgo relativo

RRR: Reducción del riesgo relativo

TGF: Factor de crecimiento transformante □

TFPI: Inhibidor de la vía del factor tisular

TPA. Activador tisular del plasminógeno

TP: Tiempo de protombina

TTP: Tiempo parcial de tromboplastina

TTPA: Tiempo parcial de tromboplastina activada

UI: Unidades Internacionales

V-CAM-1: Molécula de adhesión celular vascular

VCM: Volumen corpuscular medio

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

VSG: Velocidad de sedimentación globular

2. RESUMEN:

La diabetes mellitus se caracteriza por una lenta degeneración sistémica que ocasiona el estado de hiperglucemia sostenida sobre todos los tejidos y particularmente sobre el sistema vascular. La angiopatía que ocasiona puede explicar por sí misma buena parte de la fisiopatología de la miocardiopatía, retinopatía, nefropatía, neuropatía y las alteraciones tróficas periféricas; todas ellas complicaciones crónicas características de la diabetes que presentan una alteración manifiestamente vascular, considerando sus variados mecanismos.

La existencia de alteraciones vasculares, neurológicas y dermatológicas en extremidades inferiores favorecen la aparición de lesiones cutáneas en forma de úlceras, caracterizadas por su rápida progresión, difícil control y curso crónico. Desafortunadamente, a pesar de los cuidados practicados, no pocos diabéticos serán amputados.

Planteamos la hipótesis de utilidad de una heparina de bajo peso molecular (HBPM) en el tratamiento de estas úlceras fundamentándola en su efecto anticoagulante y fibrinolítico; pues el efecto de heparina y heparinoides en la vasculopatía periférica diabética ya había sido observado por diversos autores con resultados controvertidos.

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto del tratamiento con una HBPM en la mejoría de las úlceras tórpidas de extremidades inferiores en pacientes diabéticos.

Se diseñó un ensayo clínico en fase III-IV, controlado con placebo, aleatorizado en dos brazos paralelos, y triple ciego.

El trabajo de campo del ensayo clínico se llevó a cabo entre junio de 2001 y abril de 2004; fueron incluidos 77 pacientes y randomizados en dos brazos de tratamiento: Bemiparina 3.500 UI/día durante 10 días y Bemiparina 2.500 UI/día hasta 90 días de tratamiento o placebo. La variable principal de eficacia (mejoría) fue definida como disminución del área de la úlcera de al menos el 50% y/o una reducción de un grado de la profundidad en la clasificación de Wagner (Wagner, 1991). Las evaluaciones de las variables del estudio se llevaron a cabo manteniendo el carácter doble ciego del ensayo. El análisis principal de eficacia se realizó por intención de tratar.

El resultado final referente al objetivo principal se produce en el 70% de los pacientes en el brazo de tratamiento con bemiparina, frente al 45% en los pacientes del brazo placebo (p-valor=0,0354), La diferencia absoluta entre ambos brazos fue de 24,8% con intervalo de confianza (IC) al 95% (IC95%= 2,33-48,73%), con un riesgo relativo (RR) de 1,55 (IC95%= 1,01-2,37) y una reducción del riesgo relativo (RRR) de 54,59 (IC95%= 0,72-137,3), siendo 4 el número de sujetos necesarios a tratar (NNT) para observar una mejoría.

Conclusiones: la bemiparina fue más eficaz que el placebo e igualmente segura, en el tratamiento de las úlceras tórpidas de la extremidad inferior del paciente diabético, un problema de salud que sigue en la actualidad sin tratamiento sistémico específico disponible dirigido a influir en el aspecto vascular de esta patología.

RESUM

La diabetis mellitus es caracteritza per una lenta degeneració sistèmica que ocasiona l'estat d'hiperglucèmia sostinguda sobre tots els teixits i particularment sobre el sistema vascular. La angiopatia que ocasiona pot explicar per si mateixa bona part de la fisiopatologia de la miocardiopatia, retinopatia, nefropatia, neuropatia i les alteracions tròfiques perifèriques; totes elles complicacions cròniques característiques de la diabetis que presenten una alteració manifestament vascular, considerant els seus variats mecanismes.

L'existència d'alteracions vasculars, neurològiques i dermatològiques en extremitats inferiors afavoreixen l'aparició de lesions cutànies en forma d'úlceres, caracteritzades per la seva rápida progressió, difícil control i curs crònic. Desafortunadament, tot i les cures practicades, no pocs diabètics serán amputats.

Plantegem la hipòtesi d'utilitat d'una heparina de baix pes molecular (HBPM) en el tractament d'aquestes úlceres fonamentant-la en el seu efecte anticoagulant i fibrinolític; doncs l'efecte de la heparina i heparinoides en la vasculopatia periférica diabètica ja havia estat observat per diversos autors amb resultats controvertits.

L'objectiu de l'estudiva ser avaluar l'efecte del tractament amb una HBPM a la millora de les úlceres tòrpides d'extremitats inferiors en pacients diabètics.

Es va dissenyar un assaig clínic en fase III-IV, controlat amb placebo, aleatoritzat en dos braços paral·lels, i triple cec.

El treball de camp de l'assaigclínic es va dur a terme entre juny de 2001 i abril de 2004; van ser inclosos 77 pacients i randomitzats en dos braços de tractament: Bemiparina 3.500 UI / dia durant 10 dies i Bemiparina 2.500 UI / dia fins a 90 dies de tractament o placebo. La variable principal d'eficàcia (millora), va ser definida com a disminució de l'àrea de l'úlcera d'almenys el 50% i / o una reducció d'un grau de la profunditat en la classificació de Wagner (Wagner, 1991). Les avaluacions de les variables de l'estudi es van dur a terme mantenint el caràcter doble cec de l'assaig. L'anàlisi principal d'eficàcia es va realizar per intenció de tractar.

El resultat final referent a l'objectiu principal es produeix en el 70% dels pacients en el braç de tractament amb bemiparina, enfront del 45% en elspacients del braç placebo (p-valor = 0,0354), La diferència absoluta entre els dos braços va ser de 24,8% amb interval de confiança (IC) al 95% (IC 95% = 2,33-48,73%), amb un risc relatiu (RR) de 1,55 (IC95% = 1,01-2 , 37) i una reducció del risc relatiu (RRR) de 54,59 (IC 95% = 0,72-137,3), sent 4 el nombre de subjectes necessaris a tractar (NNT) per observar una millora.

Conclusions: la bemiparina va ser més eficaç que el placebo i igualment segura, en el tractament de les úlceres tòrpides de l'extremitat inferior del pacient diabètic, un problema de salut que segueix en l'actualitat sense tractament sistèmic específic disponible dirigit a influir en l'aspecte vascular d'aquesta patologia.

SUMMARY

Diabetes mellitus is a chronic disease, characterized by systemic degeneration that promotes a state of sustained hyperglycemia all over the body and particularly on the vascular system. The microangiopathy caused by the diabetes is self-explanatory for a good part of the diabetes characteristic chronic complications' pathophysiology: myocardiopathy, retinopathy, nephropathy, neuropathy and peripheral trophic alterations.

One of peripheric complication of the diabetes is the so-called "diabetic foot", a manifestly vascular alteration considering its various mechanisms. It is defined as the

existence of vascular and neurological alterations in the lower extremities and its presence favors the appearance of ulcers, a cutaneous lesion characterized by its rapid progression, difficult control and chronic course. Unfortunately, despite the care taken, quite of them will end up being amputated.

We hypothesized the usefulness of bemiparin, a low molecular weight heparin (LMWH) in the treatment of the ulcers on diabetic foot, due to its anticoagulant and fibrinolytic effects of bemiparin. The effect of heparin and heparinoids in diabetic peripheral vasculopathy has already been observed by several authors with controversial results.

Aims: To assess the efficacy and safety of bemiparin for the treatment of torpid ulcers in lower extremities in diabetic patients.

Methods: Phase III-IV, two arms parallel, placebo controlled, triple blind, randomized, clinical trial. 77 Patients older than 18 years, diagnosed of diabetes for at least 3 years, presenting a foot ulcer for more than 3 months were included from 39 Primary Care Spanish Sites. After randomization one arm treatment received Bemiparin 3,500 IU/d for 10 days, followed by 2,500 IU/d for up to 3 months plus standard care for ulcers and the other placebo plus standard care for ulcers for 3 months. The primary efficacy endpoint was ulcer improvement, defined as an objective decrease in ulcer area of at least 50%, measured by digital photography and ImageJ software, and/or any decrease in Wagner's ulcer grade at 3 months.

Results: Ulcer improvement rates were 70.3% (26 of 37 patients) in the bemiparin group and 45.5% (15 of 33 patients) in the placebo group (p value=0.0354). Absolute difference: 24.8% (CI95%=2.3-47.3%; p-value=0.035). Risk Ratio (RR): 1.55 (CI95%= 1.01-2.37). Risk Ratio Reduction (RRR): 54.59 (CI95%= 0.72-137.3). The number needed to treat (NNT): 4 (CI95%= 2-43 patients).

Conclusions: Bemiparin seems more effective than placebo and equally safe in the management of torpid foot ulcers in diabetic patients, a condition with no specific systemic treatment currently available.

3. INTRODUCCIÓN: Estado de la cuestión

La diabetes mellitus (DM) es un grave problema de salud, las complicaciones crónicas que la acompañan en su evolución causan el 80% de la morbilidad y mortalidad prematura en estos pacientes (Whiting et al., 2011). La enfermedad cardiovascular, la ceguera, la amputación de extremidades inferiores y la insuficiencia renal ocasionan una reducción sustancial de calidad y esperanza de vida, y son las mayores preocupaciones del diabético informado que ha de saber que pueden ser evitadas o al menos retrasadas practicando un estilo de vida saludable, y consiguiendo un control glucémico, tensional y de lípidos adecuado (DCCT Trial Research Group, 1993; Stratton et al., 2000), pues el tratamiento intensivo y multifactorial de los factores de riesgo cardiovascular asociados a la diabetes ofrece una mediana de 7,9 años de ganancia de vida que se corresponde con la disminución de la incidencia de enfermedad cardiovascular (Gaede et al., 2016).

Entre las personas con diagnóstico de DM la prevalencia de las úlceras de evolución tórpida del pie está entre el 4% y el 10% y la incidencia a lo largo de la vida puede alcanzar hasta el 25% (Singh et al., 2005; Whiting et al., 2011; Yazdanpanah et al., 2015).

En nuestro medio, excepto cuando se complican gravemente, siguen tratamiento ambulatorio al cuidado del médico y enfermera del equipo de atención primaria. Agotados los esfuerzos terapéuticos para impedir su evolución, hay que considerar las opciones quirúrgicas, de hecho, más del 5% de ellos acabará perdiendo parte de la extremidad (Brem& Tomic-Canic, 2007), lo que representa alrededor del 85% de las amputaciones de causa no traumática que se practican de extremidades inferiores (Leone et al., 2012).

A principios de siglo en nuestro país en los pacientes ingresados sin amputación el coste medio fue ligeramente superior a los 1.000 €, en los que sufrieron una amputación menor se aproximó a los 3.000 €, y en los que precisaron amputación mayor, a los 4.000 € (Alcalá Martinez y cols., 2003). Los costes totales directos para la curación de las úlceras que no requirieron amputación en EEUU fueron de 17.500 $, mientras que los costes de las amputaciones 33.500 $ (Prompers et al., 2008). Una

estimación del coste mundial de las hospitalizaciones por esta complicación lo calcula en 1,5 mil millones de dólares anuales (Hicks et al., 2014).

En España los resultados del proceso de atención al paciente diabético referentes al principal indicador control de calidad (cifras de hemoglobina glicosilada) suelen ser buenos, pero la tasa de amputaciones de extremidad inferior casi duplica la media de los países desarrollados (Gérvas, 2011).

El pronóstico es desolador y los costes sanitarios considerables y de momento ningún tratamiento no quirúrgico, dirigido o no a mejorar la perfusión vascular, ha logrado demostrar mejorar claramente su evolución (Schaper et al., 2017).

3.1 La diabetes mellitus

La DM es la más común y extendida de las enfermedades metabólicas pues en mayor o menor medida afecta a toda la humanidad cualesquiera que sean sus orígenes raciales, ubicación geográfica o nivel de desarrollo.

Sus efectos devastadores en el organismo fueron ya reconocidos por las primeras culturas y citados en antiguos textos médicos, de los que algunos han llegado hasta nuestros días. Se la describe como un estado poliúrico en el Papiro de Ebers (s.XIV a.C.), sed y adelgazamiento de fatal desenlace por Aretaeus (s.II), de orina dulce como la miel por Susruta (s.V) y Thomas Willis (s.XVII) que resulta ser a causa de un azúcar demostrado por Dobson (1776) (Barnett &Krall 2005. Zajac, et al., 2010).

A finales del siglo XIX Von Mehring y Minkowski observaron que los perros pancreatectomizados sufrían síntomas similares a los enfermos diabéticos y Sobolew, una década más tarde, que la ligadura de los conductos excretores pancreáticos origina atrofia del tejido glandular pero no diabetes si se conservan los islotes celulares descritos por Langerhans en 1869 (Barnett &Krall, 2005).

Fruto de tales evidencias y tras varios intentos de tratamiento en animales diabéticos con precipitados pancreáticos de resultados hipoglucemiantes pero tóxicos (Murlin, Paulescu, Kleiner), la primera supervivencia lograda fue en la perrita Marjorie seguida en breve tiempo del éxito del tratamiento en el joven Leonard Thompson con derivados de purificados insulares precipitados con alcohol en frío preparados por Banting y Best en 1922 (Banting et al., 1922), propició el aislamiento y la obtención de insulina cristalina

comercialmente viable sólo seis meses después en los laboratorios Lilly, gracias al mantenimiento del punto isoeléctrico de la insulina durante el proceso de extracción del páncreas animal propuesto por Walden (Zajac et al., 2010).

La cesión ética de patentes permitió la generalización de su uso a partir de 1923, hizo posible el control de las complicaciones agudas y modificó el pronóstico de la enfermedad; dejando en evidencia el lento efecto deletéreo que las altas, y no tan altas, concentraciones de glucosa tiene sobre la práctica totalidad del cuerpo humano, de hecho, la esperanza de vida de los diabéticos es sustancialmente más corta que los no diabéticos; la solapada ocurrencia de las complicaciones crónicas propias de la enfermedad ocasiona sufrimiento humano importante, disminución de la esperanza de vida y costes sanitarios enormes.

El Programa de Acción de la Organización Mundial de la Salud expresado en la Declaración de San Vincenzo (WHO&IDF, 1989), su documento resolutivo reconoce que la diabetes es un problema de salud de primera magnitud y compromete a sus miembros a articular los recursos necesarios para reducir la aparición de las complicaciones crónicas y mitigar sus consecuencias, mediante programas de prevención, información, control y fomento de la investigación.

La finalidad de la asistencia sanitaria es obtener los mejores resultados en la prevención, procurar la optimización de los recursos y promover el ensayo de nuevas estrategias y tratamientos, tanto en el medio hospitalario como en atención primaria, donde los resultados tendrían más validez externa y los esfuerzos más eficiencia en la intención de evitar, o al menos retrasar, las consecuencias de estas complicaciones.

3.1.1 Epidemiología de la Diabetes

No existe grupo étnico ni zona geográfica libre de la enfermedad, aunque si diferencias notables entre ellos, pues la prevalencia de DM entre los indios Pima (Arizona) es de 45% mientras que entre los esquimales es 0,025% (Whiting et al., 2011).

Se estima que a principios de siglo había 170 millones de diabéticos en el planeta y una prevalencia de 4,2%; la diabetes dependiente de la insulina (DM1) representaría el 10%, la diabetes no insulinodependiente (DM2) el resto (Wild et al., 2004). En 2010 la

estimación se elevó a 285 millones de diabéticos y la prevalencia a 6,4% (Shaw et al., 2010).

Desde 1980, la prevalencia de la diabetes estandarizada por edad en adulto ha aumentado, o en el mejor de los casos se mantuvo sin cambios, en todos los países. El crecimiento de la población y el envejecimiento han llevado a casi cuadruplicar el número de adultos con diabetes en todo el mundo. La carga de la diabetes, tanto en términos de prevalencia como de número de los adultos afectados han aumentado más rápidamente en los países de ingresos bajos y medianos que en los países de ingresos altos (NCD-RisC, 2016).

En la actualidad (2018), según la última edición del Atlas de la Federación Internacional de Diabetes, se estima que viven 415 millones de adultos diabéticos en el planeta, el 80% en países en desarrollo; para el año 2030 la estimación aumenta a aproximadamente 642 millones. La diabetes tipo 2 constituye alrededor del 85-90% de toda la diabetes en los países desarrollados y representa un porcentaje aún mayor en los países en desarrollo (http: //www.eatlas.idf.org).

En nuestro país a finales del siglo pasado se estimaba que el 3-6% de la población mayor de 30 años era diabética, aproximadamente dos millones de personas, de ellas cerca de la mitad no diagnosticadas, en su mayoría DM2 (Berengué et al, 2000). La prevalencia general de diabetes mellitus ajustada por edad y sexo en España en 2012 se estimó en casi el 14%, de los cuales el 7,8% era DM2 conocida y casi la mitad (6,0%) desconocía que tenía diabetes (Soriguer et al., 2012). Este corte transversal de una muestra representativa de la población española indicó que en casi el 30% tenía alguna alteración de carbohidratos; la prevalencia ajustada por edad y sexo de glucosa basal alterada en ayunas, tolerancia alterada aislada a la glucosa y combinadas, fueron 3,4%, 9,2% y 2,2% respectivamente. Estas prevalencias eran significativamente mayores con la edad (Soriguer et al., 2012).

La DM se sitúa entre la cuarta y sexta causa de muerte en los países desarrollados (American Diabetes Association, 2016).

Las distintas complicaciones crónicas propias de la DM muestran tendencia a solaparse en un mismo individuo y sugieren una base fisiopatológica común.

La retinopatía diabética se considera responsable del 25% de la ceguera en el mundo occidental y es la causa más frecuente de casos nuevos de ceguera entre 20 y 74 años. Su prevalencia se estima en torno al 35% de los diabéticos, aunque varía según el área geográfica, las características poblacionales y la metodología de los estudios (Chen et al., 2010; Ding&Wont, 2012). Durante la realización del UKPDS (2001), de los 1.919 pacientes estudiados el 37% mostraban algún grado de retinopatía; después de un seguimiento de 6 años, un 20% de los que no presentaron inicialmente ningún signo de retinopatía, la desarrollaron (Stratton & Kohner, 2001).

Diez años después del diagnóstico de diabetes, la prevalencia de microalbuminuria fue del 24,9%, la macroalbuminuria fue del 5,3% y la elevación de la creatinina plasmática del 0,8%. Los pacientes con creatinina plasmática elevada tuvieron una tasa de mortalidad anual cercana al 20% (Adler et al., 2003).

La prevalencia de la polineuropatía distal simétrica en pacientes diabéticos se estima por encima del 30% (Candrilli et al., 2007). No muestra tendencia a normalizarse, sino que experimenta un ritmo progresivo e irreversible, si bien se observa que muestra cierto grado de estabilización paralelo al correcto control de la glucemia (Duby et al., 2005), sin embargo, un control intensivo de la glucemia reduce el riesgo relativo en un 78% en DM1, pero sólo un modesto 9% en DM2 (Martin et al., 2014).

A partir de los diez años de evolución de la DM1, el 50% de los enfermos tienen manifestaciones clínicas de macroangiopatía en los sectores aorto-ilíaco y fémoro-poplíteo-tibial, alcanzando su afectación, en mayor o menor medida, a la totalidad de la población diabética a partir de una evolución superior a los 25 años (Barr et al., 2007; Blanes, 2011).

La dermopatía diabética tiene un prevalencia de un 40% en los diabéticos mayores de 50 años y con una mayor duración de la diabetes, suele presentarse antes de que la retinopatía y la nefropatía muestren expresión clínica (Mirhoseini et al., 2016).

3.1.2 El daño vascular en la diabetes mellitus:

El concepto general de diabetes como enfermedad comprende una variedad de síndromes que difieren tanto en sus manifestaciones clínicas como en sus patrones hereditarios, pero que se caracterizan por una alteración metabólica de los hidratos de carbono de variada etiología y por el desarrollo de complicaciones a largo plazo que afectan críticamente al sistema cardiovascular, ojos, riñones y nervios periféricos. Aunque ningún tejido del organismo elude el efecto deletéreo de la diabetes.

Ensayos como el DCCT (DCCT Trial Research Group 1993) y UKPDS (Stratton et al., 2000) pusieron de manifiesto de manera inequívoca la relación entre hiperglucemia y el desarrollo de las complicaciones micro y macrovasculares. La particular degeneración que promueve el estado de hiperglucemia sostenida sobre el sistema vascular y la angiopatía que ocasiona puede explicar en gran parte la nefropatía (Duby, 2004;Hernández-Arteaga et al., 2018), la macroangiopatía (Creager et al., 2003; Tabit et al., 2010), la neuropatía (Stehower, 2004; Nakagawa et al., 2011; Taslipinar et al., 2011) y la retinopatía (Van Hecke et al., 2005; Spijkerman et al., 2007; Klein et al., 2007); si bien parece que precedan al daño vascular, factores neurodegenerativos que pudieran ser ocasionados primariamente por el sufrimiento de la glía como soporte metabólico y regulador del tejido nervioso (Simó & Hernández, 2014).

No existen lesiones orgánicas patognomónicas de la diabetes, pero desde hace décadas se considera un tipo de alteración común en el sistema microvascular que pueden permitir al anatomopatólogo asegurar que aquellos tejidos (cualesquiera) pertenecen a un diabético, y que consiste en un engrosamiento de la membrana basal subendotelial (Williamson & Kilo, 1976).

La membrana basal es una estructura extracelular que separa las células parenquimatosas del espacio intersticial, es por tanto ubicua y desempeña un papel fundamental como soporte estructural y barrera semipermeable e interviene en los procesos de anclaje, migración y diferenciación celular (Schittny & Yurchenco, 1989). Está constituida por 3 capas distintas: las láminas rara, densa y reticular. Las láminas rara y densa constituyen la lámina basal, son producto de la célula endotelial y están compuestas fundamentalmente por colágeno tipo IV, laminina, nidógeno,

proteoglicanos y fibronectina. La lámina reticular deriva del tejido conectivo subyacente y se compone principalmente de colágeno tipo VII, además de otros colágenos intersticiales (Yurchenco & Schittny, 1990; Paulsson, 1992).

A la membrana basal se anclan las células endoteliales y los pericitos; su participación es fundamental en la homeostasis plasmática, pues de su integridad depende el tono vasomotor, y el control de citoquinas y zimógenos iniciadores e inhibidores de la coagulación.

Los pericitos, de origen mesodérmico, se disponen a lo largo de la lámina reticular de la membrana basal sin entrar en contacto con el torrente circulatorio; poseen capacidad contráctil y desempeñan un papel regulador del crecimiento, de la diferenciación y migración de la célula endotelial; también alteran su función en respuesta a la inflamación (Sims, 1991).

Las células endoteliales constituyen el revestimiento del sistema vascular, en contacto con su luz tapizan la membrana basal dispuestas de forma poligonal con el eje mayor dirigido al flujo (Nawroth & Stern, 1985). Es una superficie dinámica, de función antitrombótica entre el torrente circulatorio y el tejido extravascular; soporta un notable estrés mecánico, responde a una amplia variedad de estímulos y desempeña un papel crucial en el mantenimiento del balance hemostático a través de la regulación de la expresión de factores procoagulantes y anticoagulantes (Pober & Cotran, 1990), fibrinolíticos y antifibrinolíticos (Yoshimasa et al., 2002), agregantes y antiagregantes (Ware & Heistad, 1993).

El *glicocalix* es un gel complejo formado por glicoproteínas (fundamentalmente proteoglicanos) producidos por el aparato de Golgi de la célula endotelial; forma una malla luminal adosada al endotelio que interrelaciona la célula endotelial con el torrente circulatorio, actúa como tamiz macromolecular y en condiciones fisiológicas ocupa una posición crítica entre el torrente vascular y las células endoteliales; las protege del estrés de cizallamiento ocasionado por el flujo sanguíneo y traduce las tensiones mecánicas ocasionadas a la células endoteliales mediante su estructura molecular en forma de arbusto (Kabedev & Lobaskin, 2018). Tiene capacidad de unirse a las enzimas que eliminan los radicales de oxígeno, ayuda a reducir el estrés oxidativo y a mantener la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO), y así proteger la función endotelial (Alphonsus & Rodseth, 2014). Proporciona un marco para unir proteínas plasmáticas a glicosaminoglicanos solubles: la actividad anticoagulante de la antitrombina III se amplifica con la unión al heparansulfato, el cofactor II de la heparina se activa

mediante el dermatansulfato, la trombomodulina producida por las células endoteliales se une al condroitinsulfato que interactúa con la trombina para activar la ruta anticoagulante de la proteína C (Bourin & Lindahl, 1993); el inhibidor de la vía del factor tisular se une a sulfatos de heparina presentes en el *glicocalix* para inhibir los factores VIIa y Xa (Akbari et al., 2010). Todos ellos glicosaminoglicanos ubicados en el *glicocalix*. También modula la adhesión de leucocitos activados a la célula endotelial (Constantinescu & Spaan, 2003).

El sufrimiento del sistema vascular en la diabetes se evidencia por las alteraciones que se producen en la íntima vascular.

El engrosamiento de la membrana basal de los pequeños vasos es el hallazgo histológico más característico de la angiopatía diabética y desde hace décadas está descrito que es posible observarlo en fases muy tempranas del trastorno metabólico (Williamson et al., 1988). La membrana basal aumenta su espesor por la superposición de capas hialinas debido a un incremento de las concentraciones de componentes en la lámina basal, sobretodo de colágeno tipo IV, además de laminina y fibronectina (Baum & Bigler, 2016). La clara acumulación de proteínas de la membrana basal arterial revela una similitud entre la macroangiopatía y microangiopatía y sugiere una explicación molecular de las alteraciones en el remodelado vascular, propiedades biomecánicas y formación de aneurismas descritos en la diabetes mellitus (Preil et al., 2015)

La magnitud del engrosamiento de la membrana basal capilar parece variar de un tejido a otro pues es más evidente en retina, riñón y músculo esquelético (Baum & Bigler, 2016). En un mismo tejido también se observan variaciones; en el músculo esquelético el engrosamiento de la membrana basal es más pronunciado en las extremidades inferiores (Tilton et al., 1981; Baum & Bigler, 2016). El engrosamiento parece ser más temprano en la vertiente arterial aferente del sistema capilar del riñón (Østerby, 1992), de la retina (Stitt et al., 1994; Roy et al., 1994), musculo esquelético (Tilton et al., 1981; Baum & Bigler, 2016) y nervios periféricos (Britland et al., 1990; Dyck & Giannini, 1996; Baum & Bigler, 2016).

El aumento de la biosíntesis de colágeno de tipo IV, los ciclos repetitivos de apoptosis y remplazo de pericitos y células endoteliales parecen ser los factores más críticos para la acumulación de membrana basal capilar que resulta engrosada, menos elástica y menos adherente para las células circulantes, pierde la capacidad reguladora de la función celular, supone una mayor barrera para la difusión, disminuye

la elasticidad microvascular e impide la transcitosis de células inflamatorias (Haiglotou & Tsilibary 1992; Preil et al., 2015; Baum & Bigler 2016).

La interrupción del *glicocalix* expone las moléculas de adhesión de las células endoteliales al torrente circulatorio, lo que propicia mayor adhesión de leucocitos y plaquetas (Becker et al., 2010). La hiperglucemia aguda favorece la degradación del *glicocalix* y coincide con la activación de la coagulación (Nieuwdorp et al., 2007).

La pérdida de células endoteliales y pericitos en la microangiopatía diabética se manifiesta por la presencia de áreas acelulares (Lorenzi & Cagliero, 1991). En estas zonas es más difícil la adherencia de las células progenitoras endoteliales migrantes debido a cambios en la composición de la membrana basal, hecho que podría explicar el fracaso del restablecimiento funcional que presentan los capilares en la diabetes (Loomans et al., 2004; Caballero et al., 2007; Baum & Bigler 2016).

3.1.3 La disfunción endotelial:

El endotelio regula el tono vascular y su permeabilidad, el equilibrio entre coagulación y fibrinólisis, la composición de la matriz subendotelial y del *glicocalix*, la adhesión y extravasación de leucocitos y la actividad inflamatoria en la pared del vaso. También modula las funciones de otros tipos de células, como células musculares lisas vasculares, plaquetas, leucocitos, macrófagos, pericitos, y células mesangiales renales (Pober & Cotran, 1990). Inhibe la agregación y adhesión plaquetaria mediante la producción de prostaciclina y óxido nítrico (NO), limita la activación de la cascada de la coagulación por la trombomodulina/proteína C y heparansulfato/ antitrombina (Schalkwijk & Stehouwer, 2005;), propicia la vía de inactivación del factor tisular y regula la fibrinólisis mediante la producción de T-PA y su inhibidor PAI-1 (Tabit et al., 2010).

En términos generales, la “disfunción endotelial” se refiere a un deterioro de la capacidad del endotelio para mantener adecuadamente la homeostasis vascular (Widlansky et al., 2003).

El endotelio vascular, cuya integridad es fundamental para regular el equilibrio de los factores procoagulantes y evitar la trombosis, es anormal en la diabetes. Indudablemente el menoscabo de las funciones del endotelio desempeña un papel

importante en las alteraciones de la activación de las plaquetas y los factores de coagulación observados en la diabetes. Los factores de riesgo cardiovascular, como la DM, están asociados con un cambio en el equilibrio de la homeostasis hacia un estado antifibrinolítico y protrombótico (Tabit et al., 2010). Una cantidad considerable de pruebas en humanos indica que la disfunción endotelial está estrechamente asociada con el desarrollo de la retinopatía diabética (Van Hecke et al., 2005; Spijkerman et al., 2007; Klein et al., 2009), nefropatía (Stehouwer, 2004; Taslıpınar et al., 2011; Nakagawa et al., 2011) y la aterosclerosis (Creager et al., 2003; Tabit et al., 2010) tanto en la diabetes tipo 1 como en la tipo 2.

Las anomalías que se observan en estos pacientes incluyen todos los procesos de la coagulación, afectando tanto a las proteínas de la cascada de la coagulación, la formación del trombo y su fibrinólisis, y a las funciones plaquetarias y endoteliales, mostrando una clara tendencia a la trombogénesis. (Egeberg, 1963; Fuller et al., 1979;Frade et al., 1987;Cohen et al 1989;Ceriello, 1993;Rosemberg&Aird, 1999; Pham et al., 1998;Cosson et t al., 2000;Osende et al., 2001;Carr, 2001; Vinik et al., 2001; Lapolla et al., 2003; Bolaman et al., 2007;Devaraj et al., 2007; Grant, 2007; Madan et al., 2010).

La disfunción endotelial puede preceder a la aparición de la diabetes. En este sentido, los sujetos no diabéticos sanos que tienen un pariente de primer grado con DM2 muestran una alteración de la vasodilatación dependiente del endotelio y un aumento de los marcadores plasmáticos de activación de células endoteliales (Tesauro et al., 2007).

Como ya afirmaba Masmiquel en 1996, los factores que desencadenan las alteraciones del endotelio en la diabetes no están aún bien establecidos, pero puede suponerse que la exposición del sistema vascular a concentraciones elevadas de glucosa es la principal responsable. Sin embargo, los determinantes genéticos, la alteración en las concentraciones de insulina y otras hormonas, la sucesión de cambios hemostáticos y la concurrencia de otros factores de riesgo vascular, indudablemente ejercen un papel fundamental en la progresión de la enfermedad. (Masmiquel et al., 1996).

La concentración elevada de glucosa puede alterar la composición y las propiedades del endotelio bien directamente mediante substratos derivados de la saturación de sus vías metabólicas, a la acción de productos derivados de la glicación proteica y la oxidación de componentes celulares.

Por el momento se barajan diferentes hipótesis fisiopatológicas.

El efecto directo:

La concentración elevada de glucosa ejerce su efecto a través de cambios en el metabolismo celular, pues en cultivos celulares en medio hiperglucémico estabilizado con manitol se observan las mismas alteraciones celulares que en cultivos no estabilizados (Porta et al., 1988). Desde hace tiempo se sabe que la exposición a concentraciones elevadas de glucosa produce un incremento de las concentraciones de componentes de la MB (colágeno tipo IV, laminina y fibronectina) en cultivos de células mesangiales (Kreisberg & Ayo 1993), tejido conectivo neural (Muona et al., 1991), y de células endoteliales animales y humanas (Cagliero & Maiello, 1988). Este incremento parece secundario al aumento en las concentraciones de ARNm para estos componentes (Pugliese et al., 1994).

Otro efecto de las concentraciones elevadas de glucosa es la disminución de la síntesis del proteoglicano heparansulfato (Van Det et al., 1996; Jensen, 1997), glicosaminoglicano químicamente similar al sulfato de heparina, ubicuo y abundante, presente en el *glicocalix* de la superficie de las células endoteliales y en la matriz extracelular (Rosemberg & Aird, 1999). Su disminución supone una menor densidad de cargas negativas endoteliales que las generadas en condiciones normales hecho que ha sido relacionado con la aparición de proteinuria (Raats et al., 2000; Taslıpınar et al 2011).

La glicación no enzimática.

Los componentes proteicos endoteliales y plasmáticos sometidos a hiperglucemia sufren la acción de la glicación no enzimática, una reacción de condensación irreversible entre un hidrato de carbono y grupos amino libres del extremo N-terminal de las proteínas (base de Schiff). Como resume Masmiquel (1996), la cetoamina estable formada por la unión de la glucosa con un grupo amino proteico, experimenta una serie de reacciones químicas degenerativas complejas e irreversibles (deshidratación, hidrólisis, reordenación y polimerización), dando lugar a unos compuestos conocidos como de Amadori que en las moléculas con una vida media larga llegan convertirse en melanoidinas, denominados productos finales de la glicación avanzada. Estas reacciones, conocidas desde principios de siglo, reciben el nombre de reacciones de Maillard o de oscurecimiento (browning), por el color que toman (Masmiquel y cols., 1996). La administración experimental de estos productos incrementa las concentraciones de ARNm para diferentes proteínas de matriz intersticial (Yang et al., 1995). El efecto de la glicación en las proteínas plasmáticas alcanza

inmunoglobulinas, proteínas transportadoras, reguladoras y estructurales (Goldin et al., 2006). La glicación del factor de Von Willebrand puede ser responsable, al menos en parte, de las alteraciones en la agregación plaquetaria descritas en diabéticos mal controlados (Natarajan et al., 2008). La interacción entre las proteínas glicadas con los receptores de las células endoteliales de los pacientes diabéticos provoca un aumento de la actividad del factor de necrosis tumoral (TNF) (Schram et al., 2005). Su acción sobre las proteínas de la membrana basal ya fue descrita en 1996 (Van Det et al., 1996); se considera que afecta fundamentalmente al colágeno tipo IV, fibronectina y la laminina, induciendo su incremento y, paralelamente, la disminución de la concentración de glicosaminoglicanos (Xie et al., 2017).

Síntesis de polioles:

Este mecanismo implica a la formación intracelular exagerada de sorbitol y fructosa a partir de glucosa. En condiciones normales esta vía supone un 3% del metabolismo de la glucosa, pero en la DM su actividad se duplica. Esta reacción, catalizada por la enzima aldosa reductasa mediante proceso red-ox, es capaz de lesionar a las células al competir con la captación de mioinositol y modificar el estado metabólico de la célula gracias al aumento del cociente NADH/NAD intracelular. Paralelamente el déficit relativo de NAD genera una situación de pseudoisquemia intracelular, con aumento de lactato y formación de diacilglicerol, (Feener& King., 1997; Singh et al., 2016). La acumulación de sorbitol y fructosa y la depleción de mioinositol provocan una disminución secundaria del fosfolípido de membrana inositolfosfato, con importantes funciones celulares en la activación de la Na-K-ATPasa (Greene et al., 1987; Singh et al., 2016). El sorbitol es un alcohol hidrófilo que no difunde fácilmente a través de las membranas celulares, se acumula en las células dando como resultado un estrés osmótico (Brownlee, 2001) que eventualmente contribuye al desarrollo de complicaciones diabéticas.

Estrés hemodinámico:

El incremento del flujo sanguíneo y de la presión hidrostática microvascular que ocurre poco tiempo después del inicio de la diabetes, fundamentalmente en los tejidos que posteriormente presentarán una microangiopatía clínicamente importante, ha hecho pensar que estos cambios hemodinámicos intervienen en la patogenia de las lesiones microvasculares (Tooke, 1995). El grosor de la membrana basal de los capilares del músculo esquelético parece correlacionarse con la presión intravascular (Tilton et al., 1985). La presión intraluminal provoca estrés celular constante y obliga a la célula endotelial a

mantener una alta tasa metabólica, con un notable desarrollo del aparato de Golgi y del retículo endoplásmico rugoso (La Selva et al., 1993). La agresión que supone el incremento tensional sobre la célula endotelial ha de ser un factor añadido en la disfunción endotelial implicada en la patología vascular de la de la diabetes.

El óxido nítrico (NO) se sintetiza en las células endoteliales durante la conversión de L -arginina a L -citrulina por la sintetasa endotelial de óxido nítrico (Vallance & Chan, 2001). El estímulo clave para la producción endotelial de NO es el incremento de la tensión de cizallamiento producida por la sangre circulante sobre la superficie endotelial (Silver & Vita, 2006). El NO sintetizado difunde a las células del músculo liso vascular donde activa la guanilato ciclasa soluble que ocasiona un aumento de los niveles de guanosina 3,5-monofosfato-cíclico induciendo su relajación (Joannides et al., 1995). En condiciones fisiológicas, el NO impide la adhesión de leucocitos y mantiene el endotelio en un estado antinflamatorio (Widlansky et al., 2003).

Estado proinflamatorio:

Sometido a los factores de riesgo cardiovascular, el endotelio puede activarse para expresar moléculas de adhesión celular vascular -1 (VCAM-1) y de adhesión intercelular (ICAM-1), que son necesarias para la adhesión de leucocitos a la superficie endotelial (Lawson & Wolf, 2009). En el estudio EURODIAB los pacientes diabéticos con evidencia de complicaciones microvasculares también expresan factores quimiotácticos de plaquetas y monocitos, y otras citoquinas proinflamatorias, como factor estimulante de colonias de macrófagos, y factor de necrosis tumoral beta (TNF-β) (Schram et al., 2005). La expresión endotelial de estos factores contribuye al desarrollo de la inflamación en la pared arterial y promueve la aterogénesis. (Tabit et al., 2010). Los niveles plasmáticos altos de proteína C reactiva se asocian con un mayor riesgo de incidencia de eventos cardiovasculares entre los pacientes diabéticos, independientemente de otros factores de riesgo (Schulze et al., 2004).

Diversos autores atribuyen, de manera mantenida a lo largo de los años, a la disfunción endotelial un importante papel en la situación de hipercoagulabilidad, hipofibrinólisis e hiperactividad plaquetaria observada en la diabetes (Egeberg, 1963; Fuller et al., 1979; Frade et al., 1987; Cohen et al., 1989; Ceriello & Fener, 1993; King, 1998; Rosemberg et al., 1999; Pham et al., 1998; Cosson et t al., 2000; Osende et al.,, 2001; Carr, 2001; Vinik et al., 2001; Lapolla et al., 2003; Bolaman et al., 2007; Devaraj et al., 2007; Grant, 2007; Madan et al., 2010; Nowak et al, 2015). La mayoría de estos efectos van a ser consecuencia de la acción que, de una u otra manera, la

hiperglucemia ejerce desde el torrente circulatorio para inducir cambios estructurales, metabólicos, así como cambios en la expresión genética de la célula endotelial, promoviendo un estado procoagulante (activación endotelial), incremento de la permeabilidad (daño endotelial) y disminución de la vasodilatación dependiente del endotelio. La pérdida de células endoteliales y la exposición del subendotelio al torrente plasmático se acompañan de un aumento de la actividad del factor tisular, zimógeno de los factores IX y X de la coagulación que mantiene una situación procoagulante y conduce a fenómenos de oclusión capilar (Engerman, 1989; Benezra et al., 1993; Williams et al., 1998; Grant, 2007; Goldberg, 2009).

La inducción de hiperglucemia en sujetos diabéticos, y no diabéticos, reduce la actividad y la concentración de antitrombina III e incrementa los niveles de fibrinopéptido A; este fenómeno puede ser revertido restableciendo la euglucemia con insulina (Ceriello et al., 1990).

A estas hipótesis patogénicas cabe añadir el papel de las plaquetas que al adherirse al subendotelio degradado en la diabetes, activarse y provocar su desgranulación liberan citoquinas, factores de crecimiento, activador tisular del plasminógeno (tPA) e inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) (Grant, 2007; Nowak et al, 2015) completando la activación del proceso de la coagulación.

En definitiva, la pérdida de la función hemostásica por la degradación del *glicocalix*, la disfunción y pérdida de células endoteliales y la exposición de la membrana basal alterada al torrente plasmático, favorece la difusión del factor tisular y activación de la trombina, propiciando un medio procoagulativo y hipofibrinolítico, con constante consumo de factores reguladores, moléculas de adhesividad plaquetaria y expresión de citoquinas reorientando la función endotelial en el sentido protrombótico; perpetuando una sucesión de fenómenos que irremisiblemente deben conducir a la lesión vascular característica de la microangiopatía diabética, con el resultado de áreas de hipoperfusión e isquemia indistinguibles en su consecuencias de otras arteriopatías obliterantes, en una situación que recuerda la coagulación intravascular diseminada, que algunos pacientes diabéticos con microangiopatía grave pueden llegar a expresar en toda su magnitud (Aaoki et al., 1992; Akbari et al., 2010;Nogami et al., 2017).

3.1.4 Las complicaciones crónicas

La imposibilidad de predecir con exactitud qué diabético padecerá gravemente las complicaciones microangiopáticas según el control glucémico y tiempo de evolución de la DM, muestra la existencia de diferencias individuales que confieren diferente susceptibilidad de las proteínas de las células diana a la acción de la glucosa en altas, y no tan altas, concentraciones; y que podrían estar determinadas por factores genéticos (Villeneuve & Natarajan, 2010).

La hiperglucemia ha de ser un factor patológico directamente implicado en la aparición de las complicaciones microvasculares de la DM, pero a pesar de que la hiperglucemia puede ser controlada a través cambios en estilo de vida y fármacos, un buen número de pacientes continuarán presentando las complicaciones propias de la DM. Una explicación podría ser que la exposición previa a concentraciones altas de glucosa ocasionaría la persistencia de sus efectos perjudiciales más allá de alcanzar el control glucémico (Villeneuve & Natarajan, 2010; Reddy & Natarajan, 2011). A este fenómeno se le ha denominado 'memoria metabólica' y se ha demostrado en varios modelos experimentales de cultivos celulares que la han implicado en la expresión persistente y aberrante de genes proinflamatorios en células musculares lisas vasculares (Villeneuve & Natarajan, 2010) y las células endoteliales (El-Osta et al., 2008), a pesar de la normalización de la glucosa. Este fenómeno de memoria fue observado en el Diabetes Control and Complications Trial (DCCT, 1998) y su secuela en el Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) (Nathan, 2005). Los resultados del DCCT muestran que los pacientes con diabetes tipo 1 sometidos a un control glucémico intensivo tenían una incidencia y una gravedad mucho menor de complicaciones crónicas en relación al grupo de control glucémico más laxo. Finalizado el período de intervención del DCCT, ambos grupos fueron sometidos a terapia intensiva y seguidos durante 7 años. A pesar de la consecución de niveles similares de HbA 1c en ambos grupos durante el estudio EDIC, los pacientes del grupo de tratamiento intensivo en el DCCT, tenían significativamente menor riesgo de desarrollar complicaciones microvasculares y macrovasculares, en relación con el grupo DCCT sometido a tratamiento convencional (Nathan et al., 2014).

Otros ensayos con pacientes diabéticos tipo 2 también han encontrado que los beneficios del control intensivo de la glucemia duraron mucho tiempo después de finalizar la intervención, lo que sugiere un 'efecto legado' (Chalmers & Cooper, 2008).

La prevención de las complicaciones de la DM es un importante reto para los sistemas sanitarios, pues es una enfermedad compleja y crónica que requiere atención médica continua, con estrategias de reducción de riesgos multifactoriales, más allá del control de la glucemia. La educación para el autocuidado del paciente y el apoyo son fundamentales para la prevención de las complicaciones agudas y reducir el riesgo de complicaciones crónicas. Debe ser formulada como una alianza terapéutica y afecta fundamentalmente a un cambio de estilo de vida.

La American Diabetes Association (2018) recomienda la profilaxis con aspirina (75-162 mg/día) como estrategia de prevención primaria en las personas con diabetes tipo 1 o tipo 2 con riesgo cardiovascular añadido. Esto incluye la mayoría de los hombres con edad superior a 50 años de edad, o mujeres de 60, que tengan al menos un factor de riesgo importante adicional (antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular, hipertensión, tabaquismo, dislipemia o albuminuria). Puntualiza que no debe ser recomendada para la prevención de las enfermedades cardiovasculares en los adultos con diabetes y bajo riesgo cardiovascular, ya que el riesgo de sangrado supera los beneficios potenciales. Su beneficio neto en la prevención primaria es controvertido, tanto para los pacientes con y sin antecedentes de diabetes (Ogawa et al., 2008; Baigent, et al., 2009; Perk et al., 2012). Basándose en las pruebas disponibles en la actualidad, la aspirina parece tener un efecto modesto sobre eventos vasculares isquémicos y el exceso de riesgo hemorragia gastrointestinal puede ser tan alto como 1-5 por 1.000 por año (Perk et al., 2012). No parece que la aspirina tenga ninguna influencia en la evolución de la retinopatía (Davis et al., 1998), la nefropatía, la neuropatía y la enfermedad vascular periférica. (Antiplatelet Trialists Collaboration, 1994).

Habida cuenta de que el efecto deletéreo de la hiperglucemia es generalizado pues alcanza a todos los tejidos (Donnelly et al., 2000; Prandoni, 2007), los sistemas orgánicos afectados con más intensidad y trascendencia, los que constituyen la expresión clínica de la diabetes crónica, son precisamente aquellos que su función depende predominantemente del estado de la microcirculación y donde es más evidente el daño vascular, como la retina, el único lugar donde son visibles directamente los capilares, y los sistemas con más altas tasas de gasto cardíaco, como el riñón, donde se manifiesta de manera temprana la proteinuria que delata el precoz, lento, progresivo e inexorable deterioro de todo el organismo (Deckert et al., 1991); en el que, la intensidad del daño y las manifestaciones clínicas dependerán del tiempo, del grado de control

metabólico, de la presencia de otros factores de riesgo cardiovascular asociados y de aspectos genéticos (Masmiquel et al., 1996).

El 65% de las muertes por enfermedad cardiovascular están relacionadas con la DM, glucemia basal alterada o intolerancia a la glucosa (Bar et al., 2007). La cardiopatía isquémica se considera la causa principal de muerte prematura entre los pacientes diabéticos adultos (American Diabetes Association 2016); Los cambios microvasculares que sufre el miocardio en presencia de diabetes son similares a los que se producen en el glomérulo y la retina, tales como el aumento del espesor de la membrana basal, la reducción de la densidad capilar y el aumento de la permeabilidad vascular, con el consecuente aumento del volumen extracelular (Van Hecke et al., 2005;Gil-Ortega y Kaski, 2006;Nakagawa et al., 2011). En algunos casos, durante el infarto de miocardio los pacientes no se sienten dolor o es atípico, en ellos las fibras nerviosas muestran las lesiones características de la neuropatía diabética: engrosamientos, fragmentación y disminución del número de fibras (Schönauer et al., 2008). Este importante sistema neurovisceral autonómico también juega un papel importante en la fisiopatología y la progresión de la enfermedad cardíaca, incluyendo insuficiencia cardíaca y las arritmias (Fukuda et al., 2015). Sin embargo, resulta evidente que en la patogénesis del infarto no interviene directamente la neuropatía, sino que más bien empeora su pronóstico.

La macroangiopatía es la afectación atrerioesclerótica de los vasos de mediano y gran calibre, no es específica de la diabetes pero en ella tiene un inicio más temprano, una evolución más agresiva, y una extensión multisegmentaria, bilateral y más profunda (Barr et al., 2007; Blanes, 2011). La arteriopatía de miembros inferiores afecta a uno de cada cinco diabéticos, incrementa el riesgo de amputación, empeora su pronóstico y se asocia frecuentemente a cardiopatía isquémica. Las alteraciones estenóticas de los grandes troncos arteriales comparten protagonismo clínico con las alteraciones microvasculares específicas de la diabetes, pues ya hay defectos de perfusión microcapilar en extremidades inferiores en pacientes diabéticos sin clínica de vasculopatía (Cosson et al., 2000). En los pacientes diabéticos afectos de angiopatía periférica también está alterado el equilibrio fisiológico entre el activador tisular del plasminógeno (t-PA) y el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) en sentido hipofibrinolítico y, por consiguiente, actividad procoagulante (Lapolla et al., 2003).

La nefropatía diabética afecta a uno de cada seis diabéticos y es causa directa o indirecta de la muerte prematura de la mitad de ellos. El riesgo de muerte por

insuficiencia renal en la DM1 es unas 23 veces más elevado con respecto a una población no diabética ya que uno de cada tres enfermos con DM1 desarrollará algún grado de enfermedad renal crónica, siendo la causante directa de entre el 60% y 65% de la mortalidad en la DM1 a partir de una evolución por encima los 15 años (Adler et al., 2003). La glomeruloesclerosis se caracteriza por el aumento del grosor de la membrana basal glomerular, esclerosis mesangial difusa, hialinosis, microaneurismas y arteriosclerosis hialina (Østerby, 1992). Es clásico observar áreas de expansión mesangial extrema llamadas nódulos de Kimmelstiel-Wilson en el 40-50% de los pacientes que desarrollan proteinuria (Kimmelstiel & Wilson, 1936). Suficientes pruebas en humanos indica que la disfunción endotelial está estrechamente asociada con el desarrollo de la nefropatía (Stehouwer, 2004; Taslıpınar et al., 2011; Nakagawa et al., 2011). Desde finales del siglo pasado sabemos que la proteinuria es un potente predictor de la evolución del paciente diabético y no diabético hacia la nefropatía clínica y un aumento del riesgo cardiovascular (Deckert et al., 1989; Gerstein et al., 2001; Goff et al., 2014; Webb, et al., 2017) El desarrollo de las complicaciones crónicas (arteriopatía, miocardiopatía, retinopatía, neuropatía periférica y autonómica) además de compartir determinantes comunes como el control glucémico y lipídico y de la presión arterial, también se observan con mayor frecuencia en pacientes con nefropatía diabética y se asocian con una mayor morbilidad y mortalidad. (Parving et al., 1992; Gerstein et al., 2001).

La complicación más común de la diabetes es la neuropatía periférica, que tiene una prevalencia tan alta como 50% (Pop-Busui et al., 2009) y se caracteriza por alteraciones de células de Schwann, microglia y *vasa nervorum* que finalmente ocasionan el daño neuronal. Es una complicación grave, pero a menudo descuidada, de la diabetes mellitus. Se ha pensado que los cambios microvasculares provocan daño al nervio limitando el suministro de sangre al tejido nervioso, pues la fisiopatología de la neuropatía también puede ser explicada como consecuencia de la isquemia microvascular en los *vasa nervorum* (Dyck & Giannini, 1996; Korrhals et al., 1988; Schratzberger et al., 2001; Otero-Siliceo& Ruano-Calderon, 2003) y nuevas evidencias muestran que la hipoxia endoneural puede ser causada por la extracción de oxígeno ineficiente a causa de disfunción capilar (Østergaard et al., 2015).

A pesar del creciente conocimiento sobre la importancia de las células gliales para la función del tejido nervioso, la mayoría de las investigaciones sobre la neuropatía diabética se centran en las neuronas sensoriales periféricas. Se sabe menos acerca de las células gliales periféricas en el contexto diabético, pero se han obtenido

conocimientos importantes sobre la biología de la glia y microglia sometidas a hiperglucemia en modelos de lesión e inflamación nerviosas, y es posible que muchos aspectos de la vulnerabilidad de la glía se puedan extrapolar a la diabetes mellitus (Gonçalves et al., 2018).

La microglia latente es fundamental para la integridad estructural y el control de la suficiencia funcional de la neurona; su activación como macrófago, resultado de las consecuencias metabólicas de la diabetes, afecta negativamente a los axones (Zeng et al., 2008). Asimismo, los cambios microvasculares crean un ambiente hipóxico que tiene el potencial de activarlas y desencadenar las cascadas inflamatorias que conducen a la neurodegeneración (Grigsby et al., 2014).

La retinopatia diabética afecta a toda la unidad neurovascular de la retina, con una pérdida temprana de acoplamiento neurovascular, inflamación, degeneración y gliosis, antes de que las alteraciones vasculares sean observables (Stem & Gardner, 2013; Simó & Hernández, 2014), luego hay que considerar la fisiopatología de la retinopatía desde el concepto de que la diabetes causa disfunción generalizada de la compleja red integral de tipos de células que producen y mantienen la agudeza visual (Abcouwer & Gardner, 2014). Nuevas pruebas sugieren que la neurodegeneración participa en los primeros cambios microvasculares que ocurren en la descomposición de la barrera hematoretiniana, la regresión vascular y la alteración del acoplamiento neurovascular (Simó & Hernández, 2014). La apoptosis neuronal y la gliosis son las características histológicas más importantes de la retinopatía diabética, aunque en la actualidad se desconoce si la apoptosis neuronal precede a la gliosis o es su consecuencia. Luego, la eventual demostración de que la gliosis es anterior a la apoptosis neuronal argumentaría en contra de la hipótesis de que el daño neuronal es el primer evento en la retinopatía diabética, dado que la glía no es una neurona (Simó & Hernández, 2014).

Las alteraciones microvasculares características de la retinopatia diabética incluyen hemorragias intrarretinianas, microaneurismas, anomalías del calibre venoso, exudados vasculares lipídicos, áreas sin perfusión capilar con infartos neuronales representados como manchas de aspecto algodonoso, y crecimiento inadecuado de nuevos vasos sanguíneos (Wilkinson et al., 2003). Las lesiones vasculares retinianas son precedidas o acompañadas por un engrosamiento de la membrana basal vascular y una pérdida temprana de pericitos y células endoteliales, que conforma la patología degenerativa vascular característica de esta complicación (Hammes et al., 2002).

La microangiopatía facilita el trasudado vascular que causa edema macular por un lado y oclusión capilar por otro, la oclusión capilar vuelve a causar isquemia retiniana y niveles aumentados de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que son responsables del desarrollo de la neovascularización y la etapa proliferativa de la retinopatía diabética (Boulton et al., 1998). El éxito de los tratamientos biológicos dirigidos al VEGF sugiere que el tratamiento de los aspectos vasculares en las etapas posteriores de la enfermedad puede preservar la visión en muchos pacientes (Abcouwer & Gardner, 2014).

La retinopatía diabética es prevalente en pacientes con úlceras en extremidades inferiores y aproximadamente la mitad de estos pacientes tienen retinopatía proliferativa, aunque no se ha encontrado asociación significativa en términos de gravedad (Candrilli et al., 2007; Hwang et al., 2017).

La dermopatía es la presentación cutánea de la microangiopatía diabética (Binkley, 1965). El diagnóstico de dermopatía diabética es clínico: es patognomónica de diabetes la aparición de múltiples máculas y pápulas redondas u ovales hiperpigmentadas por hemosiderina y zonas atróficas de borde suave; aparecen por debajo de la rodilla en la zona pretibial, generalmente son bilaterales y de distribución asimétrica. Son asintomáticas.

Estas lesiones muestran una reducción en el flujo sanguíneo de la piel en comparación con no diabéticos y es posible que la cicatrización atrófica representada por las lesiones de dermopatía esté relacionada con la disminución de la perfusión de la piel debido a la diabetes. (Wigington et al., 2004).

Aunque el 21% de los pacientes con dermopatía diabética no tienen evidencia clínica de nefropatía, neuropatía o retinopatía, la incidencia de la dermopatía aumenta a medida que aparecen complicaciones microangiopáticas del 52% en pacientes con una complicación microangiopática, al 81% en pacientes con las 3 (Morgan & Schwartz, 2008).

3.1.5 El pie diabético

Dentro de las complicaciones generales de la diabetes, una de las que presentan una clínica manifiestamente vascular, considerando sus variados mecanismos, puede definirse como la existencia de alteraciones vasculares y neurológicas en extremidades inferiores, que configuran un estado morboso favorecedor de la aparición de lesiones cutáneas que se caracterizan por su rápida progresión, difícil control, curso tórpido y con inaceptable frecuencia, final dramático (Lipsky et al., 2004) denominada pie diabético.

La prevalencia de las úlceras de evolución tórpida del pie es de 4% a 10%, la incidencia anuales de 1,0% a 4,1%, y la incidencia de por vida puede ser tan alta como 25% (Singh et al., 2005); el 5% de ellos acabará perdiendo parte de la extremidad, lo que representa el 85% de las amputaciones que se practican de extremidades inferiores de causa no traumática (Brem y Tomic-Canic, 2007). En un análisis de 8,878 amputaciones de extremidad inferior la tasa de mortalidad a los 30 días después de la intervención fue de 7,1% (O'Brien et al., 2013). Más del 5% de los diabéticos que han padecido una amputación de extremidades inferiores va a morir entre los primeros 12 meses (Hoffstad et al., 2015). La mediana de tiempo de supervivencia de estos pacientes no supera los 60 meses (Elgzyri et al., 2015).

Los pacientes con esta complicación son de más avanzada edad, tienen un índice de masa corporal más bajo, mayor duración de la diabetes, más hipertensión, retinopatía diabética, y tabaquismo que los pacientes sin ella. (Zhang et al., 2017). No todos los pacientes diabéticos con ulceras de evolución tórpida en las extremidades inferiores tienen macrongiopatía clínica, elevación de las resistencias periféricas, ni trombosis capilares detectables, pero de haberlas confiere un pésimo pronóstico, pues la reconstrucción arterial no logra restaurar la perfusión tisular (LoGerfo& Gibbons, 1996) y pronostica la amputación de parte de la extremidad en al menos un tercio de los pacientes al cabo de tres años (Moss et al., 1992). La coexistencia de macroangiopatía crítica conforma la expresión genuina de la extremidad terminal.

La sucesión de factores que conducen al establecimiento y la cronificación de las úlceras en las extremidades inferiores en los pacientes diabéticos, se inician en una pequeña herida provocada por calzado inadecuado o no adaptado a deformidades, pedicuras temerarias o un pequeño traumatismo con efracción de la piel, que puede pasar inadvertida al paciente afecto por la neuropatía sensitiva, tener dificultad para explorarse la zona por falta de flexibilidad o tener problemas de agudeza visual; o bien es infravalorada por el que desconoce la importancia de la higiene y el autocuidado de la lesión inicial. Otras veces es la deformidad del pie debido a las alteraciones anatómicas causadas por la neuropatía autonómica (Pie de Charcot) que desplaza los puntos de apoyo normales y provoca la ulceración por presión sostenida en una pequeña área de apoyo (Rogers et al., 2011).

Las úlceras varicosas y las úlceras hipertensivas también frecuentes en los pacientes diabéticos son más refractarias a los tratamientos y de peor pronóstico que en los pacientes no diabéticos pues indudablemente participan además de las alteraciones endoteliales propias de la diabetes (Loots et al., 1998; Kolluru et al., 2012).

Aunque la causa permanezca poco clara, el defectuoso comportamiento del tejido afectado puede en buena parte ser explicado por la microangiopatía ocasionada por la disfunción y finalmente pérdida de la célula endotelial (Pham et al., 1998). Expuesto el subendotelio al torrente sanguíneo, cesa la función reguladora.

La distinción entre úlcera neuropática y úlcera vascular tiene interés académico, pero en la práctica, en los pacientes diabéticos, se trata de extremidades con patología mixta con el predominio de una u otra forma; la neuropatía, de estar presente, se constituye como factor de riesgo para la ulceración, pero no justifica por si sola la evolución tórpida y final fatal, pues intervienen además de dichos factores neurológicos, los vasculares, en particular las alteraciones de la microcirculación.

Los pacientes diabéticos son particularmente susceptibles a la infección de la úlcera donde coinciden neuropatía, insuficiencia vascular y disminución de la respuesta inmunológica. Una simple efracción cutánea puede ir seguida por la infección y vasculitis neutrofílica reactiva alrededor de la úlcera con liberación de citoquinas y más daño endotelial como factor agravante en un medio ya mal perfundido y degradado. La herida, superficial en principio, se propaga fácilmente a los tejidos subcutáneos contiguos y a estructuras más profundas. La exposición del hueso subyacente a la

úlcera es con mucho el peor signo exploratorio y el que pronostica con más fuerza el final de parte de la extremidad (Prompers et al., 2008).

La infección de la úlcera es una complicación frecuente dada su localización de difícil acceso para el autocuidado, expuesta al ras del suelo y embutida en un calzado frecuentemente inadecuado. Más de un 58% de las úlceras de pacientes ambulatorios están infectadas, aumentando a 82% en los pacientes hospitalizados (Prompers et al., 2007). La presencia de infección pronostica la amputación mayor o menor en el 28% de ellos (Pickwell et al., 2015).

En cualquier caso, la rapidez de la evolución, la tardanza en la consulta y un tratamiento insuficiente o inadecuado, condicionan una lamentable demora en la detención de la progresión de la úlcera, con frecuencia y por desgracia, en estadios avanzados, ya cronificada.

La precocidad en el tratamiento y la agresividad son cruciales para detener la progresión de la herida, en una extremidad mal perfundida que dificulta obtener concentraciones inhibitorias mínimas tisulares adecuadas de los antibióticos administrados frente a patógenos agresivos y resistentes y, con frecuencia, capaces de poblar la úlcera simultáneamente (Lipsky et al., 2004).

La débil respuesta flogótica en las úlceras evolucionadas puede hacer infravalorar los criterios clínicos de infección ya que la función inmunológica tampoco escapa al efecto de las altas concentraciones de glucosa en el plasma, pues se observa una respuesta deficiente de las inmunoglobulinas a la infección (Black et al., 1990; Lipsky et al., 2012). En general se acepta que las funciones fagocíticas también se deterioran, aunque la evidencias sean contradictorias (Gan, 2013).

La liberación de la presión, el tratamiento agresivo de la infección y meticuloso cuidado de la úlcera son fundamentales en el tratamiento de las primeras manifestaciones (Singh et al., 2005; Schaper et al., 2017) y es en este punto donde la atención primaria, primer contacto del paciente en busca de ayuda del sistema sanitario, debe ser capaz de detener la progresión actuando de forma decidida y evitar la consolidación de la úlcera y, lo que es primordial, la pérdida de la extremidad. Una vez controlada su progresión mediante la administración de antibióticos, descarga de la úlcera y un adecuado plan de curas, aun así la reparación de la úlcera es defectuosa, lenta y sometida a constante riesgo de complicaciones infecciosas.

La adecuación del calzado a las alteraciones anatómicas es fundamental en la prevención y el tratamiento de la úlcera establecida. La descarga de la presión sobre la úlceras plantares es imprescindible desde el inicio del proceso hasta la restauración de la continuidad cutánea sobre todo de los pacientes que precisan deambular (Mahmood et al., 2015). La concepción del sistema de descarga corresponde al ortopeda y frecuentemente, en nuestro medio, la demora en la disponibilidad de la ortesis adaptada que permita la deambulación es largo para una ulcera debutante. Hay que, además, vigilar la aparición de úlceras cuando la descarga se desplaza a nuevos puntos de apoyo.

En cuanto al plan de curas y tratamientos tópicos no hay duda que la remoción del detritus, la prevención de la infección y el respeto al proceso natural de restitución de la continuidad cutánea, son fundamentales en el tratamiento multidisciplinar de este tipo de úlceras (Singh et al., 2005). Las curas deben ser meticulosas y ejecutadas por personal formado en ello; se debe apreciar cuidadosamente la oportunidad de la intervención y la agresividad necesaria. La elección del método oclusivo adecuado se debe individualizar, así como la frecuencia de recambio; ninguna alternativa ha demostrado ser claramente superior a la gasa humedecida con suero salino (Schaper et al., 2012).

La práctica basada en la evidencia, en la que comparten importancia la experiencia clínica personal y la mejor práctica sugerida por los estudios clínicos controlados, topa con la escasa evidencia que ofrecen los ensayos publicados, tanto así en la evaluación de procedimientos quirúrgicos, como en el uso de apósitos o tejidos biológicos, aplicación de larvas, antisépticos, factores de crecimiento, práctica de flujos continuos, sistemas de *vacum* y de presión tópica negativa, aplicación de corrientes, laser, ondas de choque, ultrasonidos y electromagnetismo (Gottrup & Apelqvist, 2012). La gran heterogeneidad del problema y los diversos factores al que está sometido en su evolución, hace que la realización de ensayos clínicos controlados que puedan ofrecer resultados de calidad sea muy dificultosa en cuanto a homogenizar la selección de pacientes, la metodología y los criterios de mejoría; y de momento ningún tratamiento dirigido a mejorar la perfusión vascular, posiblemente el factor determinante en la mala evolución del problema, ha demostrado mejorar claramente su natural evolución.

Por último, resulta interesante resaltar que las diferencias entre las ratios de amputaciones entre diferentes estados parecen deberse más a actitudes del personal

sanitario y organización de los sistemas de salud, que no tanto a insuficiencia de recursos o presencia de morbilidades asociadas. (Schaper et al., 2012).

3.2 Los glicosaminoglicanos

Los glicosaminoglicanos (GAG) son un grupo heterogéneo de mucopolisacáridos sulfatados de cadena recta y carga aniónica que van desde estructuras relativamente simples, formadas por unidades repetitivas de *N*-acetilglucosamina-ácido glucurónico (hialuronato), hasta los extremadamente complejos compuestos por repetidos disacáridos diferentes que comprenden más de 10^{14} posibles secuencias para una cadena de icosasacáridos. Los GAG de la heparina y heparansulfato están estructuralmente relacionados y sintetizados en el aparato de Golgi por las mismas enzimas biosintéticas. Si bien están compuestos por idénticos disacáridos, muestran composiciones muy diferentes: la heparina que contiene una densidad mucho más alta de grupos *N*- y *O*-sulfato, y el haparansulfato una proporción mayor de ácido glucorónico y N-acetilglucosamina y menos grupos sulfato (Sasisekharan & Venkataraman, 2000).

La heparina nativa o heparina no fraccionada fue descubierta de manera casual hace un siglo por Mc Lean en 1916 a partir de extractos de corazón de buey y de hígado de perro, de los que obtuvo un compuesto soluble en éter de naturaleza fosfolipídica con potente acción anticoagulante in vitro (McLean, 1916;Wardrop & Keeling, 2008).Cuatro años más tarde Howell, a partir de los trabajos de Mc Lean, aisló un mucopolisacárido hidrosoluble al que denominó heparina por ser especialmente abundante en hígado (Howell, 1922; Wardrop & Keeling, 2008).

El heparán sulfato, químicamente similar al sulfato de heparina, pero con menor actividad anticoagulante, es un componente ubicuo en la superficie celular de las células eucariotas y en la matriz extracelular (Marcum &Rosemberg, 1987). Su presencia en la superficie luminal de las células endoteliales hace que reaccione con el complejo antitrombina-trombina circulante proporcionando un mecanismo antitrombótico endógeno sin causar efecto anticoagulante sistémico (Rosemberg & Aird, 1999; Sugahara & Kitagawa, 2002). Produce un efecto anticoagulante cuando se agrega al plasma in vitro, si bien requiere una concentración mayor que de heparina (Sugahara & Kitagawa, 2002). El heparán sulfato realiza muchas de sus acciones por medio de una gama limitada de

secuencias, a pesar del inmenso potencial para la diversidad de secuencias inherente a la estructura de la unión de disacáridos, más de un millón de secuencias diferentes pueden ser representados en un HS-octasacárido (Gallagher, 2001).

La heparina nativa tiene la mayor densidad de cargas negativas de cualquier molécula biológica conocida, está formada por secuencias repetitivas de unidades disacáridas (cadenas alternativas de residuos de D-glucosamina) con ácido urónico (L-idurónico o D-glucorónico), con un peso molecular de 60.000 a 100.000 daltons unidos en forma covalente a una proteína central que se encuentra en los gránulos secretorios de los mastocitos y basófilos (Lindahl et al., 1986; Casu, 1990). La heparina no puede detectarse en la sangre circulante y es inactiva en su forma tisular, su función fisiológica es todavía oscura, sin embargo puede suponerse que su presencia en el *glicocalix* contribuye a la homeostasis.

La heparina desempeña un papel primordial en la compleja red de serin-proteasas que convierten las proenzimas en sus formas activas. La trombina, o factor lla, es la serin-proteasa final que escinde el fibrinógeno para formar fibrina, el cimiento de un coágulo cuando se combina con un tapón plaquetario. Es una enzima glucoproteínica formada por dos cadenas de polipéptidos unidas por un puente disulfuro. Se forma a partir de su precursor protrombina en una reacción catalizada por la tromboplastina en presencia de iones de calcio (Benerza et al., 1993) El ritmo de producción de protrombina en trombina, es casi directamente proporcional a la cantidad de tromboplastina disponible en la sangre (Gray et al., 2008). La tromboplastina se forma cuando hay daño tisular y su cantidad depende del grado de daño sufrido por el vaso sanguíneo; se encuentra en casi todos los tejidos y se libera cuando existe lisis de plaquetas y lesión de las células hísticas.

La trombina activada resulta proteolítica sobre el fibrinógeno suprimiendo dos péptidos de bajo peso molecular de cada molécula, reduciéndolo a monómeros de fibrina que a su vez se aglomeran en polímeros que al estabilizarse forman el retículo del coágulo (Seegers, 1969).

La heparina actúa como molde catalítico al cual se unen el inhibidor y la proteasa a la vez. La fijación de la heparina induce un cambio en la forma de la antitrombina que hace más accesible el locus reactivo para la proteasa. Esta reacción aumenta la velocidad de la reacción trombina-antitrombina por lo menos 1000 veces. Una vez realizada la reacción, la molécula de heparina es liberada del complejo (Weitz, 1997). El

lugar de unión de la antitrombina a la heparina es una secuencia específica de un pentasacárido que contiene un residuo de glucosamina 3-0 sulfatada con ácido glucorónico siendo necesarios al menos de 18 unidades de monosacáridos (3000 a 4000 daltons) para poder inhibir la trombina por la antitrombina. Pentasacáridos de menor longitud pueden, sin embargo, catalizar la reacción antitrombina- factor X activado, produciendo en este caso sólo un cambio conformacional en la antitrombina que facilita la reacción (Hirsh & Levine, 1992). Se podría decir que la heparina tiene una acción antitrombótica ligada a su capacidad de inhibición del factor Xa y una acción anticoagulante por su acción sobre la antitrombina.

Las heparinas de bajo peso molecular (HBPM) son obtenidas de la fragmentación de la heparina no fraccionada (HNF) mediante precipitación diferencial, separación por técnicas cromatográficas o en gel, despolimerización química y métodos enzimáticos obteniéndose unos compuestos heterogéneos cuyo peso molecular ronda entre los 3000 y los 8000 daltons. (Hirsh & Levine, 1992). La diferencia más relevante respecto a las HNF reside en su mayor acción anti-Xa con un menor efecto antitrombina (anti-IIa), lo que es sinónimo de mayor eficacia antitrombótica con menor riesgo hemorrágico. La HBPM, incluso a dosis muy altas, sólo prolonga débilmente el TTPA en comparación con la HNF, mientras que la actividad anti-Xa es considerablemente mayor con la HBPM que con la HNF, incluso a dosis más reducidas (Hirsh & Levine, 1992; Weitz, 1997). Con la HNF se observa que la relación anti-Xa/anti-IIa es igual a 1, en las HBPM la relación es considerablemente mayor el efecto anti-Xa que el anti-IIa. La diferencia entre la HNF y las HBPM estriba en el diferente mecanismo de acción de la heparina en el factor Xa y de la trombina; concretamente, el factor Xa no se une a la heparina en el complejo Xa-antitrombinaIII-heparina, sino que sólo se une a la antitrombina III y esta a la heparina, por lo que ejerce su efecto inhibitorio independientemente del número de oligosacáridos que posea. Sin embargo, para la inhibición de la trombina esta se une a la antitrombina III ya la heparina a la vez, de manera que son necesarias moléculas con mayor número de oligosacáridos para que se produzca inhibición (Hirsh & Levine, 1992; Weitz, 1997). Dado que la HBPM tiene fundamentalmente acción anti-Xa, teóricamente, sería mucho más eficaz como antitrombótico que la heparina convencional, con un riesgo menor de hemorragias.

La vida media es considerablemente mayor tanto después de la administración subcutánea como tras la aplicación intravenosa, así como la biodisponibilidad, posiblemente en relación con los componentes de peso molecular más bajo,

existiendo una relación inversa entre la absorción de la HBPM y su peso molecular (Barzu et al., 1984).

Puede no ser fácil detectar en el laboratorio el posible efecto profibrinolítico, ya que se producirse localmente. Un estudio angiográfico ha observado lisis del coágulo tras la administración de HBPM, sin que simultáneamente se detectasen cambios en parámetros fibrinolíticos (Rutllant et al; 1986). Otro aspecto importante es la posible existencia de otros mecanismos de acción antitrombótica diferentes de los medidos por su acción anti-Xa. La acción antitrombótica de las HBPM in vivo se mantiene durante 24 horas, mientras que el efecto inhibitorio del factor Xa sólo puede medirse durante 6-8 horas (Hirsh & Levine, 1992). Obviamente deben existir otros mecanismos antitrombóticos adicionales distintos a la acción anti-Xa. Es necesario pensar que además existen una serie de procesos endógenos en los que interviene la heparina, no detectables por los test de laboratorio, tales como interacciones endoteliales y celulares, modulación de la síntesis o liberación de glicosaminoglicanos endógenos, interacción con fibrinógeno y otras proteínas, así como interacción directa con varias serpinas inhibidoras del factor Xa, trombina y otras proteasas, y liberación de los inhibidores de la vía extrínseca de activación de la protrombina (Vairel et al., 1983; Walenga et al., 1990; Sugahara & Kitagawa, 2002).

Algunas de las indicaciones de utilización de las HBPM en virtud de su efecto anticoagulante son: la profilaxis de la enfermedad tromboembólica, el tratamiento del tromboembolismo venoso establecido, la hemodiálisis, la coagulación intravascular diseminada, como alternativa a la profilaxis con anticoagulantes orales, como adyuvante a otros tratamientos en el infarto agudo de miocardio, trombosis cerebrales, cirugía cardíaca, enfermedad vascular periférica y angioplastia. (Hirsh & Levine, 1992; Weitz, 1997). Otros efectos biológicos que pueden deparar aplicaciones clínicas incluyen la capacidad de modular el desarrollo embrionario, el crecimiento de neuronas, la homeostasis del tejido, cicatrización de heridas, metástasis, diferenciación celular, proliferación celular y la inflamación (Tyrell et al., 1995).

Ceriello (1986) ya observó que la hiperglucemia inducida (en sujetos diabéticos y normales) disminuye la actividad de la antitrombina III y los niveles del complejo trombina-antitrombina III, y el aumento de los niveles plasmáticos fibrinopéptido A, mientras que la concentración de antitrombina III permanece estable. Un lábil proceso de glicación no enzimática de los residuos lisina y arginina de la antitrombina III,

localizados en el sitio de unión a la heparina, reduce significativamente su actividad anticoagulante, a pesar de su concentración plasmática normal (Ceriello et al., 1990). La relevancia de la glicación de la antitrombina en pacientes diabéticos es apenas perceptible debido a la lenta acción glicante de la glucosa, y a la reducida vida media de la antitrombina (Cano et al., 2005). Esta alteración es dependiente del nivel de glicemia, en correlación inversa entre las fluctuaciones del nivel de glucosa en sangre, pues la euglucemia inducida por la infusión de insulina restaura la actividad de la antitrombina III y las concentraciones del complejo trombina-antitrombina III y fibrinopéptido A (Ceriello et al., 1986). La administración subcutánea y endovenosa de heparina restauró la actividad de ATIII en diabéticos, preservando su actividad de las alteraciones inducidas por la hiperglucemia (Ceriello et al., 1990). En modelos animales, se ha observado que las infusiones de HBPM reducen el daño del glicocalix y la posterior adhesión de los leucocitos (Lipowsky & Lescanic, 2017).

La bemiparina es una HBPM de segunda generación. Según describe el manual del medicamento (Laboratorios Rovi), por su composición de fragmentos, presenta unas cualidades y características que la distinguen del resto de las HBPM, lo que hace que sea considerada el primer representante de la segunda generación de HBPM. Tiene un peso molecular (PM) medio de 3.600 daltons, el menor de las HBPM actualmente comercializadas. Presenta una óptima distribución de los fragmentos: un 74,6% tiene un PM comprendido entre 2.000 y 6.000 daltons; el porcentaje de fragmentos con PM mayor de 6.000 daltons es muy inferior al del resto de las HBPM. Aunque posee un mecanismo de acción anticoagulante similar al de otras HBPM, la composición de los fragmentos de polisacáridos de Bemiparina, condiciona que el coeficiente anti-Fxa/anti-FIIa sea 8:1, mucho mayor que para el resto de las HBPM y para la HNF. Esta relación está directamente relacionada con la longitud de los fragmentos y condiciona el beneficio antitrombótico frente al riesgo hemorrágico.

Bemiparina tiene una vida media de 5,3 horas, bastante superior al resto de las HBPM comercializadas. Parte de la acción antitrombótica de las heparinas, está mediada por su acción sobre la liberación del inhibidor de los factores tisulares (TFPI), que son responsables de la activación primaria de la cascada de coagulación. Bemiparina ha demostrado que produce un importante aumento de la liberación del TFPI sintetizado por las células endoteliales y por los monocitos, lo que contribuye a su acción antitrombótica. Bemparina ejerce su actividad antitrombótica mediante la acción del TFPI durante las dos primeras horas siguientes a su administración; mediante las

acciones sobre la antitrombina III y el TFPI, simultáneamente las ocho horas siguientes (rango 2-10 horas); y mediante la antitrombina III las últimas ocho horas (rango 10-18 horas), siendo este el motivo por el que Bemiparina mantiene la adecuada anticoagulación del paciente hasta 18 horas después de su administración subcutánea, lo que permite una sola inyección al día (Bleicher, 2000).

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis de estudio surge de una primera observación clínica en una consulta de atención primaria de un municipio (Pollença) de 17 mil habitantes del norte de Mallorca, al observar mejoría de la úlcera crónica en extremidades inferiores del paciente diabético al ser tratados con HBPM. Tras haber reflexionado sobre ello se identificaron hasta seis pacientes diabéticos que presentaban úlceras en los pies de evolución tórpida, que habían iniciado tratamiento con HBPM por riesgo de trombosis venosa profunda debido a encamamiento, en presencia de otros factores de riesgo. En el transcurso del tratamiento los pacientes experimentaron mejoría de los signos locales de la úlcera y pudo observarse una evolución favorable de la lesión. Al cesar la situación de riesgo y recuperar la deambulación, se decidió continuar administrando una dosis inferior a la profilaxis de trombosis venosa profunda (2.000 U de enoxaparina) en dosis única diaria a todos los pacientes. No varió el protocolo de actuación en cuanto a curas de enfermería (limpieza con agua y jabón, retirada quirúrgica de esfacelos y material necrótico cuando los hubiere y oclusión no compresiva), protección de la carga sobre la lesión y antibioterapia oral en caso de aparecer signos de infección. El tratamiento se suspendió al completarse la epitelización. Ningún caso presentó efectos adversos propios del tratamiento con heparinas.

Estas observaciones sugerían que la administración de HBPM pudiera favorecer la curación de las úlceras tórpidas de en las extremidades inferiores del paciente diabético. Compartida la hipótesis con la unidad de investigación y con la unidad de farmacología de atención primaria de Mallorca nos llevó a comunicar estos hallazgos en forma de carta al director de la revista Medicina Clínica (Rullan, et al 2002) y nos animó a seguir investigando.

El endotelio vascular, cuya integridad es fundamental para regular el equilibrio de los factores procoagulantes y evitar la trombosis, es anormal en la diabetes (Egeberg, 1963; Cohen et al., 2002; Carr, 2001). Aso et al., 2002; Thor et al 2002; Bolaman et al., 2007; Tripodi et al., 2011; Kim et al., 2014; Pereira et al., 2016). Como ya se ha mencionado, hay suficientes pruebas en humanos que indican que la disfunción endotelial está estrechamente asociada con el desarrollo de la retinopatía diabética (Van Hecke et al., 2005; Spijkerman et al., 2007; Klein et al., 2009), nefropatía

(Stehouwer, 2004; Taslıpınar et al., 2011; Nakagawa et al., 2011), neuropatía (Østergaard et al., 2015) y la aterosclerosis (Creager & Lüscher, 2003. Tabit & Chung, 2010) tanto en la diabetes tipo 1 como en la diabetes tipo 2. Otras observaciones apuntan a que el menoscabo de las funciones del endotelio desempeña un papel importante en las alteraciones de la activación de las plaquetas y los factores de coagulación observados en la diabetes (Carr, 2001. Bolaman et al., 2007).

La fisiopatología de las alteraciones vasculares propias de la diabetes en la que la disfunción endotelial y la hipercoagulabilidad desempeña un rol preponderante y a la plausibilidad biológica de que la acción de las HBPM puede mejorar un medio mal perfundido sometido a un ambiente procoagulante (Nader et al., 1989; Van der Piji et al, 1997;Garbaruchuk et al., 1998; Hehenberger et al., 1998; Ceriello et al., 1998; Kalani et al., 2007); apoyándonos en la observación de buena evolución en 6 casos tratados ya comentados (Rullan et al; 2002) y en experiencias de otros investigadores en la utilización de heparinas en el pie diabético (Jörneskog et al; 1993); retina (Van der Pijl et al., 1997) y nefropatía (Myrup et al., 1995), planteamos un estudio, ambicioso dentro de nuestras posibilidades, con el fin de determinar si la administración de una heparina de bajo peso molecular (HBPM) puede ser útil en el tratamiento de estas complicaciones en el ámbito de la atención primaria.

Las observaciones realizadas y la escasa pero existente literatura nos animó a realizar esta investigación con la intención de mejorar la calidad de vida del paciente diabético, disminuir la incidencia de sus terribles consecuencias y eventualmente reducir los costes económicos que derivan de la atención de este problema de salud.

Nuestra principal hipótesis era que el efecto del tratamiento con bemiparina en la mejora de las úlceras tórpidas de en las extremidades inferiores del paciente diabético sería superior al placebo. Otras hipotesis secundarias eran que el tratamiento con bemiparina sódica comparado con el placebo supondría:

- una mejora en la función renal

- una mejora en la calidad de vida relacionada con la salud.

Además, el tratamiento con bemiparina durante tres meses no presentaría efectos de seguridad importantes.

Los objetivos del estudio se concretaron de la siguiente manera:

Objetivo primario

- Establecer el grado de eficacia del tratamiento con bemiparina durante 3 meses, en la mejoría de las úlceras tórpidas de en las extremidades inferiores del paciente diabético.

Objetivos secundarios

Comparar los dos grupos de tratamiento en cuanto a:

- Evolución de la proteinuria.
- Fondo ojo
- Incidencia de amputaciones.
- Evolución de la calidad de vida.
- Seguridad del tratamiento.

5. MÉTODOS

Con la finalidad de evaluar el efecto del tratamiento con bemiparina sódica en la mejoría de las úlceras tórpidas de en las extremidades inferiores del paciente diabético, se diseñó un ensayo clínico fase III, prospectivo, aleatorizado, en dos brazos paralelos, triple ciego y controlado con placebo, en el que se incluyeron pacientes con DM que fueron randomizados en dos brazos de tratamiento, (Bemiparina 3.500 UI/día durante 10 días y Bemiparina 2.500 UI/día hasta 90 días de tratamiento o placebo). Para mantener el carácter triple ciego, tanto la bemiparina como el placebo tenían la misma apariencia externa. Las evaluaciones de las variables del estudio se llevaron a cabo manteniendo el carácter triple ciego del ensayo. No se llevó a cabo ningún análisis de datos intermedio.

El diseño del estudio se publicó en la revista Atención Primaria.

La regulación y realización de un ensayo clínico con medicamentos es muy exigente, al igual que el comité ético de investigación, para que se haga su descripción completa de la misma tal y como se recoge en la Declaración de Helsinki.

En la presente tesis se ofrece una descripción más exhaustiva sobre el diseño, recogida de datos y análisis de resultados de aspectos que no permitió la publicación al limitar la extensión.

5.1 Diseño del estudio.

El estudio se definió como fase III-IV, pues contemplaba el empleo de un fármaco ya comercializado, la Bemiparina, en una indicación distinta de la que tiene aprobada y figura en su ficha técnica, (prevención y tratamiento de la enfermedad tromboembólica venosa), mas el diseño se ajusta más a un ensayo en fase II de prueba de concepto.

Antes de comenzar con el periodo de intervención, durante los 15 días previos al comienzo del tratamiento, se estandarizaron los cuidados recibidos por el paciente para la cura de la úlcera. Así se instauró un protocolo que consistía en la limpieza de la herida, el desbridamiento del tejido necrótico en el caso de que fuera necesario, la hidratación con suero fisiológico o hidrogeles y el vendaje no compresivo de la misma.

Este protocolo estandarizado de curas se mantuvo en los pacientes de ambos brazos de tratamiento durante todo el periodo del estudio. En este sentido y para tratar de evitar posibles sesgos, la enfermera del estudio instruyó a los pacientes para llevar a cabo este protocolo de curas. Así, y teniendo en cuenta el empleo de placebo, se pretendió que la única diferencia entre los brazos del estudio fuese el empleo o no de Bemiparina.

Se eligió un periodo de tratamiento de 3 meses porque, según los datos disponibles en el momento del diseño del estudio, este periodo parecía adecuado para ser tomado como media del tiempo necesario para la curación de este tipo de heridas. Así mismo, el fármaco en estudio (bemiparina sódica) se había empleado ampliamente durante periodos de hasta tres meses de tratamiento habiéndose demostrado que resultaba segura y como tal autorizada por la AEMPS.

La población del estudio fue aleatorizada en ambos grupos de tratamiento sin tener en cuenta una posible estratificación de la misma por características de la población (grado de isquemia del paciente, el control metabólico o la presencia de insuficiencia venosa) o por la toma de medicación concomitante (antiagregantes plaquetarios).

5.2. Población del estudio

Criterios de inclusión

Los pacientes incluidos debían ser sujetos mayores de edad, diagnosticados de DM tipo I o II (según criterios de la ADA 1.998) con más de 3 años de evolución y presentar una úlcera cutánea grado 1 o 2 según la Clasificación de Wagner, (Wagner, 1991) distal a la rodilla, que no hubiese curado en tres meses de atención sanitaria convencional. Todos los pacientes incluidos firmaron el consentimiento informado.

Criterios de exclusión

Ningún paciente de los incluidos cumplía uno o más de los siguientes criterios:

- Pacientes con hipersensibilidad conocida a las heparinas de bajo peso molecular, a la heparina o sustancias de origen porcino.
- Peso <35 Kg.

- Pacientes con una úlcera cutánea grados 3, 4 o 5 según la clasificación de Wagner.
- Pacientes con antecedentes de enfermedades trombofílicas.
- Pacientes con diátesis hemorrágica congénita o adquirida, prolongación de TTP o TP por encima del 20% respecto a los valores normales.
- Pacientes con úlcera gastrointestinal activa o con antecedentes de episodios hemorrágicos clínicamente evidentes o cirugía mayor en el último mes.
- Pacientes que reciban tratamiento anticoagulante.
- Pacientes con trombocitopenia (recuento de plaquetas <100.000/mm3).
- Pacientes con enfermedades renales, hepáticas, gastrointestinales o endocrinas, clínicamente relevantes o incontroladas, o pacientes con otras enfermedades graves concurrentes.
- Pacientes con hipertensión no controlada (PAS>200 mmHg; PAD>100 mmHg).
- Pacientes con endocarditis séptica.
- Pacientes con retinopatía proliferativa con riesgo hemorrágico.
- Pacientes embarazadas, lactantes, que hayan dado a luz en un plazo inferior a 6 meses, o fértiles que no estén tomando las precauciones anticonceptivas adecuadas.
- Pacientes con neoplasias activas, con una expectativa de vida <3 meses o incapacidad para cumplir el tratamiento y seguimiento del estudio.

Retirada de pacientes

Todas las causas de abandono se recogieron para ser detalladas. Se informó y recalcó a los participantes que podían abandonar la intervención por decisión propia y sin necesidad de dar explicaciones, y que ello no repercutiría en la posterior atención al problema. Pensamos que ello reforzó el consentimiento a la inclusión y, puesto que el análisis sería por intención de tratar, poder analizar los abandonos.

Determinación del tamaño de la muestra

En el momento de la elaboración del protocolo no se halló bibliografía sobre la evolución, en un plazo de 3 meses, de las úlceras tórpidas en el pie diabético. Existían datos sobre la evolución hacia la amputación. Tampoco se conocía la eficacia de las HBPM en este tipo de lesiones. Por los motivos referidos no se pudo fundamentar una hipótesis cuantificada de eficacia, por lo que se optó por plantear un ensayo suficiente

para evidenciar eficacia cuando la diferencia de efecto en el grupo tratado obtenga respuestas favorables en un 30% más de pacientes que en el grupo control, para la situación de máxima indeterminación (Pintervención=0,65; Pcontrol=0,35), asumiendo un error tipo I del 0,05 y error tipo II del 0,2.

De acuerdo con un ensayo realizado por el equipo del Dr. B. Fagrell del Karolinska Institute y con la información preliminar de seis casos en tratamiento profiláctico de trombosis venosa profunda con HBPM, publicados por miembros del grupo investigador (Rullan et al, 2002) que mostraban resultados esperanzadores en la mayoría de pacientes, nos atrevimos a plantear la hipótesis unilateral de eficacia. Bajo este supuesto el número de sujetos necesarios por rama se calculó en 34, que aumentamos hasta 42 pacientes por considerar un 20% de pérdidas. Se estimó que se requerirían en total 84 pacientes.

Método de asignación de pacientes a los grupos de tratamiento

Una vez comprobado que los pacientes cumplían todos los criterios de inclusión y ninguno de los de exclusión y habían firmado el consentimiento informado, mediante un sistema de aleatorización automatizado, fueron asignados o bien al grupo de tratamiento o al grupo control, con un código de identificación del paciente. No se empleó ningún método específico de estratificación de la muestra. La aleatorización en ambos grupos se realizó completamente al azar.

Una vez comprobado que los pacientes cumplían criterios de inclusión y no los de exclusión, y habían firmado el consentimiento se asignaron al grupo experimental o de control de forma aleatoria y equiprobable. Se generó informáticamente, mediante números seudoaletorios, siguiendo un sistema de bloques de cuatro.

5.3 Desarrollo del estudio

Para informar a los centros de salud del área de Mallorca, el ensayo clínico fue presentado en cada centro por el equipo investigador. Así mismo, se envió una carta a todos los profesionales de AP para invitarles a que procedieran a la identificación preliminar de los pacientes candidatos a participar en el estudio.

Tras identificar los posibles casos, el investigador principal y la enfermera del estudio se desplazaban a los centros para verificar la elegibilidad de los pacientes y se concertaba la cita con el paciente.

Periodo de selección

Visita 0:(de preselección) se ofrecía información precisa del estudio al paciente y se obtenía la firma del consentimiento informado. Se cursaban la solicitudes de analítica (recuento de hematíes, hematocrito, hemoglobina, VCM, RDW, recuento y fórmula leucocitaria, VSG, PCR, recuento de plaquetas, glucosa, urea, creatinina, ALT, AST, GGT, Na, K, HbA1C, tiempo de protombina, TTPA, antitrombina III, fibrinógeno, marcadores biológicos, sedimento de orina y cultivo de orina), radiografía del pie afecto e interconsulta de oftalmología para valoración de retinopatía con realización de retinografía (7 campos, incluido el central).

Visita 1: (de inclusión), se verificaron de los criterios de elegibilidad del paciente. Se procedió a la homogenización de las curas según el protocolo de curas establecido en el protocolo del estudio. El objeto de esta estandarización en las curas fue eliminar el posible sesgo originado por las diferentes formas de tratar la herida, haciendo que todos los pacientes fueran tratados en igual forma para la úlcera, siendo la única diferencia en el tratamiento de esta, el tratamiento del estudio. Se suministró al paciente el material necesario para realizar las curas. Se estableció en esta visita el calendario de visitas sucesivas.

Intervención

Visita 2: (Primera visita de intervención), se llevó a cabo entre los 7 y 10 días de la visita anterior. En el transcurso de la misma, se verificó la forma de realizar las curas, el calzado y el estado de la úlcera (existencia de infección). En esta visita se instruyó al paciente sobre la administración de la medicación del estudio. También se realizó la primera fotografía digital de la úlcera para la valoración de la variable principal. En la fotografía se incluyó una cinta métrica para realizar de forma posterior la medida de la misma. En el testigo milimétrico se incluyeron los datos de la visita y el paciente. Se entregó de la medicación del estudio.

Visita 3: (Segunda visita de intervención), a los 8 días de la anterior. Además de verificar las curas, el calzado y el estado de la úlcera se procedió a recoger los envases de la medicación entregados durante la visita anterior. En esta visita se

realizó la solicitud de la analítica de seguridad (recuento de hematíes, hematocrito, hemoglobina, VCM, RDW, recuento y fórmula leucocitaria, VSG, PCR, recuento de plaquetas, tiempo de protombina, TTPA, antitrombina III, fibrinógeno).

Visitas 4 a 8: (días 15, 30, 45, 60 y 75). En el transcurso de estas visitas se verificaron las curas, el estado de la úlcera (infección) y el calzado. Se suministró la medicación y el material de curas. Se recogieron los envases de la medicación usada, se cumplimentó el CRD y se citó al paciente para la siguiente visita.

Visita 9: (Última visita de intervención) A los tres meses (90 días) de iniciado el tratamiento. Se tomó la imagen final de la úlcera, se recogieron los envases de medicación entregados al paciente, se solicitó una analítica (recuento de hematíes, hematocrito, hemoglobina, VCM, RDW, recuento y fórmula leucocitaria, VSG, PCR, recuento de plaquetas, glucosa, urea, creatinina, ALT, AST, GGT, Na, K, HbA1C, tiempo de protombina, TTPA, antitrombina III, fibrinógeno, marcadores biológicos, sedimento de orina y cultivo de orina)

Visita 10: al año de haber comenzado el estudio se volvió a citar al paciente para observar la evolución que había seguido desde que finalizó el tratamiento. Igualmente se solicitó una interconsulta a oftalmología para nueva valoración de retinopatía con realización de retinografía (7 campos, incluido el central).

Tabla 1. Esquema de las determinaciones realizadas para la evaluación de variables en cada una de las visitas del estudio

Nº visita	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Día	0	1	7	15	30	45	60	75	90	180	270	365
Sólo contacto telefónico										X	X	
Verificación criterios de inclusión/exclusión	X	X										
Firma del consentimiento informado	X											
Solicitud hemograma	X		X					X				
Solicitud albuminuria	X							X				
Fotografía úlcera/s			X						X			
Estadio de la úlcera			X						X			X
Recogida efectos adversos			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Medición calidad de vida (SF-36)		X							X			X

5.4 La intervención:

Tratamientos administrados

Brazo experimental: Bemiparina 3.500 UI/día 10 días + Bemiparina 2.500 UI/día 80 días en inyección subcutánea.

Brazo control: Placebo 90 días en inyección subcutánea.

Ambos fármacos presentaban igual apariencia para mantener el carácter doble ciego del estudio

- Fármaco Control: Placebo. Cloruro Sódico 0,9% en jeringa precargada de 0,2 ml.
- Fármaco Experimental: Bemiparina Sódica
- Grupo Farmacoterapéutico: B01AB Antitrombóticos
- Grupo terapéutico: Heparina de Bajo Peso Molecular

Composición cuantitativa y cualitativa:

Bemiparina 3.500 UI (anti-Factor Xa) por jeringa precargada de 0,2 ml. Equivalente a 17.500 UI (anti-FactorXa) por ml de solución inyectable.

Bemiparina 2.500 UI (anti-FactorXa) por jeringa precargada de 0,2 ml. Equivalente a 12.500 UI (ant-Factor Xa) por ml de solución inyectable.

Selección de las dosis empleadas

La bemiparina se ha empleado de forma segura en la prevención y tratamiento de la enfermedad tromboembólica venosa. En la actualidad, la Bemiparina sigue comercializada en dosis diferentes dependiendo de su indicación como profilaxis o tratamiento de la enfermedad tromboembólica venosa:

Profilaxis de bajo riesgo: 2.500UI/día

Profilaxis de alto riesgo: 3.500 UI/día

Tratamiento de la trombosis establecida: 5000 a10.000 UI/día en pacientes de más de 50 kg

Teniendo en cuenta que en el momento del diseño del protocolo no existían en la literatura datos publicados sobre el empleo de HBPM en el tratamiento de úlceras de pie diabético, en el esquema de tratamiento se eligieron las dosis de bemiparina que habitualmente se emplean para la profilaxis de la enfermedad tromboembólica. Así en una primera fase que podría ser denominada como “fase aguda” se escogió Bemiparina 3.500 UI/día (dosis profiláctica de alto riesgo) siguiéndose de un periodo que podría denominarse “fase de mantenimiento” en el que se redujo la dosis empleándose dosis profilácticas de bajo riesgo (Bemiparina 2.500 UI/día).

Como se ha indicado de forma previa, tanto la dosis de la medicación como el esquema de dosis dentro de los pacientes de cada grupo fue idéntica en ambos brazos.

Mantenimiento del ciego

Tanto la medicación experimental como el placebo presentaban la misma apariencia física, aspecto, color y forma de administración. Ni el promotor, ni el investigador principal, ni el paciente, sabían el brazo de tratamiento atribuido. El análisis de los datos también se realizó de forma ciega y los códigos se rompieron de forma posterior.

Tratamiento previo y concomitante

Se recogió el tratamiento concomitante de los pacientes incluidos. El protocolo de curas del estudio se estandarizó de forma que todos los pacientes incluidos en el estudio recibían las mismas curas. La enfermera del estudio realizó las curas y formó a los pacientes y a sus familiares para que realizaran las curas de forma ambulatoria. El protocolo de curas estandarizado consistió en el lavado de la herida, hidratación con suero salino y vendaje oclusivo. En caso necesario, el desbridamiento quirúrgico fue realizado por la enfermera del estudio en las visitas de control.

Cumplimiento terapéutico

El cumplimiento terapéutico fue valorado en función de los envases de medicación vacíos entregados al final del tratamiento (mes 3), ya que se consideró equivalente al número de días de administración (máximo 90 días). Para los abandonos prematuros se consideró el recuento de envases vacíos hasta el momento del abandono.

5.5 La Información

Como variable principal se definió el efecto del tratamiento con bemiparina sobre las úlceras tórpidas de en las extremidades inferiores del paciente. Como variable principal de seguridad se recogieron los efectos adversos en cada brazo de tratamiento.

Variable principal de eficacia

Se consideró como variable principal de eficacia la mejoría de la úlcera definiéndose como una reducción en, al menos, un 50% el área de su superficie de la herida y/o variación favorable del estadio de al menos un grado entre el control antes de iniciar el tratamiento y la valoración a los tres meses (al finalizar el tratamiento a estudio) (Visitas 2 y 9 del estudio).

Para tal fin se valoró:

-Área de la úlcera en mm2: Medida mediante fotografía digital con regla testigo y código de paciente. Aunque en principio se estableció que el área de la úlcera sería calculada en el laboratorio de histomofometría de la facultad de Medicina de la Universidad de Alcalá de Henares, durante el desarrollo del estudio falleció el Dr. Horacio Rico Lenza, Catedrático de Medicina de la Universidad de Alcalá, persona que iba a realizar de forma ciega la evaluación de la variable principal. De manera que se procedió a realizar una enmienda al protocolo en la que se clarificaba que por esta causa el análisis del área de la úlcera se realizaría en el Laboratorio de Histomorfometría de la Universidad de las Islas Baleares por método informático (programa J-Image). De forma ciega se realizaron dos medidas del cálculo del área de la fotografía que incluía testigo milimétrico, del inicio del tratamiento y de la fotografía del área de la úlcera al final del mismo. Estas evaluaciones fueron realizadas por M. Rullan (investigador principal del estudio) y por G. Frontera (investigador colaborador). En el caso de que existiera discrepancia mayor al 10% entre ambas medidas, se llevaba a cabo una tercera mediada por otro observador independiente.

-Estadio de la úlcera según la afectación de planos mediante sondaje con hisopo estéril. Las úlceras fueron clasificadas según Wagner (Wagner, 1991):

- Grado 1: úlcera superficial (dérmico-epidérmica)
- Grado 2: úlcera profunda (alcanza tendón o cápsula)
- Grado 3: úlcera penetrante que afecta a hueso o articulación
- Grado 4: gangrena minor, localizada en antepié
- Grado 5: gangrena extendida a mayor parte del pie.

En caso de existir más de una úlcera, se eligió la de mayor tamaño o estadio.

Variables secundarias de eficacia

- Albuminuria (valoración inicial/final): Calculada como la media de tres recogidas de orina nocturna en tres muestras consecutivas previas al inicio del tratamiento y tres más en la última semana del periodo de tratamiento (Visitas 2 y 9).
- Incidencia de amputaciones: Durante el periodo de un año.
- Calidad de vida: mediante valoración inicial/final de la escala SF-36 Versión española (Alonso et al., 1995).

Variables de seguridad

Como variable principal de seguridad se recogió la incidencia de acontecimientos adversos en todos aquellos pacientes que hubieran recibido al menos una dosis de la medicación del estudio (población de seguridad). Se evaluaron los acontecimientos adversos de acuerdo a gravedad, intensidad y relación con el fármaco. Se describieron y listaron todos los acontecimientos adversos siguiendo la clasificación por Órganos y Sistemas y codificados según el diccionario MedDRA, versión 10.0.

Se definió la hemorragia mayor como todo aquel sangrado fatal, sangrado sintomático en un área u órgano crítico (ej. intracraneal, intraespinal, intraocular, retroperitoneal, intraarticular, pericárdico o intramuscular con síndrome compartimental), sangrado que causase una caída en la hemoglobina ≥20g/L (1,24 mmol/L), que necesitase de transfusión de dos o más unidades de sangre completa o concentrado de hematíes (Schulman et al. 2005) o que necesitase reintervención debido a sangrado en pacientes sometidos a cirugía. Se definió la hemorragia menor como toda aquella que no cumplía con los criterios de hemorragia mayor.

También se evaluaron los parámetros de laboratorio. Todas estas variables se compararon de acuerdo con el grupo de tratamiento.

Idoneidad de las medidas

La Escala de Wagner (Wagner, 1991) constituye la forma más aceptada de clasificación de las úlceras en función a la gravedad de la misma y aunque existen otras clasificaciones para este tipo de lesiones, las publicaciones a nivel internacional siguen empleando este método para clasificar la profundidad y gravedad de la úlcera. El estudio de la evolución de la úlcera según esta escala está aceptado de forma internacional por la comunidad científica.

Así mismo, el área de la herida es condicionante de su evolución siendo su disminución un factor pronóstico de la curación final de la misma. Para su cálculo se eligió el estudio planimétrico según método informático descrito (Image J) mucho más exacto que otros métodos.

Las fotografías se realizaron con testigo milimetrado y método de obtención de la misma fue siempre el mismo puesto que todas las fotografías digitales fueron llevadas a cabo por la misma persona (M Rullán).

Medidas de control de calidad de los datos

Para contrastar la calidad de los datos recogidos en los cuadernos de recogida de datos, Logitest, S.L., empresa de investigación por contrato (CRO), se encargó de la monitorización. Así mismo, esta CRO se aseguró de que el estudio se llevara a cabo según Buenas Prácticas Clínicas y lo indicado en la Declaración de Helsinki.

5.6. Plan de análisis

Mecanización de datos: desde el CRD a la base de datos (Microsoft® Access 97), se realizó una doble introducción de las variables centrales del estudio, con identificación y modificación de discrepancias con el fin de minimizar errores.

Estrategia de análisis de los datos: El análisis principal de eficacia se realizó por intención de tratar. El estadístico desconoció la asignación de tratamientos. Además de utilizar un sistema de asignación aleatoria compensada, se analizó la homogeneidad

de los dos grupos para las variables basales, personales y tipo y tiempo de evolución de diabetes.

Se realizó un análisis de la diferencia de proporciones (absoluta y relativa) en la variable principal de efecto, con sus respectivos intervalos de confianza al 95%. Se calculó el riesgo relativo (RR) y el número de pacientes a tratar (NNT) necesario para obtener una mejoría.

En el protocolo se especificaba que se establecería la probabilidad de respuesta por un modelo de regresión logística de las variables predictoras, pero el tamaño de la muestra hizo preferible un análisis estratificado para cada variable independiente, especialmente en caso de falta de homogeneidad entre los dos grupos. Los objetivos secundarios se analizaron comparando proporciones entre grupos de tratamiento.

El análisis de seguridad se realizó en la población de seguridad (aquella que recibió al menos una dosis de la medicación del estudio).

Se utilizó la media y desviación estándar (DE), mediana, rango y mínimo-máximo para la descripción de variables continuas, y los porcentajes para la descripción de variables categóricas. Para la comparación de variables continuas se utilizó la prueba de la t de Student, el test no paramétrico de Wilcoxon para muestras independientes o un análisis de la covarianza cuando se requirió ajustar por el valor basal (ANCOVA). La prueba de Chi cuadrado de Pearson y el test exacto de Fisher se utilizaron para comparación de variables categóricas. Todos estos cálculos se realizaron mediante el paquete informático SAS System, versión 8.02 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) y llevados a cabo por el experto estadístico del equipo investigador G. Frontera

Cambios en la conducción del estudio o en los análisis planeados:

Según se describió en la versión final del protocolo enviada a la AEMPS la valoración del área de la úlcera por método informático fue planificada para su realización en la Facultad de Medicina de la Universidad de Alcalá de Henares por método informático, durante el desarrollo del estudio se produjo el fallecimiento del Dr. Horacio Rico Lenza, Catedrático de Medicina de la Universidad de Alcalá persona que iba a realizar de forma ciega la evaluación de la variable principal. Por esta causa se procedió a realizar una enmienda al protocolo que fue notificada a la AEMPS. Finalmente, la evaluación

de esta variable se realizaría en el Laboratorio de Histomorfometría de la Universitat de les illes Balears por método informático (programa J-Image). Así, de forma ciega se realizaron dos medidas del cálculo del área de la fotografía que incluía testigo milimétrico, del inicio del tratamiento y de la fotografía del área de la úlcera al final del mismo. Estas evaluaciones fueron realizadas por M Rullan (investigador principal del estudio) y por G Frontera (investigador colaborador) En el caso de que existiera discrepancia mayor al 10% entre ambas medidas, se llevaba a cabo una tercera mediada por otro observador, Ll Cerdà (investigador colaborador).

Para evaluar la calidad de vida de los pacientes antes y después del tratamiento se realizó el Cuestionario de Calidad de Vida SF36 versión española validada, por considerarse completo y adecuado para los fines del estudio.

No se había previsto en el protocolo el tratamiento de abandonos y datos *missing*, por lo que se ha empleado la imputación lógica de estos valores y se ha añadido un análisis de sensibilidad para asegurar que la pérdida de información no haya tenido ningún efecto sobre las principales conclusiones de estudio. Teniendo en cuenta la tendencia a la cronicidad de este tipo de úlceras, consideramos que el escenario más adecuado para la evaluación de la variable principal fuera la asunción de que todos los datos *missing* fuesen considerados como resultados negativos, ya que la mayoría de los abandonos se produjeron por decisión personal del paciente, lo que hace presuponer la percepción subjetiva de falta de eficacia del tratamiento del estudio por parte del paciente.

Por esta razón, para las variables principales de eficacia, los datos *missing* se imputaron al peor de los casos, es decir, si la variable es tener o no tener el evento y tener el evento es algo bueno, los valores *missing* se sustituyen por no tener el evento. Por ejemplo, la variable principal mejoría, compuesta por reducir el 50% del tamaño del área de la úlcera y/o reducir en, al menos, un grado el estadio de la úlcera en la escala Wagner (Wagner 1991), cuando no se sabe el resultado se ha sustituido por el peor caso, es decir, se ha considerado que el paciente no ha llegado al evento mejorar.

Se empleó un análisis de la covarianza con covariante basal (ANCOVA) cuando se comparó la evolución de un parámetro de laboratorio entre los dos grupos de tratamiento, con el fin de evitar conclusiones erróneas al comparar sólo el cambio producido en un parámetro entre bemiparina y placebo sin tener en cuenta de qué valor de inicio parte cada paciente.

En la comparación de parámetros de laboratorio entre tratamientos para cada momento temporal se ha empleado el test de Wilcoxon y en la comparación de proporciones se ha empleado el test de Fisher. Además, para comparar la evolución de cada parámetro de laboratorio entre los dos grupos de tratamiento se ha realizado un análisis de la covarianza ajustando por el valor basal, ya que la comparación entre tratamientos en el momento final no refleja la evolución llevada a cabo por el parámetro analítico.

En cuanto al tratamiento estadístico de las puntuaciones del cuestionario de satisfacción SF-36, el análisis se ha realizado empleando el algoritmo adaptado por Alonso (Alonso et al., 1995).

5.7 Aspectos éticos y de buena práctica clínica

El ensayo clínico fue planteado y ejecutado siguiendo escrupulosamente las directrices plasmadas en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial sobre Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. Adoptada por la 18a Asamblea Médica Mundial, Helsinki, Finlandia, junio 1964, y sus posteriores enmiendas (Mundial, A. M. (2009). Declaración de Helsinki. Relaciones Internacionales).

Tras cuidadosa comparación de los riesgos calculados con los beneficios previsibles se obtuvo aprobación del Comité de Ética de Investigación Clínica del Hospital Universitario de Son Dureta y del Comité de Ética de Investigación Clínica de la Conselleria de Salut I Consum de les Illes Balears. Igualmente se obtuvo la aprobación de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) al que se remitió informe final detallado. Al no contar con una terapia probada y existente, por razones metodológicas y científicas, el uso de placebo era necesario para determinar la eficacia y la seguridad del método terapéutico, que además no implicó un riesgo adicional, efectos adversos graves o daño irreversible para los pacientes que lo recibieron.

El proyecto y el método de todo el procedimiento experimental del estudio fue publicado antes de iniciar la intervención (Rullan et al., 2003).

Fueron reclutadas personas legalmente capaces, y los participantes voluntarios recibieron informaciones adecuadas acerca de los objetivos, métodos, fuentes de financiación, posibles conflictos de intereses, afiliaciones institucionales del

investigador, beneficios calculados, riesgos previsibles e incomodidades derivadas del experimento.

Fueron debidamente informados del derecho de participar o no en la investigación y de retirar su consentimiento en cualquier momento, sin exponerse a represalias.

Después de asegurarse de que el individuo comprendió la información se obtuvo, por escrito, el consentimiento informado y voluntario de la persona.

En la publicación se citan la fuente de financiación, afiliaciones institucionales y se excluye cualquier posible conflicto de intereses.

Siguiendo las mismas directrices el investigador se obliga a mantener la exactitud de los resultados y a publicarlos en su totalidad, tanto los resultados negativos como los positivos, que deben estar a la disposición del público, lo cual motiva esta tesis.

6. RESULTADOS

Del estudio que sostenta esta tesis derivaron las siguientes publicaciones, todas ellas en revistas recogidas en la *Web of Science*:

- Rullan M, Cerdà L, Frontera G, Llobera J. [Diabetic foot ulcers and treatment with low molecular weight heparin]. Med Clin (Barc). 2002 May 25; 118(19):757.
- Rullan M, Cerda L, Frontera G, Llobera J, Masmiquel L, Olea JL. [Triple-blind clinical trial with placebo control to evaluate the efficacy of a heparin of low molecular weight (bemiparin) for treating slow-responding ulcers in diabetic foot in primary care]. Aten Primaria. 2003 May 15; 31(8):539-44.
- Rullan M, Cerda L, Frontera G, Masmiquel L, Llobera J. Treatment of chronic diabetic foot ulcers with bemiparin: a randomized, triple-blind, placebo-controlled, clinical trial. Diabet Med. 2008 Sep; 25(9):1090-5.

Documento descargado de http://www.elsevierinsituciones.com el 13/06/2011. Copia para uso personal, se prohíbe la transmisión de este documento por cualquier medio o formato.

Localizador web
Artículo 42.845

Úlceras del pie diabético y tratamiento con heparinas de bajo peso molecular

Sr. Editor: Las úlceras del pie diabético se caracterizan por su rápida progresión, difícil control y lenta resolución, y en el 14-24% de los casos acaban en amputación[1]. Una vez establecido el problema, el control de factores agravantes, la resección quirúrgica y la recuperación de la función mediante una ortesis son, por el momento, las soluciones disponibles. Describimos a continuación la evolución de las úlceras de pie diabético de 6 pacientes tras la instauración de tratamiento profiláctico con heparinas de bajo peso molecular (HBPM).

Seis pacientes diabéticos presentaban úlceras crónicas en los pies sin criterios clínicos de infección local, de evolución tórpida. Todos iniciaron tratamiento con HBPM por riesgo de trombosis venosa profunda, debido a encamamiento en presencia de otros factores (tabla 1). En el transcurso del tratamiento algunos pacientes manifestaron mejoría de los síntomas locales de la úlcera y pudo observarse una evolución favorable en el aspecto de la lesión. Al cesar la situación de riesgo y recuperar la deambulación, se decidió continuar administrando 2.000 U de HBPM en dosis única diaria a todos los pacientes. No varió el protocolo de actuación en cuanto a curas de enfermería (limpieza con agua y jabón, retirada quirúrgica de esfacelos y material necrótico cuando los hubiere, oclusión no compresiva), protección de la carga sobre la lesión y antibioterapia oral en caso de aparecer dos o más signos de infección. En la tabla 1 se describen las características de los pacientes y la evolución de la úlcera. El tratamiento se suspendió al completarse la epitelización. En ningún caso presentaron efectos adversos propios del tratamiento con heparinas.

Estas observaciones apuntan a que la administración de HBPM favorece la curación de las úlceras del pie diabético. La mayoría de los autores que han estudiado el comportamiento del endotelio vascular sometido a hiperglucemia mantenida coinciden en constatar una disminución inicial de proteoglicanos (heparansulfato)[3], seguida de un incremento del colágeno tipo IV, lo que lleva a un engrosamiento de la membrana basal, aparición de áreas de endotelio acelulares y disfunción endotelial[4]. Algunas hipótesis que intentan explicar estos hechos son la disminución de la actividad de la N-deacetilasa, enzima clave en la biosíntesis del heparansulfato, debida a la glucación no enzimática de las proteínas de la membrana basal, y/o el consumo excesivo de heparansulfato en un medio procoagulante propiciado por las alteraciones endoteliales.

En animales de experimentación diabéticos, se ha evidenciado el retroceso de algunas de las alteraciones de las membranas basales en tratamiento con HBPM[5] y con heparinoides[3].

En humanos, el efecto favorable de la HBPM en el flujo capilar periulceroso del pie diabético fue observado por Jörneskog et al[6] en 1993; también se ha comunicado el efecto de las HBPM en la nefropatía diabética con resultados esperanzadores[7]. Un estudio piloto encontró reducción del número de exudados duros en la retina de pacientes diabéticos tras tratamiento con heparinoides[8].

Si bien no ha sido posible demostrar que todos los pacientes diabéticos con úlceras en los pies tengan elevación de las resistencias periféricas u oclusiones capilares, sí se ha podido observar que existen defectos de perfusión microcapilar en las extremidades inferiores de pacientes diabéticos sin clínica de vasculopatía periférica[9].

El hipotético efecto de la HBPM en la evolución de la úlcera podría ser explicado por la inhibición de factores activados por el contacto con el colágeno endotelial o bien por la estimulación de la síntesis del heparansulfato[3,10].

Manuel Rullán[a], *Llúcia Cerdà*[b], *Guillem Frontera*[c] *y Joan Llobera*[d]

[a]Médico de atención primaria. Centro de Salud de Pollença [b]Enfermera. Centro de Salud de Pollença. [c]Unidad de Farmacología Clínica de Atención Primaria. [d]Epidemiólogo clínico. Unidad de Apoyo a la Investigación Primaria. Mallorca.

1. Consensus Development Conference on Diabetic Foot Wound Care. Diabetes Care 1999;22:1354-60.
2. Wagner FW. The dysvascular foot. A system of diagnosis and treatment. Foot Ankle 1981;2:64-122.
3. Gambaro G, Venturini AP, Noonan DM. Treatment with a glycosaminoglycan formulation ameliorates experimental diabetic nephropathy. Kidney Int 1994;46:797-806.
4. Lorenzi M, Cagliero E. Pathobiology of endothelial and other vascular cells in diabetes mellitus. Diabetes 1991;40:653-9.
5. Oturai PS, Rasch R, Johansen P. Low doses heparin treatment prevents glomerular basement membrane thickening in diabetic rats. Diabetologia 1994;37(Suppl 1):14.
6. Jörneskog G, Brismar K, Fagrell B. Low molecular weight heparin seems to improve local capillary circulation and healing of chronic foot ulcers in diabetic patients. Vasa 1993;22:137-42.
7. Myrup B, Haensen M, Kofoed-Enevoldsen A, Feldt-Rasmussen B, Gram J, Kluft C, et al. Effect of low-dose heparin on urinary albumin excretion in insulin-dependent diabetes mellitus. Lancet 1995;345:421-2.
8. Van der Pijl JW, Van der Woude FJ, Swart W, Van Es LA, Lemkes HHPJ. Effect of danaparoid sodium on hard exudates in diabetic rethinopathy. Lancet 1997;350:1743-5.
9. Cosson E, Paycha F, Tellier P, Sachs RN, Ramadan A, Pariés J, et al. Defects of blood perfusion of the lower limbs may be due to microvascular disorders in diabetic patients. Diabetologia 2000; 43 (Suppl 1):274A.
10. Nader HB, Buonassisi V, Colbrun P, Dietrich CP. Heparin stimulates the synthesis and modifies the sulfatation pattern of heparan sulfate proteoglycan from endothelial cells. J Cell Physiol 1989;140:305-10.

TABLA 1

Características de los pacientes

Sexo y edad (años)	Tiempo de la evolución DM (años)	Tipo de DM/tratamiento	Enfermedad asociada	Localización de la úlcera/tiempo de evolución previo al tratamiento con HBPM	Tiempo de cierre de la úlcera (meses)	Evolución
Mujer, 84	29	Tipo I/ insulina	Insuficiencia cardíaca, neuropatía, arteriopatía programada para amputación supracondílea	Úlcera crónica 5.º metatarsiano (extraído), grado III/14 meses evolución	3	Sin amputación ni recidivas Fallece a los 2 años por insuficiencia cardíaca
Mujer, 85	25	Tipo II/dieta	Fibrilación auricular, obesidad, antecedentes de trombosis venosa	Úlcera crónica talón derecho, grado II/ 5 años evolución	4	Sin recidivas tras 2 años
Mujer, 88	20	Tipo II/dieta	Demencia, encamamiento, amputación supracondílea izquierda	Úlcera crónica talón derecho, grado II/ 1 año evolución	1	Sin recidivas tras 2 años
Varón, 69	19	Tipo I/ insulina	Enfermedad cerebrovascular, cardiopatía isquémica, amputación pierna derecha, amputación dedo 5 pie izquierdo	Úlcera pie izquierdo, grado II/1 año de evolución	1,5	Sin recidiva tras 2 años
Varón, 71	20	Tipo I/ insulina	Fibrilación auricular, revascularización coronaria, marcapasos definitivo	Úlceras crónicas, 2 en cada pie, grado I/ 45 días evolución	1	Sin recidivas tras 18 meses
Varón, 84	21	Tipo II/ADO	Insuficiencia cardíaca	2 úlceras plantares, grado II/5 meses	2	Sin recidiva tras 6 meses

DM: diabetes mellitus; ADO: antidiabéticos orales; HBPM: heparina de bajo peso molecular.
Grados de la úlcera según clasificación de Wagner[2].

Localizador web
Artículo 42.846

Genotipado de la interleucina 1 en el enjuague bucal de sujetos con enfermedad periodontal

Sr. Editor: La enfermedad periodontal es un conjunto de procesos inflamatorios crónicos producidos pora una infección bacteriana que se asocia, habitualmente, a factores indepen-

Localizador web
Artículo 52.480

Ensayo clínico, controlado con placebo, triple ciego, para evaluar la eficacia de una heparina de bajo peso molecular (bemiparina) en el tratamiento de las úlceras tórpidas del pie diabético, en atención primaria

M. Rullán[a], L. Cerdà[b], G. Frontera[c], J. Llobera[d], L. Masmiquel[e] y J.L. Olea[f]

Objetivos. Establecer el grado de eficacia del tratamiento con bemiparina durante 3 meses en la mejoría de las úlceras tórpidas del pie diabético. Secundariamente se evalúa la seguridad de la bemiparina, la calidad de vida y se compara la evolución de la retinopatía y nefropatía frente a placebo.
Diseño. Ensayo clínico fase III de evaluación de eficacia y seguridad en una nueva indicación de un fármaco ya comercializado, paralelo de dos grupos, aleatorizado, triple ciego y controlado con placebo.
Emplazamiento. Centros de atención primaria de Mallorca (España).
Participantes. Un total de 42 pacientes por grupo, mayores de 18 años, con diabetes mellitus (DM) tipo 1 o 2, de más de 3 años de evolución, y una o más úlceras de grado 1 y 2 de la clasificación de Wagner, distal a la rodilla, que no ha curado en 3 meses de atención sanitaria. Asignación aleatoria por bloques de cuatro.
Intervenciones. El fármaco experimental es la bemiparina (heparina de bajo peso molecular), en inyección subcutánea, 3.500 U/día los 10 primeros días y 2.500 U/día hasta los 90 días. Como fármaco de control se utilizó suero fisiológico en inyección subcutánea en volumen similar para su enmascaramiento.
Mediciones principales. Se define como «efecto» una reducción en, al menos, un 50% en el área de su superficie y/o variación favorable del estadio en un grado entre el control al iniciar el tratamiento y a los 3 meses. Otras mediciones incluyen proteinuria, retinografías y calidad de vida (SF-36). Se llevó a cabo un análisis de eficacia por principio de intención de tratar.

Palabras clave: Angiopatía diabética. Pie diabético. Heparina bajo peso molecular. Eficacia. Ensayo clínico. Atención primaria.

TRIPLE-BLIND CLINICAL TRIAL WITH PLACEBO CONTROL TO EVALUATE THE EFFICACY OF A HEPARIN OF LOW MOLECULAR WEIGHT (BEMIPARIN) FOR TREATING SLOW-RESPONDING ULCERS IN DIABETIC FOOT IN PRIMARY CARE

Objectives. To establish the degree of efficacy of bemiparin treatment over 3 months in the improvement of slow-responding ulcers in diabetic foot. Also, to evaluate the safety of bemiparin and quality of life and to compare the evolution of retinopathy and nephropathy against placebo.
Design. Stage III clinical trial to evaluate efficacy and safety in a new indication of a medicine already on the market, parallel in two branches, randomised, triple-blind, and controlled with placebo.
Setting. Health care centres in Mallorca, Spain.
Participants. 42 patients per branch, over 18, with type-1 or 2 DM of over 3 years evolution, and one or more first or second-degree ulcers on the Wagner scale, distal to the knee, that did not heal in three months of health care. Randomised allocation in blocks of four.
Interventions. The experimental drug was bemiparin (heparin of low molecular weight), injected subcutaneously at 3500 IU/day for the first 10 days and 2500 IU/day up to 90 days. As control, physiological serum was injected sub-cutaneously in a similar volume for masking.
Main measurements. An «effect» was defined as a reduction of at least 50% in its surface area and/or a favourable evolution in status to a degree between the control at the start of treatment and at three months. Other measurements included proteinuria, retinography and quality of life (SF-36). Analysis of efficacy through principle of intention to treat.

Key words: Diabetic angiopathy. Diabetic foot. Low-molecular-weight heparin. Efficacy. Clinical trial. Primary health care.

[a]Médico de Atención Primaria. Centro de Salud de Pollença. Mallorca. España.

[b]Enfermera. Centro de Salud de Pollença. Mallorca. España.

[c]Farmacólogo Clínico. Unidad de Farmacología Clínica de Atención Primaria. Mallorca. España.

[d]Doctor. Medicina Preventiva y Salud Pública. Unidad de Investigación Atención Primaria. Mallorca. España.

[e]Endocrinólogo. Doctor. Hospital Son Llàtzer. Mallorca. España.

[f]Oftalmólogo. Doctor. Hospital Son Dureta. Mallorca. España.

Correspondencia:
Manel Rullán García.
Unidad de Investigación de Atención Primaria de Mallorca.
Reina Esclaramunda, 9.
07003 Palma de Mallorca.
España.
Correo electrónico:
mrullang@hotmail.com

El promotor es la Gerencia de Atención Primaria de Mallorca *(ib-salut)*. Laboratorios Farmacéuticos ROVI S.A. provee la medicación enmascarada, el seguro de responsabilidad civil y compensa al promotor en cuanto a los costes de sustitución del médico investigador y la enfermera del proyecto, los cuales no reciben remuneraciones directas de ningún tipo por parte del laboratorio. El proyecto está cofinanciado por el FIS, expediente PI: 021704.

El protocolo ha sido aprobado por la Agencia Española del Medicamento y por el CEIC de Balears.

Manuscrito recibido el 9 de abril de 2002.

Manuscrito aceptado para su publicación el 18 de noviembre de 2002.

Introducción

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica que cursa con una lenta degeneración del sistema vascular. Una de sus complicaciones es el pie diabético, y la isquemia, un factor etiopatogénico esencial. La glucación no enzimática de proteínas de la membrana basal endotelial altera, entre otras funciones, la síntesis de heparán sulfato[1], notable activador endógeno de la antitrombina III, que parece desempeñar un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis y la función endotelial[2], responsable, al menos en parte, de la angiopatía y de las úlceras del pie diabético.
Es característica la mala evolución de la lesión[3]. Un tercio de los pacientes será amputado al cabo de 3 años[4]. La heparina estimula la síntesis de heparán sulfato en cultivos de células endoteliales[5]. Su efecto en la angiopatía diabética ha sido estudiado en animales de experimentación y se han evidenciado cambios positivos en la membrana basal endotelial[6,7]. En humanos se ha observado una disminución del número de exudados duros en pacientes diabéticos con retinopatía[8] y una disminución de la proteinuria[9]. Diversos autores han estudiado el efecto en el pie diabético, con resultados controvertidos[10,11].
Los pacientes con úlcera diabética, excepto cuando se complican, siguen al cuidado del equipo de atención primaria. Las observaciones realizadas previamente por los investigadores[12], la escasa pero existente bibliografía y el excelente perfil de seguridad de las heparinas de bajo peso molecular (HBPM) nos animan a realizar esta investigación con la intención de mejorar la evolución de las úlceras, disminuir la incidencia de sus terribles consecuencias, aumentar la calidad de vida del paciente y, eventualmente, reducir los costes sociales y sanitarios de este problema de salud.

Objetivos

Principal
Establecer el grado de eficacia del tratamiento con una HBPM (bemiparina) durante 3 meses, en la mejoría de las úlceras tórpidas del pie diabético.

Secundarios
Comparar los dos grupos de tratamiento en cuanto a:

– Evolución de la proteinuria.
– Evolución de los exudados duros, microhemorragias y microaneurismas de la retinopatía diabética.
– Incidencia de amputaciones.
– Evolución de la calidad de vida.
– Seguridad del tratamiento.

Método

Diseño
Ensayo clínico fase III de evaluación de eficacia y seguridad en una nueva indicación de un fármaco ya comercializado, paralelo de dos grupos, aleatorizado, triple ciego y controlado con placebo.

Emplazamiento
Los pacientes fueron captados en los 39 centros de salud de Mallorca, lo que supone un denominador poblacional de 547.000 personas mayores de 18 años. Las visitas se realizaron en los centros de atención primaria o en el domicilio del paciente. Al inicio y final del tratamiento se realizaron controles hospitalarios (analíticas, retinografías, etc.).

Criterios de inclusión/exclusión
Los criterios de inclusión y exclusión de pacientes en el estudio se exponen en la tabla 1.

Selección de sujetos
Los sujetos fueron reclutados a partir de los equipos de atención primaria, previa solicitud de notificación de los casos conocidos en cada cupo, que fueron incluibles *a priori*. Posteriormente, se confirmó el cumplimiento de los criterios de inclusión/exclusión y se procedió a la firma del consentimiento informado.

Cálculo del tamaño muestral
No se ha hallado bibliografía sobre la evolución, en un plazo de 3 meses, de las úlceras tórpidas en el pie diabético. Existen datos sobre la evolución hacia la amputación. Tampoco existen datos publicados sobre la eficacia de las HBPM en este tipo de lesiones. A pesar de ello, se plantea la hipótesis como unilateral de eficacia a partir de dos argumentos: los resultados preliminares de un ensayo similar que se está llevando a cabo en el Karolinska Institute (Suecia), y de la información preliminar de pacientes diabéticos con úlceras tórpidas que fueron tratados con HBPM como profilaxis de trombosis venosa profunda, por miembros del grupo investigador, que revelaron resultados esperanzadores en la mayoría de los pacientes[12].
Aunque no pueden sentarse las bases de una hipótesis cuantificada de eficacia, se ha optado por plantear un ensayo suficiente para evidenciar eficacia cuando la diferencia de efecto en el grupo tratado obtenga respuestas favorables en un 30% más de pacientes que en el grupo control, para la situación de máxima indeterminación ($P_{intervención}$ = 0,65; $P_{control}$ = 0,35), asumiendo un error tipo I del 0,05 y error tipo II del 0,2. Bajo este supuesto, el número de sujetos por grupo se ha calculado en 34, que se ha aumentado hasta 42 pacientes en previsión de un 20% de pérdidas. Por tanto, se requiere en total 84 pacientes.

TABLA 1 Criterios de selección de los participantes

Criterios de inclusión
1. Estar diagnosticado de diabetes mellitus tipo 1 o 2, de más de 3 años de evolución (según criterio de ADA 1997)
2. Presentar una úlcera cutánea de grado s 1 y 2 según la clasificación de Wagner, distal a la rodilla, que no ha curado en 3 meses de atención sanitaria convencional
3. Pacientes > 18 años que hayan aceptado otorgar su consentimiento informado para participar en el estudio
Criterios de exclusión
1. Pacientes con hipersensibilidad conocida a la heparina o sustancias de origen porcino
2. Peso < 35 kg. Pacientes con una úlcera cutánea de grados 3, 4 o 5 según la clasificación de Wagner
3. Pacientes con antecedentes de enfermedades trombofílicas. Pacientes con diátesis hemorrágica congénita o adquirida, prolongación de TTP o TP por encima del 20% respecto a los valores normales
4. Pacientes con úlcera gastrointestinal activa o con antecedentes de episodios hemorrágicos clínicamente evidentes o cirugía mayor en el último mes
5. Pacientes que reciban tratamiento anticoagulante
6. Pacientes con trombocitopenia (recuento de plaquetas < 100.000/µl).
7. Pacientes con enfermedades renales, hepáticas, gastrointestinales o endocrinas, clínicamente relevantes o incontroladas, o pacientes con otras enfermedades graves concurrentes
8. Pacientes con hipertensión no controlada (PAS > 200 mmHg; PAD > 100 mmHg)
9. Pacientes con endocarditis séptica
10. Pacientes con retinopatía proliferativa con riesgo hemorrágico
11. Pacientes embarazadas, lactantes o fértiles que no estén tomando las precauciones anticonceptivas adecuadas
12. Pacientes con neoplasias activas, con una expectativa de vida < 3 meses o incapacidad para cumplir el tratamiento y seguimiento del estudio

Tras la exploración preliminar en cuatro centros de salud con 52.000 habitantes mayores de 18 años, había 24 casos de DM diagnosticados con úlceras, lo que supone una prevalencia conocida de aproximadamente 46/100.000 mayores de 18 años, de los que al menos dos tercios cumplen criterios de inclusión y si la mitad de ellos acepta participar, se estima que en la isla de Mallorca, en un año podrá haberse completado la inclusión.

Formación de los grupos

Una vez comprobado que los pacientes cumplen los criterios de inclusión y no los de exclusión, y han firmado el consentimiento informado, el paciente es asignado al grupo experimental o al grupo control de forma aleatoria y equiprobable. Se genera informáticamente, mediante números seudoaleatorios, siguiendo un sistema de bloques de tamaño cuatro. Este método garantiza la heterogeneidad de tratamiento administrado en grupos consecutivos de pacientes, asegurando que en un intervalo corto exista similar número de pacientes en ambos grupos.

Intervenciones

– Fármaco experimental: bemiparina, administrado en inyección subcutánea, a una dosis inicial de 3.500 U/día durante 10 días. La dosis de mantenimiento fue de 2.500 U/día durante 80 días.

– Fármaco control: suero fisiológico, administrado en inyección subcutánea en volumen necesario para su enmascaramiento.

Las úlceras reciben los cuidados estandarizados, supervisados por la enfermera del estudio, basados en recomendaciones extraídas de consenso de expertos: limpieza con agua y jabón neutro, retirada de esfacelos y material necrótico si lo hubiere, hidratación con suero fisiológico y oclusión simple no compresiva con gasa.

Si la úlcera presenta signos de infección según los criterios expuestos en el protocolo de curas (dos o más signos de rubor, calor, dolor, edema, exudación y pérdida de la función) se trata con antibióticos sistémicos.

Seguimiento de los sujetos

El tratamiento duró 3 meses y se realizó seguimiento hasta completar el año. Los controles y determinaciones en cada uno de ellos se exponen en la tabla 2. Todo el trabajo de campo (captación, seguimientos, extracciones, controles, etc.), fue realizado por el investigador principal y la enfermera, con el apoyo de la secretaría de estudio. Un monitor externo, contratado por Laboratorios Farmacéuticos Rovi S.A., llevó a cabo la supervisión de la realización del estudio.

Definiciones de las variables principales y métodos de medida

La variable principal de efecto fue la úlcera. Se midió el área a partir de una fotografía digital, calculada por método computarizado; el estadio fue valorado por el equipo investigador. En el caso de presentar más de una úlcera, se eligió la de mayor tamaño o estadio más grave.

TABLA 2 Desarrollo del estudio

N.º visita	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Día	0	1	10	25	40	55	70	85	175	265	365
Verificación de los criterios de inclusión/exclusión	X		X								
Firma del consentimiento informado	X										
Extracción de muestras analíticas	X		X					X			
Recolección de albuminurias	X							X			
Interconsulta con oftalmología	X							X			
Interconsulta con radiología	X										
Estabilización del tratamiento médico/control medicación concomitante	X	X	X	X	X	X	X	X			
Fotografía úlcera/s		X						X			
Estadio de la úlcera/amputaciones		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Verificación de curas y calzado		X	X	X	X	X	X	X			
Entrega de medicación		X									
Recogida de envases medicación								X			
Recogida de efectos adversos			X	X	X	X	X	X	X	X	X
Medición de escala calidad de vida (SF-36)		X						X			X

Definimos como «efecto» (parámetro de valoración), respecto a la evolución favorable de la úlcera, una reducción en, al menos, un 50% en el área de su superficie y/o una variación favorable del estadio en un grado entre el control al iniciar el tratamiento y la valoración final a los 3 meses.

En la tabla 3 se presentan las variables, definiciones, escalas de clasificación y momento en los que se valoraron. Las retinografías se realizaron en el hospital de referencia. Los marcadores plasmáticos se midieron en la unidad de investigación en diabetes del Hospital Vall d'Hebron (Universidad Autónoma de Barcelona).

Se ha elaborado y pilotado un cuaderno de recogida de datos (CRD) que servió de base para la mecanización de datos con un programa de minimización de errores, con doble introducción de las variables centrales del estudio, identificación y modificación de discrepancias.

TABLA 3 Variables y escalas de medida

	Variable	Unidad de medida	Método de medición	Intervalo de medición
Principal	Área de la úlcera	mm^2	Fotografía digital	Inicio y final del tratamiento
	Estadio de la úlcera	Escala de Wagner*	Sondaje con hisopo estéril	Inicio y final del tratamiento
Secundarias	Albuminuria	mg/dl	Media aritmética de albuminuria de 3 orinas nocturnas consecutivas	Inicio y final del período de tratamiento
	Marcadores plasmáticos**		Análisis de suero congelado	Inicio y final del período de tratamiento
	Exudados duros microhemorragias, microaneurismas	Recuento simple	Retinografía de fundus, 7 campos	Inicio y final del periodo de tratamiento
	Incidencia de amputaciones			Inicio y final del período de tratamiento y al año
	Calidad de vida	Escala SF-36 v.e.	Autoadministración	Inicio y final del período de tratamiento
	Efectos adversos	Hemograma, comunicación espontánea, efectos indeseables	Laboratorio	Inicio, 10 días, final período tratamiento

*Escala de Wagner: grado 0, úlcera cicatrizada; grado 1, úlcera superficial (dérmico-epidérmica); grado 2, úlcera profunda (alcanza cápsula); grado 3: artritis, osteítis; grado 4: gangrena menor, localizada en antepié; grado 5: gangrena extendida a mayor parte del pie. **Marcadores plasmáticos: endotelina, factor von Willebrand, trombomodulina, E-selectina (CD62-E), P-selectina (CD62-P), ICAM-1 (*intercelular adhesion molecule*, CD106) y VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule*, CD54), VEGF (*vascular endothelial growth factor*), HGF (*hepatocyte growth factor*), IGF-1 (*insuline-like growth factor*).

Estrategia de análisis

El estadístico desconoce la asignación de tratamientos. El análisis se llevó a cabo en la Unidad de Investigación de Atención Primaria de Mallorca.

Tras finalizar la asignación se comprobó si, a pesar de utilizar un sistema de asignación aleatoria compensada, existía homogeneidad de los dos grupos para las variables personales, tipo y tiempo de evolución de la diabetes y los valores basales de las variables de estudio (tamaño inicial de las úlceras y estadio, albuminuria, retinopatía, SF-36).

Se llevó un primer análisis crudo, por diferencia de proporciones en la variable principal de efecto y cálculo de eficacia mediante 1-RR con sus respectivos intervalos de confianza del 95%.

Se efectuó un análisis estratificado ajustado por cada variable independiente. Al aparecer diferencias entre el RR crudo y RR ajustado, se valoró la homogeneidad entre categorías para establecer si la variable es modificadora del efecto o confusora. Se estableció la probabilidad de respuesta por un modelo de regresión logística de las variables predictoras.

El análisis de los datos se realizará por intención de tratar. Los objetivos secundarios se analizarán comparando proporciones entre grupos de tratamiento.

Se realizará la descripción de los efectos adversos recogidos en ambos grupos.

Discusión

Limitaciones del diseño

Es posible que se produzcan más abandonos (se trata de una administración diaria por vía subcutánea) en caso de evolución desfavorable de las úlceras. El análisis por intención de tratar intenta compensar este sesgo y, en todo caso, favorecer la hipótesis nula.

El seguimiento con controles cada 2 semanas mientras dura el tratamiento pretende homogeneizar los cuidados de la úlcera, mejorar el cumplimiento y aumentar las posibilidades de detectar efectos adversos de la medicación. Ello confiere mayor control del desarrollo del estudio y evita sobrecarga asistencial.

Aunque la posibilidad de efectos locales en el lugar de inyección de estas heparinas, administradas adecuadamente, es mínima, pueden provocar una pérdida de enmascaramiento en casos contados.

Respecto a la calidad de vida, se ha optado por una medida genérica y bien conocida (SF-36), ya que no se ha hallado un cuestionario específico para el problema del pie diabético.

Respecto al calendario del estudio, 9 visitas en 3 meses, puede superar el tratamiento «habitual» de estos enfermos y afectar a la validez externa para garantizar la máxima validez interna.

Respecto de la duración del tratamiento, no hay suficientes elementos para determinar si 3 meses es el período suficiente, pero parece el adecuado para establecer efecto. Sería discutible, desde el punto de vista ético, ampliar el período de tratamiento sin datos del efecto de las HBPM en estas úlceras.

No se dispone de datos que nos permitan cuantificar de forma contrastada la hipótesis establecida, lo que provoca la incertidumbre en cuanto a que el tamaño de muestra sea suficiente para detectar un efecto en caso de haberlo. De producirse una falta de potencia con la muestra prevista, si observamos una tendencia clara, clínicamente relevante hacia la eficacia de la intervención, se propondrían estudios con mayor tamaño de muestra.

Aplicabilidad práctica

La diabetes afecta al 6-8% de la población española. Sus complicaciones crónicas son conocidas y afectan en mayor o menor grado a todos los pacientes. De demostrarse eficacia en el tratamiento de úlceras del pie diabético, con una relación beneficio/riesgo aceptable, podrían evitarse parcialmente al paciente las consecuencias de las mismas, que tanto afectan a la calidad de vida y que evolucionan a menudo hacia la amputación, con los consiguientes costes personales, sanitarios y sociales. Los objetivos secundarios son igualmente importantes en lo referente a la retinopatía y nefropatía diabética. Es una línea de investigación que puede ofrecer alternativas a los enfoques terapéuticos actuales.

Se trata de un ensayo surgido de los profesionales de primaria que diseñan un proyecto en coordinación con profesionales de especializada, promovido por la GAP.

Bibliografía

1. Van Det N, Van der Born J, Tamsma J, Verhagen N, Berden J, Bruijn J, et al. Effects of high glucose on the production of heparan sulfate proteoglycan by mesangial and epithelial cells. Kidney Int 1996;49:1079-89.
2. Masmiquel Ll, Burgos R, Simó R. Membrana basal y diabetes mellitus. Med Clin (Barc)1997;109:302-10.
3. Ibañez V. Estudio de prevalencia de la enfermedad vascular periférica en una población diabética no insulina dependiente. Angiología 1993;2:68-78.
4. Moss SC, Klein R, Klein B. The prevalence and incidence of lower extremity amputation in diabetic population. Arch Intern Med 1992;152:610-6.
5. Nader HB, Buonassisi V, Colbrun P, Dietrich CP. Heparin stimulates the synthesis and modifies the sulfatacion pattern of hepararan sulfate proteoglycan from endothelial cells. J Cell Physiol 1989;140:305-10.
6. Outrai PS, Rasch R, Johansen P. Low doses heparin treatment prevents glomerular basement membrane thickening in diabetic rats. Diabetologia 1994;37(Suppl 1):14.

7. Gambaro G, Venturini AP, NoonanDM. Treatment with a glycosaminoglycan formulation ameliorates experimental diabetic nephropaty. Kidney Int 1994;46:797-806.
8. Van der Pijl JW, van der Woude FJ, Swart W, van Es LA, Lemkes HPJ. Effect of Danaparoid sodium on hard exudates in diabetic rethinophaty. Lancet 1997;350:1743-5.
9. Myrup B, Hansen PM, Jensen T, Kofoed-Enevolsen A, Feld-Rasmusen B, Gram J, et al. Effect of low-dose heparin on urinary albumin excretion in insulin-dependent diabetes mellitus. Lancet 1995;345:421-2.
10. Jörneskog G, Brismar K, Fagrell B. Low molecular weight heparin seems to improve local capillary circulation and healing of chronic foot ulcer in diabetic patients. Vasa 1993;2:137-42.
11. Garbaruchuk OI, Malyzev VO. The effect of heparin on the functioning of the hemostasis system in patient with insulin-dependent diabetes mellitus in severe forms of diabetic foot. Ukr biokhim Zh 1998;70:111-6.
12. Rullan M, Cerdà L, Frontera G, Llobera J. Úlceras del pie diabético y tratamiento con heparinas de bajo peso molecular. Med Clin (Barc) 2002;118:757.

DIABETICMedicine

DOI: 10.1111/j.1464-5491.2008.02527.x

Original Article: Complications

Treatment of chronic diabetic foot ulcers with bemiparin: a randomized, triple-blind, placebo-controlled, clinical trial

M. Rullan, L. Cerdà, G. Frontera*, L. Masmiquel† and J. Llobera*

Pollença Primary Care Centre, Ib-Salut, *Health Science Research University Institute (IUNICS), Illes Balears University, and Primary Care Research Unit and †Endocrinology Unit, Hospital Son Llàtzer Foundation, Son Ferriol, Mallorca, Spain

Accepted 12 June 2008

Abstract

Aims To assess the efficacy and safety of bemiparin in the treatment of chronic diabetic foot ulcers.

Methods A triple-blind, parallel, randomized, placebo-controlled trial. Patients aged > 8 years, with diabetes for at least 3 years, and with a foot ulcer persisting for > 3 months were selected from 39 Spanish centres. Bemiparin 3500 IU/day for 10 days, followed by 2500 IU/day for up to 3 months plus standard care for ulcers, was compared with placebo plus standard care for ulcers for 3 months. The primary efficacy end-point was ulcer improvement, defined as an objective decrease in ulcer area of ≥ 50%, measured by digital photography and ImageJ software, and/or any decrease in Wagner's ulcer grade at 3 months.

Results Ulcer improvement rates were 70.3% (26 of 37 patients) in the bemiparin group and 45.5% (15 of 33 patients) in the placebo group [absolute difference 24.8; 95% confidence interval (CI) 2.3, 47.3; $P = 0.035$] (number needed to treat 4; 95% CI 2, 43). Complete healing rates at 3 months were similar in both groups (35.1% vs. 33.3%; $P = 0.874$), as were the number of adverse events.

Conclusions Bemiparin is more effective than placebo in the management of diabetic foot ulcers and has few side-effects.

Diabet. Med. 25, 1090–1095 (2008)

Keywords bemiparin, diabetes, diabetic angiopathy, foot ulcer, heparin

Abbreviations ABI, ankle-brachial index; CI, confidence interval; CVI, chronic venous insufficiency; HRQL, health-related quality of life; LMWH, low-molecular-weight heparin; NNT, number needed to treat; PAD, peripheral arterial disease

Introduction

Diabetic foot ulcer, generally appearing as a perforating ulcer on the plantar aspect of the foot (*mal perforans*), is one of the most common causes of hospital admission and is a frequent precursor to amputation, resulting in major economic consequences and in a reduction in health-related quality of life [1–3].

Recognized risk factors for diabetic foot ulcer are neuropathy, ischaemia due to peripheral arterial disease, and local trauma or Charcot foot deformity [4]. Combined factors altering vessels, endothelium [5], platelet function [6] and coagulation/fibrinolysis [7,8] in diabetic patients may promote micro-thrombosis in small vessels, thereby favouring local necrosis and ulceration.

Established treatment modalities for diabetic foot ulcers include adequate off-loading, debridement, local dressings and control of infection [9]. New technologies, such as the use of growth factors for the topical treatment of diabetic foot ulcers, offer modest benefit if used with established treatment modalities [9]. To date, no specific systemic treatment for diabetic ulcer is available.

Heparins have beneficial effects on local tissue micro-circulation and oxygenation through the inhibition of thrombin generation and the improvement of fibrin gel porosity, which favours fibrinolytic function [10], and therefore might be useful in diabetic foot ulcers. Beyond its main antithrombotic

Correspondence to: M. Rullan, Pollença Primary Care Centre, C/Bisbe Desbach s/n, 07460 Pollença, Mallorca (Spain). E-mail: mrullan@ibsalut.caib.es

© 2008 The Authors.
Journal compilation © 2008 Diabetes UK.

effect, heparin also has positive effects *in vitro*, including promotion of the synthesis of heparin sulphate in endothelial cell cultures [11] and the proliferation of fibroblasts obtained from diabetic ulcers [12], preventing damage to the endothelial basement membrane [13] as well as improving the structure and number of capillaries [14]. A previous report has suggested that low-molecular-weight heparin (LMWH) might improve the outcome of chronic foot ulcers in diabetic patients with peripheral arterial occlusive disease [15]. Additionally, prophylactic treatment for venous thromboembolism with heparin appeared to be beneficial in six diabetic patients with chronic foot ulcers [16].

We thus explored the effects of bemiparin, a second-generation LMWH [17], on diabetic foot ulcers in our primary care setting.

Patients and methods

This study was designed as a prospective, multicentre, randomized, triple-blind (the treatment allocation was blinded for patients, investigators and the statistician), parallel group, controlled therapeutic trial, to explore the efficacy and safety of bemiparin vs. placebo in the treatment of chronic diabetic foot ulcers. It was conducted at 39 primary care centres in Mallorca (Spain), in compliance with the revised Declaration of Helsinki and Good Clinical Practice guidelines. The protocol was approved by the Spanish Medicines Agency and the reference Ethics Committee for primary care centres in Mallorca, and written informed consent was obtained from all patients before randomization. The study design has been reported elsewhere [18].

Consecutive eligible patients, aged > 18 years, with diabetes for at least 3 years and with a foot ulcer persisting for > 3 months, were enrolled. Patients with any of the following criteria were excluded from the study: presence of clinical signs of infection unresponsive to oral antibiotics; anticoagulant therapy at the time of inclusion; severe impairment of renal (defined as creatinine clearance < 30 ml/min) or hepatic function (defined as Child-Pugh class B or C); bleeding disorders; proliferative diabetic retinopathy at risk of bleeding; or terminal illness with a life expectancy of < 3 months. Eligible patients were randomly assigned to treatment groups, using a central computer-generated randomization scheme balanced by blocks of four numbers.

Study medications were prepared by Laboratorios Farmacéuticos Rovi, S.A. (Madrid, Spain) and packaged in boxes containing 90 pre-filled syringes of identical appearance to ensure masking, containing either 10 syringes of bemiparin 3500 IU in 0.2 ml of water for injection (a concentration of 17 500 IU/ml) plus 80 syringes of bemiparin 2500 IU in 0.2 ml of water for injection (a concentration of 12 500 IU/ml) for each patient in the experimental group, or 90 placebo pre-filled syringes (0.2 ml of isotonic saline) for each patient in the control group. Bemiparin was administered at a dose of 3500 IU/day for the first 10 days, followed by 2500 IU/day for 3 months. Placebo was also given for 3 months. All medications were administered once daily by subcutaneous injection. All patients received a standardized out-patient protocol for ulcer care [9], which consisted of debridement of necrotic tissue, if present, and wet-to-dry dressings with normal saline or hydrogels. If signs of infection developed, a course of oral antibiotics was prescribed.

The primary efficacy end-point was ulcer improvement, defined as an objective decrease in ulcer area of ≥ 50% and/or any decrease in Wagner's ulcer grade [19] at 3 months. The change in ulcer area (in mm^2) was measured by digital photographs taken at baseline and at the 3-month final visit. Two researchers, who were unaware of treatment assignment, measured the size of the ulcer using ImageJ software [20,21]. A difference in ulcer area of < 10% between the two measures was considered as 'agreement', and the final measure was the average of the two scheduled measurements. A difference in ulcer area of ≥ 10% between the two measurements was considered as 'disagreement'. In case of disagreement, a further measurement was made by a third investigator. Then, the final measure was the mean of the two closer measures. An improvement of at least one grade in Wagner's classification was defined as any change from grade II (ulcer extension to ligament, tendon, joint capsule, or deep fascia without abscess or osteomyelitis) to grade I (superficial diabetic ulcer with partial or full thickness involvement) or grade 0 (no open lesions), or any change from grade I to grade 0. Secondary efficacy end-points included any of the composite events of the primary efficacy end-point, complete healing of the ulcer, and health-related quality of life (HRQL) evaluated by the SF-36 questionnaire (Spanish validated version) [22]. The primary safety end-point was the overall incidence of bleeding and other adverse events in each group. Changes in laboratory parameters between baseline and the final visit at 3 months were also assessed.

Patients were visited nine times during the 3-month study period. In each visit, ulcer grade, signs of infection and adverse events were documented. Furthermore, at the baseline visit and final visit at 3 months a digital photograph of the ulcer was taken. Ophthalmological examinations (ophthalmoscopy and retinography) were performed before and after treatment in order to assess diabetic retinopathy. Patients were followed up for 9 months after the end of the 3-month study period by clinical examination or telephone call.

Sample size calculation was based upon our personal clinical experience in patients with chronic diabetic foot ulcers who developed unexpected improvement of their ulcers after having received thromboprophylaxis with a LMWH [16], and also on preliminary data regarding the use of LMWH in patients with diabetic foot ulcers [23]. Hypothesizing a rate of ulcer improvement up to 3 months of 65% in the experimental group and 35% in the placebo group, 34 patients were needed in each treatment group for 80% power to detect a difference at $\alpha = 0.05$. Statistical analysis was performed without unblinding the treatment arms by a Contract Research Organization. Data were analysed on an intention-to-treat basis. Rates of patients with ulcer improvement in both groups were compared by using absolute and relative risk differences with 95% confidence intervals (CI). A stratified analysis was performed for each of the components of the primary efficacy end-point. The number needed to treat (NNT) to achieve one ulcer improvement was also calculated. The effects of bemiparin treatment on ulcer improvement were also examined within subgroups defined by baseline characteristics. Continuous variables were described in terms of the mean, standard deviation (SD), median and/or

© 2008 The Authors.

range, and were compared between treatment groups by using the Wilcoxon rank sum test or rank ANCOVA for baseline adjustment. χ^2 test was used to compare proportions and also to test for heterogeneity in the effect within subgroups defined by baseline characteristics. A *P*-value < 0.05 was considered statistically significant. All these calculations were made with the SAS statistical package, version 8.02 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Results

From June 2001 to April 2003, 220 patients were screened for inclusion in the study. Of these, 143 did not meet the inclusion criteria or declined participation in the trial, and seven additional patients were lost before receiving at least one dose of study medication due to sudden changes in the course of ulcer ($n = 3$), withdrawal of informed consent ($n = 2$), hospital admission ($n = 1$) or death ($n = 1$). Finally, 70 patients were randomized (37 bemiparin and 33 placebo).

Demographic and other baseline characteristics of the randomized patients are shown in Table 1. The majority of patients were male (67%), and the mean age was 64.5 years. Patients in the bemiparin group were younger than patients randomized to placebo. The bemiparin group also included a higher number of smokers and patients with Wagner grade II ulcers or chronic venous insufficiency (CVI) than the placebo group. At the time of inclusion in the study, median duration of diabetes was 16.2 years and median ulcer duration 8.5 months.

Fourteen patients discontinued the study medication, five out of 37 (13.5%) in the bemiparin group and nine out of 33 (27.3%) in the placebo group ($P = 0.151$), due to deteriorating glycaemic control and/or lack of ulcer improvement. There were no withdrawals due to adverse drug reactions.

Ulcer improvement rates at 3 months were 70.3% (26 of 37 patients) in the bemiparin group and 45.5% (15 of 33 patients) in the placebo group (absolute difference 24.8%, 95% CI 2.3, 47.3; $P = 0.035$) (Table 2). Four patients needed to be treated with bemiparin to achieve one additional ulcer improvement with respect to placebo (NNT 4; 95% CI 2, 43). Complete healing rates at 3 months were similar in the two groups (35.1% vs. 33.3%; $P = 0.874$), but higher complete healing

Table 1 Demographic data and other baseline characteristics

Characteristic	Total ($N = 70$)	Bemiparin ($n = 37$)	Placebo ($n = 33$)
Demographic data			
Age (years), mean ± SD	64.5 ± 11.8	61.5 ± 9.3	67.8 ± 13.4*
range	27–89	45–85	27–89
Sex male/female, *n*	47/23	25/12	22/11
BMI (kg/m^2), mean ± SD	30.7 ± 5.0	31.7 ± 5.7	29.7 ± 4.1
range	23.0–45.5	23.0–45.5	25.0–38.6
Diabetes characteristics			
Type 1/Type 2 diabetes, *n*	20/50	9/28	11/22
Treatment with insulin, *n*	35	18	17
Duration of diabetes (years), median (range)	12 (2–42)	16 (2–38)	10 (3–42)
Glucose (mmol/l), mean ± SD	10.1 ± 4.5	11.5 ± 4.8	8.63.6*
HbA_{1c} (%), mean ± SD	7.6 ± 1.6	7.9 ± 1.6	7.3 ± 2.7
Ulcer's baseline characteristics			
Wagner I/Wagner II, *n*	51/19	23/14	28/5*
Ulcer area (mm^2), median (range)	159 (7–4837)	163 (8–1954)	157 (7–4837)
Signs of ulcer infection, *n*†	4	1	3
ABI, mean ± SD	0.88 ± 0.26	0.88 ± 0.27	0.88 ± 0.25
Concomitant diseases and risk factors, *n*			
Hypertension	41	23	18
Dyslipidaemia	20	11	9
Chronic venous insufficiency	19	14	5*
Smoker	16	12	4*
Ischaemic heart disease	8	4	4
Cerebrovascular disease	8	3	5
Heart failure	9	3	6
Previous peripheral revascularization	10	7	3
Intermittent claudication	20	12	8
Previous amputations‡	25	12	13

BMI, body mass index; HbA_{1c}, glycated haemoglobin; SD, standard deviation; ABI, ankle-brachial index (the ratio of the ankle systolic blood pressure to the arm systolic blood pressure; in normal adults ABI > 0.9).
*Bemiparin vs. placebo *P*-value < 0.05.
†Signs of infection: purulent drainage, heat, erythema, oedema, pain and/or loss of function, lymphangitis, lymphadenopathy.
‡Location: fingers ($n = 16$), foot ($n = 6$), below knee ($n = 3$).

© 2008 The Authors.
Journal compilation © 2008 Diabetes UK.

Table 2 Main outcomes by intention-to-treat analysis at 3 months

Outcome measure	Bemiparin ($N = 37$) n (%)	Placebo ($N = 33$) n (%)	Difference % (95% CI)	P-value
Main analysis				
Improved ulcer*	26 (70.3)	15 (45.5)	24.8 (2.33, 47.30)	0.035
Ulcer area decreased ≥ 50%	21 (56.8)	14 (42.42)	14.3 (–8.9, 37.6)	0.231
Ulcer decreased at least one grade	17 (46.0)	13 (39.4)	6.6 (–16.6, 29.7)	0.580
Complete healing	13 (35.1)	11 (33.3)	1.8 (–20.45, 24.06)	0.874
Subanalysis depending on ulcer grade at baseline				
Improved ulcer				
Wagner II at baseline	12/14 (85.7)	2/5 (40)	45.7 (0.6, 77.8)	0.046
Wagner I at baseline	14/23 (60.9)	13/28 (46.4)	14.4 (–12.9, 39.4)	0.304
Complete healing				
Wagner II at baseline	7/14 (50)	0/5 (0)	50.0 (0.9, 50.0)	0.047
Wagner I at baseline	6/23 (26.1)	11/28 (39.3)	–13.2 (–35.1, 12.7)	0.320

*Primary efficacy end-point: ulcer area decreased ≥ 50% and/or decreased at least one grade in Wagner's classification (from Wagner grade II to I or from Wagner grade II or I to Wagner grade 0).

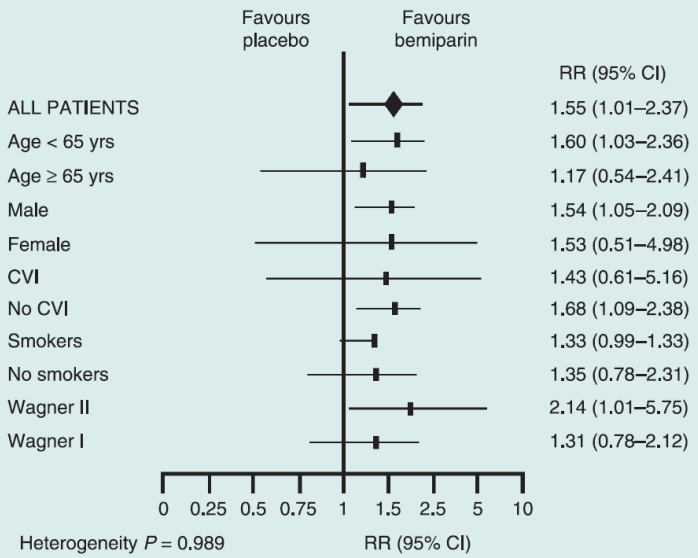


FIGURE 1 Effect of bemiparin on ulcer improvement in patient subgroups according to baseline characteristics, presented as relative risk (logarithmic axis) and 95% CI. CVI, chronic venous insufficiency; RR, relative risk.

rates were obtained with bemiparin in the subgroup of Wagner grade II ulcers (bemiparin 50% vs. placebo 0%; $P = 0.047$; post hoc analysis) (Table 2). The percentage of agreement in ulcer area measurements by the two researchers was 94%. Rates of patients with a decrease in ulcer area ≥ 50% were similar in the two groups (56.8% vs. 42.4%; $P = 0.231$) (Table 2). The effect of bemiparin treatment on ulcer improvement was homogeneous within subgroups defined by baseline characteristics (Fig. 1). Although only 23 of 37 (62%) patients in the bemiparin group and 10 of 33 (30%) in the placebo group had complete HRQL data at 3 months, an analysis of the returned SF-36 questionnaires showed no differences between groups.

There was one bleeding event in each group (one minor conjunctival haemorrhage in the bemiparin group and one major post-procedure bleeding episode in the placebo group). The numbers of serious adverse events (bemiparin six vs. placebo seven; $P = 1.000$) and total adverse events (bemiparin 14 vs. placebo 10; $P = 0.409$) were similar in the two treatment groups during the 3-month treatment period. Two patients (one in each group) underwent amputation, one of whom (in the bemiparin group) died due to a postoperative complication

© 2008 The Authors.

related to amputation surgery. None of these events was considered related to study medication according to investigators. There were no cases of thrombocytopenia (platelet count < 100 000/mm^3) or osteoporosis. Bemiparin did not alter activated partial thromboplastin time (bemiparin 29.8 ± 3.5 s vs. placebo 29.6 ± 3.0 s; $P = 0.766$). There were no significant changes in laboratory parameters during the course of the study compared with baseline (data not shown).

Follow-up

Of 70 included patients, 52 (74%) had a follow-up visit 9 months after the end of treatment visit, and in 50 the ulcer state was assessed. Thirty-one had complete healing of the ulcer (19 and 12 patients from bemiparin and placebo groups, respectively).

Discussion

In our study we met the primary efficacy end-point, i.e. bemiparin administered for 3 months was more effective than placebo and equally safe in the improvement of chronic diabetic foot ulcers. Only four patients needed to be treated to achieve one additional ulcer improvement with respect to placebo.

Our results are similar to those reported by Kalani *et al.* [15] in a group of 84 patients with diabetic foot ulcers and severe peripheral arterial disease (PAD), defined as an ankle-brachial index (ABI) ≤ 0.6, who were treated with LMWH or placebo, until ulcer closure or for a maximum of 6 months. In that study, patients on LMWH improved to a greater extent than those on placebo (67 and 46%, respectively). Our results were very similar despite significant differences in the design of the two trials. We used lower doses of a distinct LMWH, bemiparin, for a shorter time (3 months), and the mean ABI of our patients was 0.88, indicating less severe PAD. These differences in study designs may explain the low rate of amputations in our study ($n = 2$; 2.9%) compared with the study by Kalani *et al.* (11.8%) [15].

Bemiparin treatment was well tolerated by patients, and there were no withdrawals due to adverse reactions. No long-term complications of heparin treatment, such as osteoporosis, have been reported when bemiparin is administered for 3 months [17].

This study has several limitations. The sample size used was small and very selected (70 randomized patients out of 220 screened patients), but adequate on the basis of the expected effect size and the exploratory design of this clinical trial. We were tempted to include the least number of patients necessary to show an effect in order to minimize the risk of possible deleterious effects of long-term experimental drug administration. We hypothesized that bemiparin would increase ulcer improvement rates by 30% with respect to placebo, based on preliminary observations on the use of LMWH in diabetic foot ulcers [16,23]. The results of our clinical trial show an absolute effect size of 25%, which is close to the 30% prespecified in the protocol. On the other hand, we used a composite end-point of ulcer improvement, as pre-fixed in the protocol [18], instead of a single end-point based on complete healing of the ulcer. The only published study with a similar product used for this indication also used a composite end-point [15]. The components of our composite end-point (decrease in Wagner grade and reduction of ulcer area by ≥ 50%) are valid, since the Wagner grade shows a significant association with the time to ulcer healing and remains a perfectly usable instrument at the clinical and prognostic levels [24], whereas decrease in ulcer area is a good predictor of complete healing [25,26]. In our study, there were differences between groups in terms of age, the number of smokers, the presence of CVI at baseline, and also in the distribution of grade I and grade II ulcers. Therefore, we needed to conduct a post hoc analysis of heterogeneity, which showed that the effect of bemiparin treatment on ulcer improvement was homogeneous within all these subgroups. In this post hoc analysis, bemiparin achieved a 50% complete healing rate of grade II complicated ulcers after only 3 months vs. 0% in the placebo group. These promising differences between intervention and control groups may result from chance and need to be confirmed in larger studies.

Glycaemic control is of major importance for micro- and macrovascular complications in diabetes [27,28]. In the present study, glycaemic control (blood glucose concentration and HbA_{1c}) was better in the placebo arm at the beginning of the trial and thereafter. This fact suggests that the effects of bemiparin would have been more marked with better glycaemic control.

Finally, the cost and inconvenience of the prolonged use of LMWH cannot be justified until there is solid evidence of a clinically relevant effect, such as increased total healing, reduced incidence of minor and/or major amputations or improvement in patient's well-being.

In conclusion, this exploratory trial provides a 'proof of concept' of the potential usefulness of bemiparin in the treatment of diabetic foot ulcers. Nevertheless, the results need to be confirmed in a larger randomized clinical trial, which is currently ongoing [29]. Diabetic ulcers are a serious and expensive complication affecting patients' quality of life for which an effective and safe treatment is urgently needed.

Competing interests

Nothing to declare.

Acknowledgements

This study was supported by the Primary Health Care Management of Mallorca (Ib-Salut), Carlos III Health Institute (RedIAPP network RD06/0018), Ministry of Health, Public Health Research Fund (FIS) (grant PI: 02/1704) and Laboratorios Farmacéuticos Rovi, S.A., Spain. The authors thank J. Lago (H. Manacor) and F. Campoamor (H. Son Dureta) for their collaboration during the study. Data monitoring was by Logitest, S.L. and Laboratorios Farmacéuticos Rovi, S.A. Statistical analysis was by Logitest, S.L.

© 2008 The Authors.
Journal compilation © 2008 Diabetes UK.

Resultados adicionales no difundidos

En la presente tesis se incluyen los resultados no publicados que se han considerado relevantes, que esta tesis permitirá hacerlos accesibles.

De los sujetos de estudio y aleatorización

El ensayo clínico se llevó a lo largo de 3 años. En este periodo, 220 pacientes fueron seleccionados para participar en el estudio. De estos, 143 pacientes no se incluyeron (90 no cumplían los criterios de selección y 53 rechazaron participar en el estudio).

De un total de 84 pacientes previstos en el protocolo (42 por grupo), 77 pacientes fueron randomizados para ser tratados con bemiparina (39) o placebo (38). Siete de estos pacientes no comenzaron el tratamiento, 2 en el brazo de bemiparina (1 por incumplimiento de los criterios de selección y 1 por mejoría/curación de la úlcera) y 5 en el brazo de placebo (1 exitus, 2 incumplimiento de criterios de selección, 1 mejoría/curación de la úlcera, 1 decisión personal).

Finalmente quedaron 70 pacientes, 37 en el brazo de bemiparina y 33 en el brazo placebo.

De los 70 pacientes que comenzaron el estudio, 54 pacientes finalizaron el periodo de tratamiento y 52 pacientes realizaron el seguimiento anual. De los 18 pacientes que no completan el estudio (7 del brazo de bemiparina y 11 del brazo placebo) 2 lo abandonan tras finalizar el tratamiento (pacientes 003 y 008) y el resto, 16 sujetos, lo abandonan en diferentes momentos (pacientes 005, 006, 028 tras la visita 3, pacientes 040, 065, 067 tras la visita 4, pacientes 026 y 027 tras la visita 5, pacientes 041 y 046 tras la visita 6, pacientes 035, 050, 066, 075 tras la visita 7 y pacientes 048 y 052 tras la visita 8.

En la figura 1 aparece el diagrama de flujo del estudio.

Las causas de abandonos se detallan en la tabla 2.

Figura 1. Distribución de los pacientes del ensayo

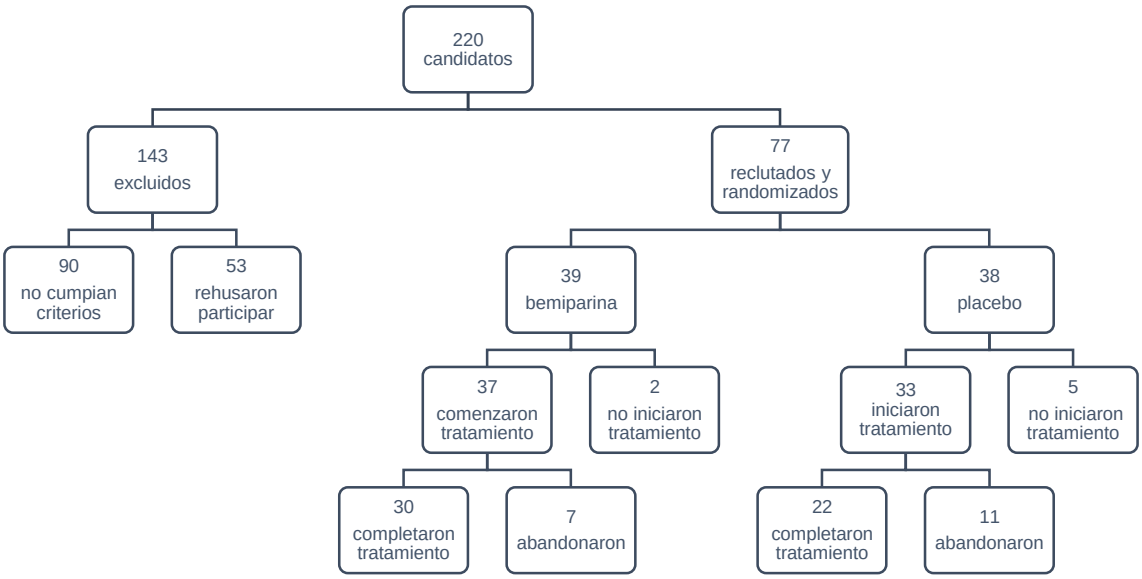


Tabla 2. Momento de abandonos y causas

VARIABLE	GRUPO BEMIPARINA	GRUPO PLACEBO	TOTAL
COMPLETAN TRATAMIENTO	32	22	54
COMPLETAN SEGUIMIENTO	30	22	52
ABANDONAN			
Periodo Screening (antes de intervención)	2	5	7
Periodo de tratamiento	5	11	16
Periodo de seguimiento	2	0	2

CAUSAS DE ABANDONO	PRE-TRATAMIENTO	GRUPO BEMIPARINA	GRUPO PLACEBO	TOTAL
Decisión del paciente	1	2	4	7
Exitus	1	3	0	4
Falta de eficacia	--	1	3	4
Incumplimiento criterios selección	3	--	--	3
Ingreso hospitalario por AA	--	1	1	2
IQ programada	--	0	2	2
Mejoría/Curación	2	--	--	2
Perdida de Seguimiento	--	0	1	1

AA= Acontecimientos adversos. IQ: Intervención quirúrgica

Tras la aleatorización se comprobó la homogeneidad de los pacientes incluidos en ambos grupos de tratamiento. Para ello se compararon las características basales de los sujetos referidas a datos demográficos, estudio de la diabetes, enfermedades concomitantes y factores de riesgo, amputaciones previas, signos de infección, resultados de la analítica, datos referentes a la úlcera de estudio, escala visual del dolor, datos basales del cuestionario de calidad de vida SF36 y medicación concomitante administrada a los pacientes al inicio del estudio.

Se incluyó un mayor porcentaje de pacientes varones con respecto a mujeres (67,1% versus 32,9%) con una media de edad de 64,5 años (rango: 27-89). Asimismo, el valor de la media del índice de masa corporal era cercano a 30 (obesidad). Por tanto, los pacientes eran en su mayoría varones mayores de 60 años y con sobrepeso. La mayoría de los pacientes incluidos presentaban diabetes tipo II, con una media de 12,2 años de evolución. Del total de pacientes, el 51,5% estaban tratados con insulina y el 48,5% únicamente con antidiabéticos orales. Los antidiabéticos orales más utilizados, solos o en combinación, fueron: Metformina (18), Glibenclamida (18) y Glimepirida (4).

Tabla 3. Datos demográficos y características basales

Característica	TOTAL (N = 70)	Bemiparina (n=37)	Placebo (n=33)	P-valor
Datos demográficos				
Edad (años), media (DE)	*64,5 (11,8)*	*61,5 (9,3)*	*67,8 (13,4)*	***0,025***
Mínimo-máximo	27-89	45-85	27-89	
Sexo masculino / femenino, n	47/23	25/12	22/11	0,936
IMC (kg/m2), media (DE)	30,7 (5,0)	31,7 (5,7)	29,7 (4,1)	0,267
Mínimo-máximo	23,0-45,5	23,0-45,5	25,0-38,6	
Características basales de la diabetes				
Diabetes Tipo I / Tipo II, n	20 / 50	9 / 28	11 / 22	0,405
Años desde diagnóstico de diabetes, mediana (rango)	12,2 (1,9-41,8)	16,2 (1,9-8,1)	9,8 (2,9-1,8)	0,295
Datos basales de control de la diabetes				
Glucosa (mg/dL), media (DE)	182 (80,7)	207,4 (86,6)	153,5 (63,9)	**0,005**
Hemoglobina glicosilada HbA_{1C} (%), media (DE)	7.6 (1.6)	7,9 (1,6)	7,3 (1,7)	0,168
Proteinuria (mg/dl), mediana (rango)	1,0 (0,2-79,5)	1,3 (0,2-79,5)	0.71 (0,2-,4)	0,188
Enfermedades y factores de riesgo, n (%)				
Hipertensión	41 (58,6%)	23 (62,2%)	18 (54,6%)	0,518
Dislipemia	20 (28,6%)	11 (29,7%)	9 (27,3%)	0,820
Fumador	16 (22,9%)	12 (32,4%)	4 (12,1%)	**0,043**
Insuficiencia venosa MMII	19 (27,1%)	14 (37,8%)	5 (15,2%)	**0,039**
Coronariopatía isquémica	8 (11,4%)	4 (10,8%)	4 (12,1%)	0,863
Enfermedad cerebrovascular	8 (11,4%)	3 (8,1%)	5 (15,2%)	0,355
Insuficiencia cardiaca	9 (12,9%)	3 (8,1%)	6 (18,2%)	0,209
Revascularización periférica	10 (14,3%)	7 (18,9%)	3 (9,1%)	0,261
Claudicación intermitente	20 (28,6%)	12 (32,4%)	8 (24,2%)	0,640
Amputaciones previas	25 (35,7%)	12 (32,4%)	13 (39,4%)	0,544
Dedos	16 (22,9%)	8 (21,6%)	8 (24,2%)	0,794
Metatarsiana	6 (8,6%)	3 (8,1%)	3 (9,1%)	0,883
Supracondílea	3 (4,3%)	2 (5,4%)	1 (3,0%)	0,624
Amputaciones programadas	2 (2,9%)	1 (2,7%)	1 (3,1%)	0,935
Estado basal de la úlcera				
Grado I / Grado II, n	51 / 19	23 / 14	28 / 5	**0,033**
Meses de evolución, mediana (Rango)	8,5 (3-336)	9 (3-120)	6 (3-336)	0,341
Área (mm2), mediana (Rango)	159 (7-4837)	163 (8-1954)	157 (7-4837)	0,870
Signos de infección, n (%)*	4 (5,7%)	1 (2,7%)	3 (9,1%)	0,435
Coeficiente de isquemia, media (DE)*	0,88 (0,26)	0,88 (0,27)	0,88 (0,25)	0,977
Antiagregantes plaquetarios, n (%)				
ASA y/o triflusal	23 (32,9%)	14 (37,8%)	9 (27,3%)	0,348

IMC = índice de masa corporal; DE = Desviación estándar; MMII = miembros inferiores;

*66 pacientes fueron evaluables para el índice de isquemia (36 en el grupo de bemiparina y 31 en el grupo placebo

**Signos de infección: Purulencia, calor, eritema, linfangitis, linfadenopatía, edema, dolor y/o pérdida de función

Comparado con el grupo placebo, en el grupo de bemiparina la media de edad es inferior, el control de la diabetes parece ser peor basalmente, hay mayor porcentaje de fumadores y pacientes con insuficiencia venosa de MMII, y la severidad de las úlceras es mayor. Aunque para el resto de las variables estudiadas no se detectaron diferencias entre los grupos, en las siguientes variables se observó diferencia estadísticamente significativa entre los grupos (bemiparina y placebo) algunas de las cuales se han podido originar por el reducido tamaño de la muestra.

A continuación se detallan las diferencias:

-Edad 61,54 años en brazo bemiparina versus 67,82 en brazo placebo (p=0.0250). Este dato podría influir en el desarrollo y años de evolución de la DM, en concreto de la de tipo II que es la más abundante entre los pacientes incluidos, ya que la prevalencia de la enfermedad aumenta de forma proporcional a la edad de los pacientes estudiados. Sin embargo, analizando este parámetro se observa que, aunque los pacientes incluidos en el brazo de bemiparina son más jóvenes que los pacientes incluidos en el brazo placebo, el tiempo de evolución de la DM es mayor entre los pacientes incluidos en el brazo placebo.

-Fumador 32% en el brazo bemiparina versus 12% en brazo placebo (p=0.0434). No hemos encontrado bibliografía que relacione directamente el consumo de tabaco con la cura de este tipo de heridas, es conocido el efecto negativo que el tabaco produce sobre el endotelio vascular que de forma directa podría afectar a la microcirculación de la zona perimetral de la úlcera reduciendo la irrigación sanguínea de la zona y por tanto el aporte de oxígeno, sustancias nutritivas para el epitelio y factores de crecimiento implicados en la cicatrización.

-Insuficiencia venosa 37% en el brazo de bemiparina versus 15% en el brazo placebo (p=0.0394). No sabemos la significación clínica que este parámetro puede tener en la curación de este tipo de úlceras.

-Estadio de la úlcera. Grado II (37% en el brazo de bemiparina versus 15% en el brazo placebo (p=0.0331). En el momento de la inclusión, los pacientes del brazo de bemiparina tenían úlceras más avanzadas en su evolución que los pacientes incluidos en el brazo placebo lo cual podría haber perjudicado al grupo experimental.

-Hematíes (x106/mm3): 4,71 en el brazo bemiparina versus 4,44 en el brazo placebo (p=0.018). Existen diferencias entre los brazos ambos valores se encuentran dentro de los rangos de normalidad para el parámetro, pero se puede descartar que estas diferencias estadísticas tengan significación clínica y tengan más que ver con el escaso tamaño de muestra.

-Hematocrito: 41,2% en el brazo bemiparina versus 39,1% en el brazo placebo (p=0.0286). Aunque existen diferencias entre los brazos ambos valores se encuentran dentro de los rangos de normalidad para el parámetro lo que parece descartar que estas diferencias estadísticas tengan significación clínica y tengan más que ver con el escaso tamaño de muestra.

-Fibrinógeno (mg/ml): 479 en el brazo de bemiparina versus 543 en el brazo placebo (p=0.0479). Aunque existen diferencias entre los brazos ambos valores se encuentran dentro de los rangos de normalidad para el parámetro lo que parece descartar que estas diferencias estadísticas tengan significación clínica y tengan más que ver con el escaso tamaño de muestra.

-Glucosa (mg/dL): 207,4 en el brazo de bemiparina versus 153,4 en el brazo placebo (p=0,0046). El valor de la glucosa plasmática en ayunas es un valor que nos da una idea del metabolismo de la glucosa de forma puntual. Para estudiar los niveles de glucemia a lo largo de periodos de tiempo en sujetos diabéticos el parámetro empleado es la hemoglobina glicosilada (HbA1C). El valor de esta variable describe el control metabólico de la glucemia durante los últimos meses y en él no se producen variaciones estadísticamente significativas entre los pacientes incluidos en el grupo de bemiparina y en los del grupo placebo.

Análisis del efecto

Curaciones completas en el tiempo según tratamiento

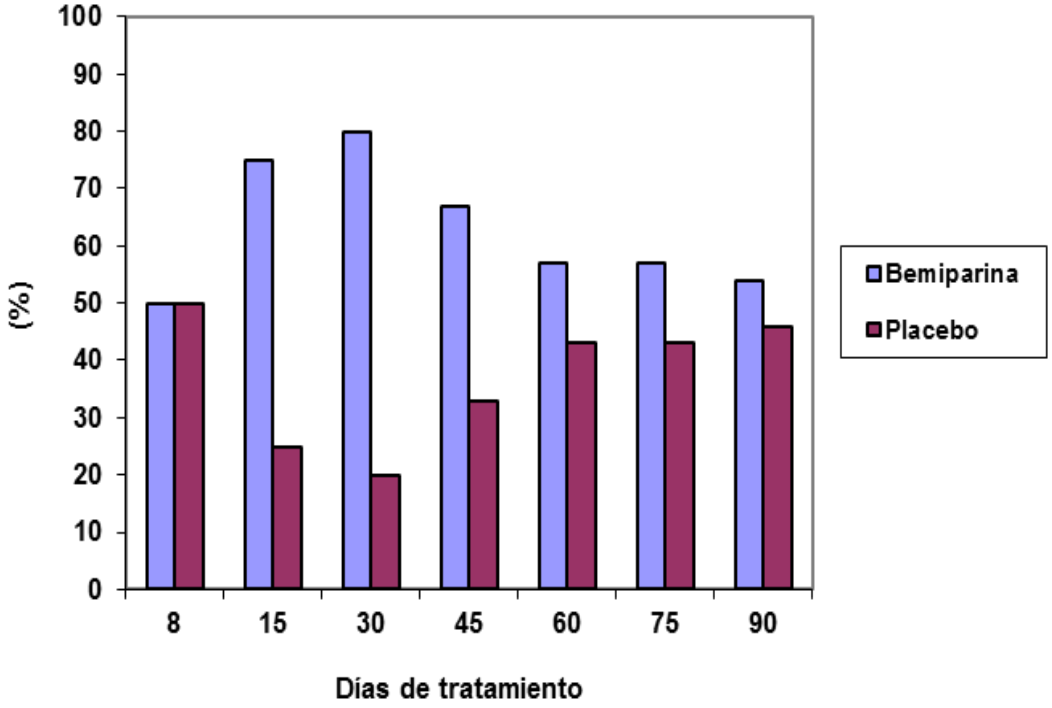
Si nos fijamos en las incidencias de pacientes que llegaron a tener estadio 0 de la escala Wagner (úlcera cicatrizada) se observa una tendencia que, una vez pasado el periodo de dosis de 3500 UI/día (a los 10 días de tratamiento), entre los 15 y los 45 días se producen mayores diferencias de las cicatrizaciones con bemiparina a las cicatrizaciones con placebo, lo cual no se ve tan acusadamente entre los 60 y 90 días de tratamiento.

Posiblemente, las dosis más elevadas de bemiparina (3.500 UI/día) tengan un efecto más pronunciado sobre el beneficio en la evolución de las úlceras.

Tabla 4. Curaciones completas en el tiempo según tratamiento

Días de tratamiento	Bemiparina	Placebo	Total	Diferencia
8	1 (50%)	1 (50%)	2	0 (0%)
15	3 (75%)	1 (25%)	4	2 (50%)
30	4 (80%)	1 (20%)	5	3 (60%)
45	6 (67%)	3 (33%)	9	3 (34%)
60	8 (57%)	6 (43%)	14	2 (14%)
75	13 (57%)	10 (43%)	23	2 (14%)
90	13 (54%)	11 (46%)	24	2 (8%)

Figura 2. Pacientes que llegan a la curación completa de la úlcera



La visita al año se realizó en un total de 52 (74%) de los 70 pacientes incluidos (30 previamente asignados a bemiparina y 22 previamente asignados a placebo, y 50 de ellos (29 con bemiparina y 21 con placebo durante el estudio) fueron evaluables para el estado de la úlcera. De ellos, 31 presentaron curación completa de la úlcera al año: 19/29 (66%) con bemiparina y 12/21 (57%) con placebo, diferencias que no fueron estadísticamente significativas.

Eficacia dependiendo de las características basales y enfermedades concomitantes

La siguiente tabla (tabla 5) describe el efecto de bemiparina frente a placebo dependiendo de las características basales y enfermedades concomitantes (RR y p-valores a la derecha).

El efecto de bemiparina frente a placebo, con respecto a la mejoría del estado de la úlcera, fue más pronunciado en pacientes de menos de 65 años. Este dato está en consonancia con que los pacientes diabéticos más jóvenes incluidos en el estudio presentaban una enfermedad más evolucionada, con peor control de la diabetes y un peor estado de la úlcera frente a aquellos diabéticos tipo II de mayor edad incluidos en el estudio. El efecto (RR) fue similar en hombres y mujeres, aunque alcanza significación estadística en hombres por el mayor número de hombres incluido en el estudio. El efecto de bemiparina más pronunciado en los pacientes con úlcera grado II basal y evolución de la úlcera de más de 9 meses.

El efecto de bemiparina fue también más pronunciado con respecto a placebo en aquellos pacientes con mayor riesgo cardiovascular (hipertensos, dislipémicos y fumadores) y en aquellos sin insuficiencia venosa.

Con respecto a la curación completa de la úlcera, un dato muy importante es que el 50% de los pacientes con úlcera grado II tratados con bemiparina presentaron curación completa de la úlcera, frente a ningún paciente con úlcera grado II en el grupo placebo [50% (7/14) vs. 0% (0/5); Dif.: 50%; IC95%: 0,9% a 50%; RR: Infinito.; IC95%: 1,02 a Infinito; p = 0,047] (tabla 6).

En cambio, no hubo diferencias significativas entre bemiparina o placebo en el porcentaje de pacientes con úlcera grado I con curación completa de la misma.

Tabla 5. Efecto de bemiparina frente a placebo en la mejoría de la úlcera dependiendo de las características basales.

CARACTERÍSTICA BASAL	MEJORÍA EN EL TOTAL DE LA POBLACION	MEJORIA BEMIPARINA n/N (%)	MEJORIA PLACEBO n/N (%)	RR (IC95%)	p-valor
Edad < 65 años	26/35 (74,3%)	19/22 (86,4%)	7/13 (53,8%)	1,60 (1,03-2,36)	**0,033**
Edad > 65 años	10/35 (28,6%)	7/15 (46,7%)	8/20 (40%)	1,17 (0,54-2,41)	0,693
RR (IC95%)	2,60 (1,57-4,26)	-	-	-	-
p-valor	**<0,001**	-	-	-	-
Hombres	33/47 (70,2%)	21/25 (84%)	12/22 (54,5%)	1,54 (1,05-2,09)	**0,028**
Mujeres	8/23 (34,8%)	5/12 (41,7%)	3/11 (27,3%)	1,53 (0,51-4,98)	0,469
RR (IC95%)	2,02 (1,21-3,67)	-	-	-	-
p-valor	**0,005**	-	-	-	-
Hipertensos	22/41 (53,7%)	17/23 (73,9%)	5/18 (27,7%)	2,66 (1,35-5,51)	**0,003**
No hipertensos	19/29 (65,5%)	9/14 (64,3%)	10/15 (66,6%)	0,96 (0,59 – 1,57)	0,893
RR (IC95%)	0,82 (0,58-1,22)	-	-	-	-
p-valor	0,321	-	-	-	-
Dislipémicos	12/20 (60%)	9/11 (81,8%)	3/9 (33,3%)	2,46 (1,09-4,97)	**0,028**
no dislipémicos	29/50 (58%)	17/26 (65,4%)	12/24 (50%)	1,31 (0,82-2,09)	0,271
RR (IC95%)	1,03 (0,64-1,49)	-	-	-	-
p-valor	0,878	-	-	-	-
Ins. venosa MMII	10/19 (52,6%)	8/14 (57,1%)	2/5 (40%)	1,43 (0,61-5,16)	0,510
No ins. ven. MMII	31/51 (60,8%)	18/23 (78,3%)	13/28 (46,4%)	1,68 (1,09-2,38)	**0,021**
RR (IC95%)	0,87 (0,51-1,30)	-	-	-	-
p-valor	0,538	-	-	-	-
Fumadores	15/16 (93,8%)	12/12 (100%)	3 / 4 (75%)	1,33 (0,99- 1,33)	0,074
No fumadores	26/54 (48,1%)	14/25 (56%)	12/29 (41,4%)	1,35 (0,78-2,31)	0,284
RR (IC95%)	1,95 (1,38-2,12)	-	-	-	-
p-valor	**0,001**	-	-	-	-
Antiagregantes	17/23 (73,9%)	11/14 (78,6%)	6/9 (66,6%)	1,83 (0,31-10,91)	0,526
Ao antiagregantes	24/47 (51,1%)	15/23 (65,2%)	9/24 (37,5%)	1,74 (0,98-3,04)	0,057
RR (IC95%)	1,45 (0,97-1,93)	-	-	-	-
p-valor	0,068	-	-	-	-
Diabetes tipo II	29/50 (58%)	19/28 (67,9%)	10/22 (45,5%)	1,49 (0,92-2,48)	0,111
Diabetes tipo I	12/20 (60%)	7/9 (77,8%)	5/11 (45,5%)	1,71 (0,84-2,80)	0,142
RR (IC95%)	1,03 (0,64-1,49)	-	-	-	-
p-valor	0,878				
Diabetes > 10 años	24/40 (60%)	17/24 (70,8%)	7/16 (43,8%)	1,62 (0,94-2,93)	0,087
Diabetes < 10 años	17/30 (56,7%)	9/13 (69,2%)	8/17 (47,1%)	1,47 (0,79-2,46)	0,225
RR (IC95%)	1,06 (0,72-1,60)	-	-	-	-
p-valor	0,779	-	-	-	-
Coef. isquemia < 0.9	12/28 (42,9%)	8/16 (50%)	4/12 (33,3%)	1,50 (0,63-3,94)	0,378
Coef. isquemia > 0.9	28/39 (71,8%)	17/20 (85%)	11/19 (57,9%)	1,47 (0,98-1,96)	0,060
RR (IC95%)	0,60 (0,38-0,92)	-	-	-	-
p-valor	**0,017**	-	-	-	-
Ulcera grado II	14/19 (73,7%)	12/14 (85,7%)	2/5 (40%)	2,14 (1,01-5,75)	**0,046**
Ulcera grado I	27/51 (52,9%)	14/23 (60,9%)	13/28 (46,4%)	1,31 (0,78-2,12)	0,304
RR (IC95%)	1,39 (0,91-1,83	-	-	-	-
p-valor	0,117	-	-	-	-
Ulcera > 9 meses	20/35 (57,1%)	14/19 (73,7%)	6/16 (37,5%)	1,97 (1,06-3,63)	**0,031**
Ulcera < 9 meses	21/35 (60%)	12/18 (66,6%)	9/17 (52,9%)	1,26 (0,74-2,12)	0,407
RR (IC95%)	0,95 (0,65-1,40)	-	-	-	
p-valor	0,808	-	-	-	-
Hba1c > 7,5%	23/35 (65,7%)	16/22 (72,7%)	7/13 (53,8%)	1,35 (0,83-2,36)	0,256
Hba1c < 7,5%	18/34 (52,9%)	10/15 (66,6%)	8/19 (42,1%)	1,58 (0,84-2,76)	0,154
RR (IC95%)	1,27 (0,84-1,95)				
p-valor	0,270				
TOTAL RR	**41/70 (58,6%)**	**26/37 (70,3%)**	**15/33 (45,5%)**	**1,55 (1,01-2,37**	**0,035**

Tabla 6. Efecto de bemiparina respecto a placebo en la cura-ción de la úlcera según características basales.

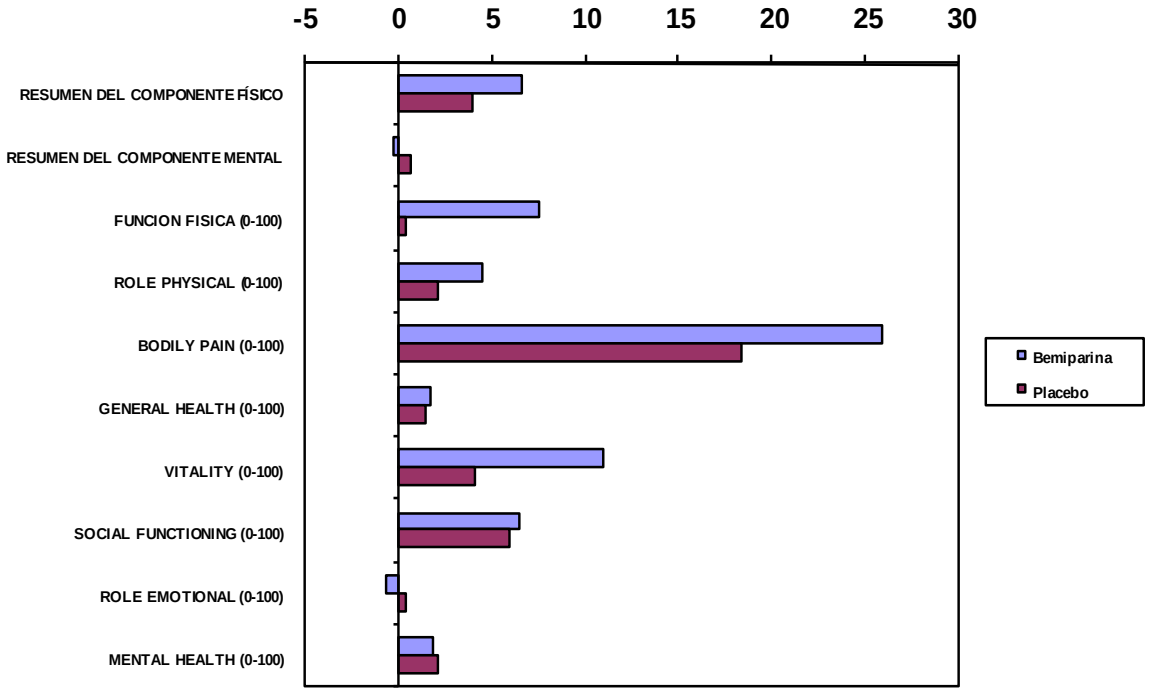
CARACTERÍSTICA BASAL	MEJORÍA EN EL TOTAL DE LA POBLACION	MEJORIA BEMIPARINA n/N (%)	MEJORIA PLACEBO n/N (%)	RR (IC95%)	p-valor
Edad < 65 años	15/35 (42,9%)	11/22 (50%)	4/13 (30,8%)	1,63 (0,72-4,23)	0,267
Edad ≥ 65 años	9/35 (25,7%)	2/15 (13,3%)	7/20 (35%)	0,38 (0,10-1,35)	0,147
Hombres	21/47 (44,7%)	12/25 (48%)	9/22 (40,9%)	1,17 (0,63-2,25)	0,626
Mujeres	3/23 (13,0%)	1/12 (8,3%)	2/11 (18,2%)	0,46 (0,06-3,25)	0,484
Hipertensos	12/41 (29,3%)	8/23 (34,8%)	4/18 (22,2%)	1,57 (0,60-4,44)	0,380
No hipertensos	12/29 (41,4%)	5/14 (35,7%)	7/15 (46,7%)	0,77 (0,31-1,80)	0,550
Dislipémicos	5/20 (25%)	3/11 (27,3%)	2/9 (22,2%)	1,23 (0,29-5,60)	0,795
No dislipémicos	19/50 (38%)	10/26 (38,5%)	9/24 (37,5%)	1,03 (0,51-2,09)	0,944
Fumadores	8/16 (50%)	7/12 (58,3%)	1 / 4 (25%)	2,33 (0,68-13,64)	0,248
No fumadores	16/54 (29,6%)	6/25 (24%)	10/29 (34,5%)	0,70 (0,29-1,59)	0,400
Ins. Venosa MMII	6/19 (31,6%)	5/14 (35,7%)	1/5 (20%)	1,79 (0,41-11,05)	0,516
No ins. Venosa MMII	18/51 (35,3%)	8/23 (34,8%)	10/28 (35,7%)	0,97 (0,46-2,02)	0,945
Antiagregantes	9/23 (39,1%)	3/14 (21,4%)	6/9 (66,7%)	0,32 (0,12-0,90)	**0,030**
No antiagregantes	15/47 (31,9%)	10/23 (43,5%)	5/24 (20,8%)	2,09 (0,88-5,19)	0,096
Diabetes tipo II	18/50 (36%)	10/28 (35,7%)	8/22 (36,4%)	0,98 (0,48-2,09)	0,962
Diabetes tipo I	6/20 (30%)	3/9 (33,3%)	3/11 (27,3%)	1,22 (0,33-4,44)	0,769
Diabetes ≥ 10 años	15/40 (37,5%)	9/24 (37,5%)	6/16 (37,5%)	1,00 (0,46-2,32)	1,000
Diabetes < 10 años	9/30 (30%)	4/13 (30,8%)	5/17 (29,4%)	1,05 (0,35-3,01)	0,936
Coef. Isquemia ≤ 0.9	7/28 (25,0%)	3/16 (18,8%)	4/12 (33,3%)	0,56 (0,16-1,96)	0,378
Coef. Isquemia > 0.9	17/39 (43,6%)	10/20 (50,0%)	7/19 (36,8%)	1,36 (0,67-2,83)	0,408
Ulcera grado II	7/19 (36,8%)	7/14 (50%)	0/5 (0%)	∞(1,02 - ∞)	**0,047**
Ulcera grado I	17/51 (33,3%)	6/23 (26,1%)	11/28 (39,3%)	0,66 (0,29-1,46)	0,320
Ulcera ≥ 9 meses	11/35 (31,4%)	6/19 (31,6%)	5/16 (31,3%)	1,01 (0,39-2,71)	0,983
Ulcera < 9 meses	13/35 (37,1%)	7/18 (38,9%)	6/17 (35,3%)	1,10 (0,47-2,62)	0,826
Glucemia ≥ 150 mg/dl	16/43 (37,2%)	10/27 (37,0%)	6/16 (37,5%)	0,99 (0,47-2,27)	0,976
Glucemia < 150 mg/dl	8/27 (29,6%)	3/10 (30%)	5/17 (29,4%)	1,02 (0,30-3,09)	0,974
HbA1c ≥ 7,5%	15/35 (42,9%)	10/22 (45,5%)	5/13 (38,5%)	1,18 (0,56-2,82)	0,686
HbA1c < 7,5%	9/34 (26,5%)	3/15 (20%)	6/19 (31,6%)	0,63 (0,19-1,95)	0,447
TOTAL RR	41/70 (58,6%)	13/37 (35,1%)	11/33(33,3%)	1,05 (0,55 – 2,02)	0,874

.

Cuestionario de calidad de vida SF-36.

Tras el análisis, el grupo bemiparina muestra superioridad frente a placebo, no de manera estadísticamente significativa, aunque si homogénea para la gran mayoría de dimensiones.

Figura 3. Cambio en la puntuación de la escala SF-36



Evolución en el dolor en la extremidad inferior

De los 27 pacientes que cambiaron en el estado de dolor (de Sí a No o de No a Sí) este desapareció en 25 (92,59%). Suponemos que el procedimiento de curas tuvo mucho que ver en este resultado.

Tabla 7. Dolor en extremidad inferior

	Dolor a los 3 meses			
Dolor basal	**No**	**Si**	**Total**	**P-valor**
No	18	2	20	
Si	25	9	34	
Total	43	11	54	<0.0001

Tabla 8. Dolor en extremidad según escala visual analógica (EVA)

	Bemiparina		Placebo	
	n	**Media (D.T.)**	**n**	**Media (D.T.)**
EVA basal	37	3.35 (3.24)	31	3.18 (2.96)
EVA a los 3 meses	31	1.04 (2.11)	22	0.97 (2.19)

Tabla 9. Cambio en el dolor según escala visual analógica (EVA)

	Bemiparina		Placebo		P-valor
	N	**Media ajustada (IC95%)**	**N**	**Media ajustada (IC95%)**	**Bemiparina vs Placebo**
EVA basal	3.27 (2.52 - 4.02)				
EVA a los 3 meses	31	1.05 (0.30 - 1.80)	22	0.96 (0.07 - 1.85)	0.8718
P-valor del cambio		0.0069		0.0356	

Acontecimientos adversos

Los acontecimientos adversos codificados según el diccionario MedDRA (versión 10.0) fueron analizados de forma ciega. En los formatos tabulados se incluye también la descripción de los acontecimientos adversos tal y como fueron notificados por los investigadores.

Durante el periodo de 3 meses de tratamiento, un total de 16 pacientes experimentaron 24 acontecimientos adversos, 13 de ellos graves y ninguno relacionado con la medicación de estudio (Tabla 10).

Tabla 10. Resumen de los acontecimientos adversos (durante el periodo de tratamiento – 3 meses)

POBLACIÓN DE SEGURIDAD	TOTAL N = 70 n (%)	GRUPO Bemiparina N = 37 n (%)	GRUPO Placebo N = 33 n (%)	P-valor* Bemiparina vs. placebo
Pacientes que los sufrieron	16 (22,9%)	10 (27,0%)	6 (18,2%)	0,409
Graves				
Relacionados	0	0	0	
No relacionados	8 (11,4%)	4 (10,8%)	4 (12,1%)	1,000
No graves				
Relacionados	0	0	0	-
No relacionados	10 (14,3%)	7 (18,9%)	3 (9,1%)	0,315
Número de acontecimientos adversos	24	14	10	0,439
Graves				
Relacionados	0	0	0	-
No relacionados	13	6	7	0,857
No graves				
Relacionados	0	0	0	-
No relacionados	11	8	3	0,241

*Test exacto de Fisher para comparación de proporciones de pacientes con acontecimientos adversos y test no paramétrico de Wilcoxon para la comparación del número de acontecimientos adversos

Considerando el periodo total de 1 año de estudio un total de 32 pacientes experimentaron 77 acontecimientos adversos, 41 de ellos graves y ninguno relacionado con la medicación de estudio (Tabla 11). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de estudio con respecto a estas variables.

Tabla 11. Resumen de los acontecimientos adversos durante el periodo total de estudio: 1 año)

POBLACIÓN DE SEGURIDAD	TOTAL N = 70 n (%)	GRUPO Bemiparina N = 37 n (%)	GRUPO Placebo N = 33 n (%)	P-valor* Bemiparina vs. placebo
Pacientes con acontecimientos adversos	**32 (45,7%)**	**19 (51,4%)**	**13 (39,4%)**	**0,346**
Graves				
Relacionados	0	0	0	-
No relacionados	20 (28,6%)	11 (29,7%)	9 (27,3%)	1,000
No graves				
Relacionados	0	0	0	-
No relacionados	19 (27,1%)	13 (35,1%)	6 (18,2%)	0,178
Número de acontecimientos adversos	**77**	**52**	**25**	**0,172**
Graves				
Relacionados	0	0	0	
No relacionados	41	23	18	0,757
No graves				
Relacionados	0	0	0	
No relacionados	36	29	7	0,070

*Test exacto de Fisher para comparación de proporciones de pacientes con acontecimientos adversos y test no paramétrico de Wilcoxon para la comparación del número de acontecimientos adversos

Hubo solo dos sangrados durante el periodo de 1 año de estudio. Una hemorragia mayor en un paciente en el grupo placebo, relacionada con un procedimiento quirúrgico de bypass y una hemorragia menor ocular conjuntival en el grupo de bemiparina (Tabla 12). Ninguna de las hemorragias fue relacionada con la medicación del estudio.

Tabla 12. Sangrados mayores y menores durante el periodo de estudio de 1 año (tratamiento + seguimiento)

Caso	Grupo	Día de estudio	Periodo (tratamien-to/seguimiento)	Sangrado	Tipo sangrado
067	Placebo	26	Tratamiento	Mayor	Hemorragia postproce-dimiento
069	Bemiparina	34	Tratamiento	Menor	Hemorragia ocular con-juntival leve

7. DISCUSIÓN

En primer lugar, señalar que el ensayo clínico que sustenta esta tesis doctoral es un trabajo recogido en las revisiones y metanálisis recientes (Su et al., 2016; Huang et al., 2017) en la propuesta de una alternativa farmacológica a agregar al tratamiento multidisciplinar de esta paradigmática complicación crónica del paciente diabético, pues ha demostrado eficacia en la mejoría de estos pacientes. La modesta evidencia que aporta se añade a la de otros autores y merece ser contrastada, tal como ya comentamos al publicar los resultados.

Del estado de la cuestión

Las úlceras tórpidas de las extremidades inferiores en los pacientes diabéticos son una complicación grave, que ocasiona un importante menoscabo en su calidad de vida, y que más del 15% de ellos acabará perdiendo parte de la extremidad (Real et al, 2001; Hoffstad et al., 2015). Es frecuente pues del 10 a 25 % de estos las sufrirán a lo largo de su vida (Singh et al., 2005; Frykberg et al., 2006; Hoffstad et al., 2015). Su prevalencia en la diabetes es 6,3% (Zhang et al., 2017). En la actualidad se estima que viven 415 millones de adultos diabéticos en el planeta, para el año 2030 la estimación aumenta a aproximadamente 642 millones (http: //www.eatlas.idf.org), lo que supondría cerca de 40 millones de casos de esta complicación. Una estimación del coste global de las hospitalizaciones lo calcula en 1,5 mil millones de dólares anuales (Hicks et al., 2014).

En nuestro sistema sanitario, el tratamiento de úlceras tórpidas de en las extremidades inferiores del paciente diabético es materia de la atención primaria, desde su detección y control, o hasta la desafortunada derivación a la atención especializada para considerar opciones quirúrgicas.

En la actualidad ningún tratamiento no quirúrgico, más que la descarga de la zona ulcerada, el tratamiento agresivo de la infección y un idóneo plan de curas, ha mostrado suficiente eficacia y viabilidad frente a este problema, ni en su aplicación tópica, ni como tratamiento sistémico (Hinchliffe et al., 2011), salvo quizás, la cámara hiperbárica (Löndahlet al., 2011), de aplicación restringida, costosa y de problemático acceso desde atención primaria.

Dada la magnitud del problema y la escasez de tratamientos válidos dirigidos a influir favorablemente en su evolución, es necesaria la búsqueda de nuevos enfoques

terapéuticos que aborden los diferentes aspectos que conforman su fisiopatología (Hinchliffe et al., 2015).

De la hipótesis

Uno de entre los posibles abordajes terapéuticos que puedan actuar sobre los diferentes aspectos fisiopatológicos implicados en la tórpida evolución de estas úlceras, es el concerniente al daño vascular, que es generalizado (Jensen & Deckert, 1991; Donnelly et al., 2000; Aaron y Flemmer, 2002; Prandoni, 2007), y particularmente, en nuestro caso, al estado procoagulante, secundario al daño endotelial que caracteriza la microangiopatía diabética (Egeberg, 1963; Fuller et al., 1979; Frade et al., 1987; Ceriello & Feener, 1993; King, 1998; Rosemberg et al., 1999; Pham et al., 1998; Cosson et al., 2000; Osende & Badimon, 2001; Vinik et al., 2001; Cohen et al., 2002; Aso et al., 2002; Thora et al., 2002; Lapolla et al., 2003; Targher et al., 2005; Devaraj et al., 2007; Grant, 2007; Madan et al., 2010; Tripodi et al., 2011; Kim et al., 2014; Pereira et al., 2016). Y que además pueda ser seguro y útil en el tratamiento de este problema en el ámbito de la atención primaria.

Atendiendo a la fisiopatología de las alteraciones vasculares propias de la diabetes, donde la hipercoagulabilidad desempeña un rol preponderante, y a la plausibilidad biológica de que la acción de las heparinas puede mejorar un medio mal perfundido y sometido al ambiente procoagulante característico de la diabetes (Garbaruchuk et al., 1998; Van der Pij et al., 1997;Hehenberger et al., 1998; Ceriello et al., 1998; Kalani et al., 2003; Serra et al., 2012); apoyándonos en la observación de buena evolución en los primeros seis casos descritos origen de nuestra hipótesis (Rullan et al., 2003), y en experiencias de otros investigadores coincidentes (Jörneskog et al., 1993; Kalani et al., 2003), planteamos un estudio ambicioso, el primer ensayo clínico con un medicamento en nuestra gerencia, con el fin de determinar si la administración de una HBPM puede ser eficaz en el tratamiento de esta lamentable complicación.

Del método

Este estudio fue diseñado como prospectivo, multicéntrico, aleatorizado, asignado a triple ciego (el tratamiento fue cegado para los pacientes, los investigadores y el estadístico), de grupos paralelos, controlado con placebo. Tras la negativa a colaborar de las industrias farmacéuticas multinacionales comercializadoras de las dos HBPM más vendidas en nuestro país, se consiguió emprender este trabajo con el apoyo decidido de la gerencia de atención primaria de Mallorca, cuya unidad de investigación y la de farmacología clínica ofrecieron una ayuda imprescindible para conseguir financiación del Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto Carlos III. Finamente una

firma nacional, Laboratorios ROVI, nos apoyó aportando el fármaco para la investigación y el placebo de iguales características y costeando la monitorización del ensayo.

Nuestra hipótesis operativa era que bemiparina (HBPM sintetizada por los laboratorios ROVI) aumentaría las tasas de mejora de la úlcera en un 30% con respecto al placebo; criterio compartido con un estudio preliminar de la utilización de HBPM en las úlceras del pie diabético (Jörneskog et al., 1993)y en su versión subsecuente controlada con placebo (Kalani et al., 2003).

De los 84 pacientes calculados como necesarios al final se obtuvieron 77 (39 con bemiparina y 38 con placebo), con la consecuente pérdida de potencia en la comparación de las proporciones de mejoría entre bemiparina y placebo. Si se hubiera conseguido llegar a la muestra inicialmente planeada se habría demostrado nuestra hipótesis con un mayor grado de significación.

Fueron incluidos pacientes con DM y úlceras de grado I y II de la Clasificación de Wagner (Wagner, 1981), de evolución tórpida y distales a la rodilla, sin perjuicio de que fueran neuropáticas, isquémicas o venosas, al considerar que el daño vascular endotelial y las alteraciones que conducen a su cronificación en la diabetes, es generalizado (Jensen &Deckert, 1991; Donnelly et al., 2000; Aaron y Flemmer, 2002; Prandoni, 2007), lo que incluye también el sistema venoso (Loots et al., 1998). Asimismo, fueron incluidas ulceras de muñón de amputación, pues su aparición en estos pacientes supera el 30% (Elgzyri et al., 2015).

El ensayo fue llevado a cabo en pacientes adscritos a los centros de atención primaria del Servei de Salut de les Illes Balears en Mallorca, por un único equipo investigador, compuesto por un médico de atención primaria y una enfermera, que se desplazó a los centros de salud y a los hogares de los pacientes, en el caso de que tuvieran dificultad para acudir al punto de atención continuada correspondiente. Ello quizás limite algún aspecto de la validez externa al ser ejecutado por un único equipo investigador, pero con la ventaja de homogeneizar la evaluación, el tratamiento y las curas de los pacientes.

El procedimiento de curas (retirada quirúrgica de esfacelos, limpieza con suero fisiológico y oclusión con gasas) fue instaurado en los 15 días previos a la inclusión y así evitar el sesgo imputable al poco consenso existente en la aplicación de los

diferentes apósitos y productos tópicos que ofrece el mercado farmacéutico para el tratamiento de este tipo de úlceras; y que ninguno de ellos ha demostrado aún superioridad respecto al protocolo propuesto (Hinchliffe et al., 2015). Se procuró descarga de la zona ulcerada cuando fue necesario y se dispuso de ortesis, y en algunos casos se desaconsejó la deambulación.

La presencia de dos o más signos de infección (purulencia, calor, eritema, linfangitis, linfadenopatía, edema, dolor y pérdida de función) fue tratada previamente a la inclusión y eventualmente durante el periodo de tratamiento.

No se influyó en el control de fondo de los parámetros glucémicos ni tensionales durante la intervención.

Para determinar el área de la úlcera, al inicio y al finalizar la intervención, se tomaron imágenes digitales a las que se aplicó Image para Windows, inspirado en el programa de cálculo de áreas Image NIH de Macintosh (Abramoff & Magelhaes, 2004), analizadas por dos investigadores independientemente, más un tercero si hubiera discrepancias significativas. La profundidad fue valorada por ambos investigadores de campo en grado I y II, excluyendo las de grado III, tributarias de atención especializada.

Los pacientes en la rama de bemiparina, iniciaron la intervención con 3500 UI/día los 10 primeros días, para luego continuar con 2500 UI/día hasta el final de la intervención, a similitud de la dosis manejada en las primeras observaciones. Posteriormente al registro del estudio, Kalani (Kalani et al., 2003) publicó su ensayo clínico en el que se trató a las úlceras de pie diabético con dosis de 5.000 UI/día de dalteparina (dosis profiláctica de la enfermedad tromboembólica venosa de alto riesgo) con resultados semejantes a los obtenidos en el presente estudio.

A la vista de los resultados del estudio y del perfil de seguridad de bemiparina la dosis de 3.500 UI/día bien pudiera obtenerse mayor efecto con el mantenimiento de esta dosis durante todo el periodo de tratamiento. Hacen falta otros ensayos clínicos con bemiparina en este tipo de patología que pueda definir qué dosis es la más apropiada, y de cuál es el perfil de seguridad del fármaco en otras dosis para el tratamiento de este tipo de pacientes.

Para el análisis del efecto utilizamos un criterio de valoración combinado (área y profundidad) de la mejora de la úlcera, establecidos previamente en el protocolo (Rullan

et al., 2003), en lugar de un único punto final sobre la base de la curación completa. Los componentes de nuestro criterio de valoración compuesto (disminución en el grado de profundidad y reducción de área de la úlcera en al menos el 50%) han de ser válidos, ya que la escala de Wagner muestra una asociación significativa entre la disminución del grado y el pronóstico de la úlcera (Van Acker et al., 2002), mientras que la reducción en el área de la úlcera es un buen predictor de la curación completa (Sheehan et al., 2003; Margolis et al., 2003). En el único estudio controlado publicado hasta aquel momento, relacionado con nuestra hipótesis, pero con otra HBPM (dalteparina), también se utilizó un criterio de valoración compuesto (Kalani et al., 2003).

De los resultados

Los resultados finales referentes al objetivo principal (curación de la úlcera) de nuestro ensayo clínico, muestran un tamaño del efecto absoluto (cierre de la úlcera) del 25%, que está cerca del 30% especificado en el protocolo. La variable principal del estudio, el efecto del tratamiento, definido como disminución del área de la úlcera de al menos el 50% y/o una reducción de un grado en la clasificación de Wagner, se produjo en el 70,27% de los pacientes en el brazo de tratamiento con bemiparina versus el 45,5% en el en el brazo placebo, siendo el RR estadísticamente significativo y se necesitan tratar tan sólo cuatro pacientes para observar una mejoría (NNT).

Por todo ello, tras el análisis estadístico por intención de tratar se comprobó la hipótesis de superioridad establecida en el protocolo, demostrándose que bemiparina es más eficaz que el placebo para el tratamiento de las úlceras tórpidas de en las extremidades inferiores del paciente diabético. Esta superioridad fue más manifiesta en pacientes con diabetes más evolucionada, en pacientes con úlceras más severas (grado II), y en pacientes con factores de riesgo cardiovascular añadidos como el caso de hipertensos, dislipémicos y fumadores.

Teniendo en cuenta la tendencia a la cronicidad de este tipo de úlceras, consideramos que el escenario más adecuado para la evaluación de la variable principal fuera la asunción de que todos los datos *missing* fuesen considerados como resultados negativos ya que la mayoría de los abandonos se produjeron por decisión personal del paciente, lo que hace presuponer la percepción subjetiva de falta de eficacia del tratamiento del estudio por parte del paciente. Por esta razón, para las variables principales de eficacia, los datos *missing* se imputaron al peor de los casos, es decir, si la variable es tener o no tener el evento y tener el evento es algo bueno (mejoría), los

valores *missing* se atribuyeron a no tener el evento. Por ello, revisando el análisis de sensibilidad se comprueba que el tratamiento con bemiparina resulta siempre más beneficioso para la evolución de la úlcera, salvo en el caso de imputación de *missing* para el mejor de los casos en el brazo de tratamiento placebo y el peor para el brazo de tratamiento con bemiparina.

La principal limitación del estudio reside en el pequeño tamaño de la muestra, aunque el esfuerzo fuese ímprobo para un equipo investigador de campo limitado, sin remunerar y sin tiempo liberado para ello, que debía compatibilizar su labor de médico y enfermera de atención primaria, revisando hasta 220 pacientes en cualquier punto de Mallorca. De ellos 143 no se incluyeron (90 no cumplían los criterios de inclusión y 53 rechazaron participar en el estudio). En la inclusión de pacientes y en el número de abandonos, incidió el carácter doble ciego del estudio, que obliga el empleo de placebo en administración inyectable diaria, circunstancia aceptada con reparos por los participantes. Limitar el estudio a los centros de atención primaria de la isla también restringió el número potenciales pacientes, pero el promotor fue la Gerencia de Atención Primaria de Mallorca.

El pequeño tamaño de la muestra impidió estratificar suficientemente a los pacientes de los grupos de tratamiento y control, lo que propició que la distribución de ciertas características basales de los sujetos que podían afectar directamente en la evolución de la úlcera, no estuvieran repartidas equitativamente en ambos grupos de tratamiento.

Como muestra la observación de los resultados descritos en la tabla 2 obtenidos en el análisis de las características basales de los sujetos, en el brazo de tratamiento con bemiparina coincidieron un mayor número de sujetos con úlceras en un estadio más avanzado (grado II), con insuficiencia venosa, claudicación intermitente, mayor número de fumadores y más pacientes en tratamiento antiagregante que en el brazo de pacientes tratados con placebo. Con respecto a los parámetros bioquímicos, los niveles de glucosa, hemoglobina glucosilada (HbA1C) y proteinuria eran superiores, aunque no de manera significativa, en el grupo de bemiparina con respecto a placebo. Significa que los pacientes aleatorizados a bemiparina partían de un peor control de la diabetes y mayor riesgo cardiovascular.

No hubo diferencias significativas entre los dos grupos en cuanto a presencia de signos de infección (purulencia, calor, eritema, linfangitis, linfadenopatía, edema, dolor

y pérdida de función) durante la intervención, aunque la rama de bemiparina también fue resultó desafortunada en este aspecto.

Obviamente estas diferencias no desvirtuarían a priori la hipótesis, puesto que, de haber influido, lo harían desfavorablemente en los resultados obtenidos en el brazo de bemiparina.

Al representar los valores del estadio de la úlcera a lo largo del periodo de tratamiento se observa, hasta el día 15, una disminución más acusada en los pacientes tratados con bemiparina, manteniéndose el resto de los días, un perfil similar al de los pacientes tratados con placebo. Posiblemente, dosis más elevadas de bemiparina (3.500 UI/día) durante toda la intervención tengan un efecto más pronunciado sobre la evolución de las úlceras.

Entre los pacientes que llegaron a tener úlcera cicatrizada se observa que entre los días 15 y 45 se producen las mayores diferencias entre las cicatrizaciones con bemiparina y las cicatrizaciones con placebo, lo cual no se ve tan acusadamente entre los 60 y 90 días de tratamiento.

La visita al año se realizó en un total de 52 (74%) de los 70 pacientes incluidos (30 previamente asignados a bemiparina y 22 previamente asignados a placebo, y 50 de ellos (29 con bemiparina y 21 con placebo) fueron evaluables para el estado de la úlcera. De ellos, 31 presentaron curación completa de la úlcera al año: 19/29 (66%) con bemiparina y 12/21 (57%) con placebo.

En nuestro estudio, hubo diferencias entre los dos grupos en términos de edad, el número de fumadores, la presencia de la insuficiencia venosa crónica y en la distribución del grado I y II de las úlceras en la línea de base. Por lo tanto, era necesario llevar a cabo un análisis post-hoc de la heterogeneidad, lo que demostró que el efecto del tratamiento con bemiparina en la mejora de la úlcera era homogénea en todos estos subgrupos.

El efecto de bemiparina fue más significativo en los pacientes con úlcera grado II y la evolución de la úlcera de más de 9 meses. Es de notar que, en este análisis, bemiparina ha alcanzado en un 50% la tasa de curación completa de las úlceras de grado II al cabo de 3 meses y 0% en el grupo placebo.

No hubo diferencias significativas entre bemiparina y placebo en las úlceras grados I, más superficiales; esta observación, en opinión del equipo investigador, puede ser atribuida a la virtuosa ejecución del protocolo de curas por parte la enfermera investigadora, siempre la misma, en el manejo de las úlceras de grado I, más sensibles a la buena práctica en la cura que las más profundas de grado II.

El efecto de bemiparina frente a placebo, con respecto a la mejoría del estado de la úlcera, fue más pronunciado en pacientes de menos de 65 años. Este dato está en consonancia con que los pacientes diabéticos más jóvenes incluidos en el estudio presentaban una enfermedad más evolucionada, peor control de la diabetes y un peor estadio de la úlcera frente a aquellos diabéticos tipo II de mayor edad incluidos en el estudio.

El efecto fue similar en hombres y mujeres, aunque alcanza significación estadística en hombres por el mayor número de estos incluido en el estudio.

La mejoría fue estadísticamente significativa en los pacientes con un coeficiente de isquemia > 0,9 (rango normal) con respecto a los de coeficiente de isquemia < 0,9; por lo que la presencia de grados severos de isquemia ha de ser un factor de peor pronóstico en la curación de la úlcera (Akbari et al., 2010) La superioridad de bemiparina sobre placebo fue similar en aquellos pacientes con o sin isquemia (medible en el ámbito extrahospitalario).

Se observa que bemiparina fue más eficaz que placebo en los pacientes diabéticos con mayor riesgo cardiovascular: fumadores, hipertensos y dislipémicos.

Paradójicamente, los pacientes que recibieron bemiparina y antiagregantes presentaron menor porcentaje de curación completa que los que recibieron únicamente antiagregantes, hecho que puede ser debido al pequeño tamaño muestral de pacientes con placebo y antiagregantes.

El p-valor ajustado indica que la variación de los niveles de glucosa, HbA1C y proteinuria no fue significativamente diferente en ambos grupos durante el período de estudio. Bemiparina tampoco indujo un aumento de los niveles medios de potasio con respecto a los valores basales ni hubo diferencias con respecto a placebo. Tampoco hubo diferencias significativas con respecto al resto de variables bioquímicas.

Los pacientes incluidos en el estudio presentaban úlceras distales de rodilla. Hubiera sido de interés determinar las diferencias en el efecto de bemiparina sobre la curación de la úlcera, tener en cuenta la localización, para poder comprobar si se producían diferentes efectos en aquellas úlceras que se localizaban distales a rodilla o a maléolo teniendo en cuenta la naturaleza de las mismas sea neuropática, isquémica o de estasis. En cualquier caso, la mejoría observada en el brazo de la bemiparina concuerda con la hipótesis de la generalización del daño vascular (Jensen & Deckert, 1992; Donnelly et al., 2000; Prandoni, 2007), y que un tratamiento sistémico dirigido a influir en el aspecto procoagulante de su fisiopatología pudiera mejorar la evolución de la úlcera en cualquier localización (Serra et al, 2012), puesto que la úlcera crónica en el paciente diabético presenta las mismas alteraciones en el proceso de reparación de la herida tanto en el aspecto de la microcirculación periulcerosa (Fagrell, 1982; Williams et al,. 2006) como de la cinética de la restitución del manto celular epidérmico (Loots et al., 1998; Wigington et al., 2004; Williams et al., 2006).

Pese a estas particularidades del estudio, los resultados obtenidos son similares a los que han sido publicados por Kalani (2003). En este ensayo se incluyeron 84 pacientes que fueron tratados con dalteparina (HBPM) a dosis de 5.000 UI/día. Esta dosis es la misma que se recomienda en la profilaxis de alto riesgo de TEVP (que sería alícuota a la dosis de bemiparina 3.500 UI/día), que fue la dosis empleada durante los diez primeros días de inclusión de los pacientes de nuestro estudio. Los pacientes presentaban isquemia franca en todos los casos (índice Tobillo/Brazo menor de 0,6) y fueron tratados con dalteparina o con placebo hasta curación completa de la herida y por un periodo máximo de 6 meses. Los resultados de este estudio revelaron que los pacientes tratados con dalteparina mejoraban más frecuentemente que aquellos tratados con placebo (67% versus 46%). A diferencia de nuestro estudio, el periodo de tratamiento y las dosis empleadas son superiores y los pacientes difieren en sus características basales (presencia de isquemia en todos los casos). A pesar de ello los resultados obtenidos son semejantes a los de nuestro estudio (70% bemiparina versus 45% placebo).

En cuanto a seguridad ninguno de los pacientes incluidos en el estudio fue amputado durante el periodo de tratamiento y no se produjo ningún efecto adverso relacionado con la medicación del estudio. Ninguna de las dos hemorragias durante el estudio (hemorragia mayor post-procedimiento de bypass en el grupo placebo y hemorragia conjuntival menor en el grupo de bemiparina) fue relacionada con la medicación por

parte de los investigadores. Como previamente se había constatado en el proceso de desarrollo clínico y en tiempo post comercialización, bemiparina resultó segura en las dosis y en el periodo de tiempo del estudio. No se notificó ningún caso de trombocitopenia, ni de osteoporosis. Bemiparina fue empleada por los pacientes de forma ambulatoria sin que este régimen de administración supusiera ningún riesgo adicional para el paciente, ni sobrecarga asistencial para el sistema sanitario. El tratamiento fue bien tolerado, y no hubo retiros debidos a reacciones adversas.

El ensayo ha permitido observar diferencias significativas a favor de la HBPM a pesar del pequeño tamaño de la muestra, las particularidades metodológicas y a la asignación aleatoria que concentró en el brazo de la HBPM a más pacientes con peor control de los factores de riesgo cardiovascular y en estadios más avanzados de la úlcera con respecto al brazo placebo. Aun así, la HBPM aportó significativamente más mejorías en grado y área de la úlcera a los tres meses de intervención; también más curaciones completas a los 3 meses, aunque no de manera significativa al año; quizás con un tratamiento más prolongado se hubieran podido detectar diferencias más acusadas y los resultados al año, más esperanzadores.

8. CONCLUSIONES

1. Bemiparina fue más eficaz que placebo en la mejoría de cualquier tipo de úlcera (grado I, II). A los 3 meses fue significativamente más eficaz que placebo en la curación completa de las úlceras grado II.
2. El número de pacientes a tratar para observar una mejoría (NNT) es de 4.
3. La bemiparina es un tratamiento practicable con una seguridad razonable, en el ámbito de la atención primaria, donde se asiste al debut de las complicaciones crónicas de la diabetes y se ejercen las primeras actuaciones; de hecho le otorga validez externa, pues la inclusión de pacientes en la muestra se hizo en pacientes no hospitalizados, a cargo de la atención primaria, procedentes de diversos centros de salud repartidos por toda la isla, con procedimientos de curas heterogéneos y buena parte de ellos sin descarga ortopédica.
4. Este estudio proporciona una "prueba de concepto" de la utilidad potencial de influir con una HBPM en el tratamiento de estos pacientes; para observarlo elegimos las úlceras distales a la rodilla y su curación como objetivo principal.
5. La terapia con bemiparina no influyó en la excreción urinaria de albúmina ni en la función renal.
6. Lamentablemente no se pudo observar el efecto en la retinopatia
7. La atenta observación clínica del médico de familia es una buena fuente de hipótesis, incluso terapéuticas. Con la ayuda metodológica y farmacológica de la propia atención primaria, y gran voluntarismo de los investigadores clínicos, puede acabar plasmándose en ensayos clínicos ejecutados con rigor, y con gran capacidad de trasferencia a la práctica asistencial en problemas de salud tan relevantes para el paciente y la sociedad como el tratado.

Acciones futuras

Los resultados obtenidos animan continuar investigando su efecto en estas úlceras, mediante un ensayo clínico fase III con una muestra suficiente que además permitiera análisis de subgrupos. Hubo un intento en este sentido, al que no fuimos invitados a colaborar, cuyos resultados fueron invalidados por un lamentable sesgo de inclusión. Sin embargo, una reciente revisión de The Cochrane Library respecto la hipótesis considera deseable añadir evidencias con nuevos ensayos y aporta sugerencias metodológicas de cómo realizarlos (Su et al., 2016); un metanálisis de 439 pacientes diabéticos y no diabéticos, encuentra justificación suficiente para recomendar su uso (Huang et al., 2017).

Consideraciones finales

Puntualizar que es difícil pero no imposible llegar a cabo ensayos clínicos farmacológicos independientes en atención primaria con ayuda competitiva del Instituto de Salud Carlos III, la principal agencia de financiación de investigación sanitaria. Para ello es imprescindible contar con una unidad de investigación que dé apoyo metodológico y de gestión del proyecto, y contar en el equipo con la figura de un farmacólogo clínico experto. Circunstancia que fue excepcional en su momento y que es necesario hacerla cada vez más habitual en atención primaria.

Aunque la ciencia médica y la tecnología evolucionan constantemente y sin cesar, hay conceptos anatómicos y fisiológicos bien establecidos desde hace décadas. A pesar de ello, para el médico práctico, las recomendaciones y el papel que juegan los diversos factores en el tratamiento de este problema precisan evidencias y es un área de futura investigación. Esta tesis pretende contribuir, de forma honesta y modesta, a este objetivo y a la mejora de las personas que padecen este invalidante trastorno (conversación personal con el Dr. José María Vicens. Sòller, septiembre de 2018).

Conscientes de la limitada evidencia que aportamos, consideramos que el coste y los posibles inconvenientes del uso prolongado de las HBPM no justifican su uso hasta que haya pruebas sólidas de un efecto clínico relevante como la curación de la úlcera, la reducción de la incidencia de amputaciones y en definitiva, la preservación del bienestar.

9. BIBLIOGRAFÍA

Abcouwer, S. F., & Gardner, T. W. (2014). Diabetic retinopathy: loss of neuroretinal adaptation to the diabetic metabolic environment. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1311*, 174–190. http://doi.org/10.1111/nyas.12412

Abramoff, M. D., Magalhaes, P. J., & Ram, S. J. (2004). Image processing with ImageJ. *Biophotonics Int*. 11: 36–42.

Adler, A. I., Stevens, R. J., Manley, S. E., Bilous, R. W., Cull, C. A., Holman, R. R., & UKPDS Group. (2003). Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64). *Kidney international*, 63(1), 225-232.

Akbari CM, Ait-Oufella, H., Maury, E., Lehoux, S., Guidet, B., &Offenstadt, G. (2010). The endothelium: physiological functions and role in microcirculatory failure during severe sepsis. *Intensivecare medicine*, 36(8), 1286-1298.

Alcalá Martínez, D., Aguayo, J. L., Flores, B., Morales, G., Pérez-Abad, J. M., Alarte, J. M. (2003). Resultados de la hospitalización en pacientes con pie diabético. *Cirugía Española*, 74(2), 92-96.

Alonso, J., Prieto, L., &Anto, J. M. (1995). The Spanish version of the SF-36 Health Survey (the SF-36 health questionnaire): an instrument for measuring clinical results. *Medicinaclínica*, *104*(20), 771-776.

Alphonsus, C. S., &Rodseth, R. N. (2014). The endothelial glycocalyx: a review of the vascular barrier. *Anaesthesia*, *69*(7), 777-784.

American Diabetes Association. (2014). Standards of medical care in diabetes—2014*. Diabetes care, 37(Supplement 1)*, S14-S80.

American Diabetes Association. (2016). 8. Cardiovascular disease and risk management. Diabetes care, 39(Supplement 1), S60-S71.

Antiplatelet Trialists' Collaboration. (1994). Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy Prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *Bmj*, *308*(6921), 81-106.

Aoki, Y., Yazaki, K., Shirotori, K., Oguchi, H., Kiyosawa, K., &Furuta, S. (1992). Insulin-dependent diabetes mellitus showing microangiopathic hemolytic anemia and chronic disseminated intravascular coagulation. *Internal Medicine*, *31*(11), 1310-1312.

Artico, M., Massa, R., Cavallotti, D., Franchitto, S., &Cavallotti, C. (2002). Morphological changes in the sciatic nerve of diabetic rats treated with low molecular weight heparin OP 2123/parnaparin. *Anatomia, histologia, embryologia*, *31*(4), 193-197.

Aso, Y., Matsumoto, S., Fujiwara, Y., Tayama, K., Inukai, T., &Takemura, Y. (2002). Impaired fibrinolytic compensation for hypercoagulability in obese patients with type 2 diabetes: association with increased plasminogen activator inhibitor-1. *Metabolism-Clinical and Experimental*, *51*(4), 471-476.

Baigent, C., Blackwell, L., Collins, R., Emberson, J., Godwin, J., Peto, R., Patrono, C. (2009). Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *Lancet*, 373(9678), 1849-60.

Banting, F. G., Best, C. H., Collip, J. B., Campbell, W. R., & Fletcher, A. A. (1922). Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. *Canadian Medical Association Journal*, *12*(3), 141.

Barnett, D. M., & Krall, L. P. (2005). The history of diabetes. *Joslin's Diabetes Mellitus*. 14th edition. p, 1-17.

Barr, E. L., Zimmet, P. Z., Welborn, T. A., Jolley, D., Magliano, D. J., Dunstan, D. W., Wong, T. Y. (2007). Risk of cardiovascular and all-cause mortality in individuals with diabetes mellitus, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance. *Circulation*, 116(2), 151-157.

Barzu, T., Molho, P., Tobelem, G., Petitou, M., & Caen, J. P. (1984). Binding of heparin and low molecular weight heparin fragments to human vascular endothelial cells in culture. *Nouvelle revue françaised'Hématologie*, *26*(4), 243-247.

Baum, O., & Bigler, M. (2016). Peri-capillary basement membrane thickening in human skeletal muscles. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, ajpheart-00048.

Becker, B. F., Chappell, D., Bruegger, D., Annecke, T., & Jacob, M. (2010). Therapeutic strategies targeting the endothelial glycocalyx: acute deficits, but great potential. *Cardiovascular research*, 87(2), 300-310. [11].

Berengué, M. D., Birules, M., Bobé, I., Bundó, M., Cano, J. F., Cos, X., & Franch, J. (2000). Guia para el tratamiento de la diabetes tipo II en atención primaria.

Binkley, G. W. (1965). Dermopathy in the diabetic syndrome. *Archives of dermatology*, *92*(6), 625-634.

Blanes, J. I. (2011). Consensus document on treatment of infections in diabetic foot. *Rev EspQuimioter*, *24*(4), 233-262.

Black, C. T., Hennessey, P. J., & Andrassy, R. J. (1990). Short-term hyperglycemia depresses immunity through nonenzymatic glycosylation of circulating immunoglobulin. *TheJournalof trauma*, *30*(7), 830-2.

Bleicher, L. F. (2000). Desarrollo de una nueva heparina de baja masa molecular, Bemiparina: farmacocinética y farmacodinamia. UniversitatAutònoma de Barcelona.

Bolaman, Z., Kok, F., Kadikoylu, G., Kiylioglu, N., Guney, E., &Akyol, A. (2007). The changes of coagulation parameters and microvascular complications in diabetes mellitus. *The Endocrinologist*, 17(4), 196-199.

Boulton, M., Foreman, D., Williams, G., & McLeod, D. (1998). VEGF localisation in diabetic retinopathy. *British Journal of Ophthalmology*, *82*(5), 561-568.

Bourin, M. C., & Lindahl, U. (1993). Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation. *Biochemical Journal*, 289(Pt 2), 313.

Brem, H., &Tomic-Canic, M. (2007). Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *The Journal of clinical investigation*, *117*(5), 1219-1222.

Britland, S. T., Young, R. J., Sharma, A. K., & Clarke, B. F. (1990). Relationship of endoneurial capillary abnormalities to type and severity of diabetic polyneuropathy. *Diabetes*, *39*(8), 909-913.

Brownlee, MD, M. (1995). Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annual review of medicine*, *46*(1), 223-234.

Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic

complications. *Nature*, *414*(6865), 813.

Caballero, S., Sengupta, N., Afzal, A., Chang, K. H., Calzi, S. L., Guberski, D. L., ... & Grant, M. B. (2007). Ischemic vascular damage can be repaired by healthy, but not diabetic, endothelial progenitor cells. *Diabetes*, *56*(4), 960-967.

Cagliero, E., Maiello, M., Boeri, D., Roy, S., & Lorenzi, M. (1988). Increased expression of basement membrane components in human endothelial cells cultured in high glucose. *The Journal of clinical investigation*, 82(2), 735-738.

Candrilli, S. D., Davis, K. L., Kan, H. J., Lucero, M. A., &Rousculp, M. D. (2007). Prevalence and the associated burden of illness of symptoms of diabetic peripheral neuropathy and diabetic retinopathy. *Journal of Diabetes and its Complications*, 21(5), 306-314.

Cano, H., Hernández-Espinosa, D., Miñano, A., Del Rey, M. L., Illán, F., Alcaraz, M. S., ...&Corral, J. (2005). Glucación no enzimática de la antitrombina. Implicaciones en el riesgo trombótico de pacientes con diabetes mellitus. *Clínica e investigación en arteriosclerosis*, 17(5), 203-212.

Carr, M. E. (2001). Diabetes mellitus: a hypercoagulablestate. *Journal of Diabetes and its Complications*, *15*(1), 44-54.

Casu, B. (1990). Heparin structure. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, *20*(Suppl. 1), 62-73.

Ceriello, A., Giugliano, D., Quatraro, A., Stante, A., Consoli, G., Russo, P. D., & D'Onofrio, F. (1986). Heparin preserves antithrombin III biological activity from hyperglycemia-induced alterations in insulin-dependent diabetics. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, *16*(6), 458-464.

Ceriello, A. (1993). Coagulation activation in diabetes mellitus: the role of hyperglycaemia and therapeutic prospects. *Diabetologia*, *36*(11), 1119-1125.

Ceriello, A., Giugliano, D., Quatraro, A., Marchi, E., Barbanti, M., & Lefebvre, P. (1990). Evidence for a hyperglycaemia-dependent decrease of antithrombin III-thrombin complex formation in humans. *Diabetologia*, *33*(3), 163-167.

Chalmers, J., & Cooper, M. E. (2008). UKPDS and the legacy effect. *New England Journal of Medicine*, *359*(15), 1618.

Chen, E., Looman, M., Laouri, M., Gallagher, M., Van Nuys, K., Lakdawalla, D., &Fortuny, J. (2010). Burden of illness of diabetic macular edema: literature review. *Current medical research and opinion*, *26*(7), 1587-1597.

ClinicalTrials.gov. Clinical Trial to Evaluate the Efficacy and Safety of Sodium Bemiparin for Treating Ulcers in Diabetic Foot [online]. Available from URL: http://www.clinicaltrials.gov/ct/gui/show/ NCT00448903 (Accessed May 19, 2008)

Cohen, I., Burk, D., Fullerton, R. J., Veis, A., & Green, D. (1989). Nonenzymatic glycation of human blood platelet proteins. *Thrombosis research*, *55*(3), 341-349.

Cohen, Z., Gonzales, R. F., Davis-Gorman, G. F., Copeland, J. G., & McDonagh, P. F. (2002). Thrombin activity and platelet microparticle formation are increased in type 2 diabetic platelets: a potential correlation with caspase activation. *Thrombosis research*, *107*(5), 217-221.

Constantinescu, A. A., Vink, H., &Spaan, J. A. (2003). Endothelial cell glycocalyx modulates immobilization of leukocytes at the endothelial surface. *Arteriosclerosis, thrombosis, and*

vascular biology, 23(9), 1541-1547.

Cosson, E., Paycha, F., Tellier, P., Sachs, R. N., Ramadan, A., Pariés, J., ...&Valensi, P. (2000, August). Defects of the blood perfusion of the lower limbs may be due to microvascular disorders in diabetic patients. In *Diabetologia* (Vol. 43, pp. A274-A274).

Creager, M. A., Lüscher, T. F., Cosentino, F., & Beckman, J. A. (2003). Diabetes and vascular disease. *Circulation*, 108(12), 1527-1532.

Davis M. D., Fisher, M. R., Gangnon, R. E., Barton, F., Aiello, L. M., Chew, E. Y., ...&Knatterud, G. L. (1998). Risk factors for high-risk proliferative diabetic retinopathy and severe visual loss: Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Report# 18. Investigative ophthalmology & visual science, 39(2), 233-252.

Deckert, T., Feldt-Rasmussen, B., Borch-Johnsen, K., Jensen, T., &Kofoed-Enevoldsen, A. (1989). Albuminuria reflects widespread vascular damage. *Diabetologia*, *32*(4), 219-226.

Deckert, T., Horowitz, I. M., Kofoed-Enevoldsen, A., Kjellén, L., Deckert, M., Lykkelund, C., &Burcharth, F. (1991). Possible genetic defects in regulation of glycosaminoglycans in patients with diabetic nephropathy. *Diabetes*, *40*(6), 764-770. 764-770.

Devaraj, S., Cheung, A. T., Jialal, I., Griffen, S. C., Nguyen, D., Glaser, N., & Aoki, T. (2007). Evidence of increased inflammation and microcirculatory abnormalities in patients with type 1 diabetes and their role in microvascular complications. *Diabetes*, *56*(11), 2790-2796.

Diabetes Control and Complications Trial Research Group. (1993). The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *New England journal of medicine*, *329*(14), 977-986.

Ding, J., & Wong, T. Y. (2012). Current epidemiology of diabetic retinopathy and diabetic macular edema. *Current diabetes reports*, *12*(4), 346-354.

Domingueti, C. P., Dusse, L. M. S. A., das Graças Carvalho, M., de Sousa, L. P., Gomes, K. B., & Fernandes, A. P. (2016). Diabetes mellitus: the linkage between oxidative stress, inflammation, hypercoagulability and vascular complications. *Journal of Diabetes and its Complications*, *30*(4), 738-745.

Donnelly R, Emslie-Smith AM, Gardner ID, Morris AD (2000). Vascular complications of diabetes. BMJ: *British Medical Journal*, 320(7241), 1062.

Duby J. J., Campbell R. K., Setter S. M., White J. R., Rasmussen K. A. (2004) Diabetic neuropathy: an intensive review. *Am. J. Health Syst. Pharm*. 61:160–173.

Dyck, P. J., & Giannini, C. (1996). Pathologic alterations in the diabetic neuropathies of humans: a review. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, *55*(12), 1181-1193.

Egeberg, O. (1963). The blood coagulability in diabetic patients. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, 15(5), 533-538.

Elgzyri, T., Larsson, J., Nyberg, P., Thörne, J., Eriksson, K. F., &Apelqvist, J. (2015). Reconstructive vascular surgery and the extent of tissue damage due to diabetic foot ulcers relates to risk of new ulceration in patients with PAD. *Journal of wound care*, *24*(12), 590-597.

El-Osta, A., Brasacchio, D., Yao, D., Pocai, A., Jones, P. L., Roeder, R. G., & Brownlee, M. (2008). Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. *Journal of Experimental Medicine*, 205(10), 2409-2417.

Engerman, R. L. (1989). Pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes*, *38*(10), 1203-1206.

Fagrell, B. (1982). Microcirculatory disturbances-the final cause for venous leg ulcers? *VASA. ZeitschriftfürGefässkrankheiten*, 11(2), 101.

Feener, E. P., & King, G. L. (1997). Vascular dysfunction in diabetes mellitus. *The Lancet*, *350*, S9-S13.

For the Diabetes, T. W. T., & Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. (2002). Effect of intensive therapy on the microvascular complications of type 1 diabetes mellitus. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, *287*(19), 2563.

Frade, L. G., De La Calle, H., Alava, I., Navarro, J. L., Creighton, L. J., & Gaffney, P. J. (1987). Diabetes mellitus as a hypercoagulable state: its relationship with fibrin fragments and vascular damage. *Thrombosis research*, 47(5), 533-540.

Frykberg, R. G., Zgonis, T., Armstrong, D. G., Driver, V. R., Giurini, J. M., Kravitz, S. R. &Wukich, D. K. (2006). Diabetic foot disorders: a clinical practice guideline (2006 revision). *The journal of foot and ankle surgery*, 45(5), S1-S66.

Fukuda, K., Kanazawa, H., Aizawa, Y., Ardell, J. L., &Shivkumar, K. (2015). Cardiac innervation and sudden cardiac death. *Circulation research*, *116*(12), 2005-2019.

Fuller, J. H., Keen, H., Jarrett, R. J., Omer, T., Meade, T. W., Chakrabarti, R & Stirling, Y. (1979). Haemostatic variables associated with diabetes and its complications. *Br Med J*, 2(6196), 964-966.

Gæde, P., Oellgaard, J., Carstensen, B., Rossing, P., Lund-Andersen, H., Parving, H. H., & Pedersen, O. (2016). Years of life gained by multifactorial intervention in patients with type 2 diabetes mellitus and microalbuminuria: 21 years follow-up on the Steno-2 randomised trial. *Diabetologia*, 59(11), 2298-2307.

Gallagher, J. T. (2001). Heparan sulfate: growth control with a restricted sequence menu. *The Journal of clinical investigation*, 108(3), 357-361.

Gan, Y. H. (2013). Host susceptibility factors to bacterial infections in type 2 diabetes. *PLoSPathog*, 9(12), e1003794.

Garbaruchuk, O. I., &Malyzhev, V. O. (1998). The effect of heparin on the functioning of the hemostasis system in patients with insulin-dependent diabetes mellitus in severe forms of diabetic foot. *Ukrainskiibiokhimicheskiizhurnal (1978)*, *70*(5), 111-116.

Gerstein, H. C., Mann, J. F., Yi, Q., Zinman, B., Dinneen, S. F., Hoogwerf, B., ...& Nawaz, S. (2001). Albuminuria and risk of cardiovascular events, death, and heart failure in diabetic and nondiabetic individuals. Jama, 286(4), 421-426.

Gérvas, J. (2011). Diabetes: gasto, proceso y resultado en España. Calidad con amputaciones. *Atención primaria*, *43*(4), 174-175.

Gil-Ortega, I., &Kaski, J. C. (2006). Miocardiopatía diabética. *Medicina clínica*, *127*(15), 584-594.

Goff, D. C., Lloyd-Jones, D. M., Bennett, G., Coady, S., D'agostino, R. B., Gibbons, R., ...&Robinson, J. G. (2014). 2013 ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Journal of the American College of Cardiology*, *63*(25 Part B), 2935-2959.

Goldberg, R. B. (2009). Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *94*(9), 3171-3182.

Goldin, A., Beckman, J. A., Schmidt, A. M., & Creager, M. A. (2006). Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*, *114*(6), 597-605.

Gonçalves, N. P., Vægter, C. B., &Pallesen, L. T. (2018). Peripheral Glial Cells in the Development of Diabetic Neuropathy. *Frontiers in Neurology*, *9*, 268. http://doi.org/10.3389/fneur.2018.00268

Gottrup, F., &Apelqvist, J. (2012). Present and new techniques and devices in the treatment of DFU: a critical review of evidence. *Diabetes/metabolism research and reviews*, *28*(S1), 64-71.

Grant, P. J. (2007). Diabetes mellitus as a prothrombotic condition. *Journal of internal medicine*, *262*(2), 157-172.

Gray, E., Mulloy, B., Barrowcliffe, T. W. (2008). Heparin and low-molecular-weight heparin. *Thrombosis and Haemostasis-Stuttgart-*, 99(5), 807.

Greene, D. A., Lattimer, S. A., &Sima, A. A. (1987). Sorbitol, phosphoinositides, and sodium-potassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complications. *New England Journal of Medicine*, *316*(10), 599-606.

Grigsby, J. G., Cardona, S. M., Pouw, C. E., Muniz, A., Mendiola, A. S., Tsin, A. T., ... & Cardona, A. E. (2014). The role of microglia in diabetic retinopathy. *Journal of ophthalmology*, *2014*.

Hammes, H. P., Lin, J., Renner, O., Shani, M., Lundqvist, A., Betsholtz, C., ...& Deutsch, U. (2002). Pericytes and the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes*, *51*(10), 3107-3112.

Hehenberger, K., Kratz, G., Hansson, A., &Brismar, K. (1998). Fibroblasts derived from human chronic diabetic wounds have a decreased proliferation rate, which is recovered by the addition of heparin. *Journalofdermatologicalscience*, *16*(2), 144-151.

Hernández-Arteaga, K., Soto-Abraham, V., Pérez-Navarro, M., de León-Garza, B., Rodríguez-Matías, A., Olvera-Soto, M. G., & Valdez-Ortiz, R. (2018). Thrombotic microangiopathy in patients with diabetic nephropathy is associated with low VEGF expression and end-stage renal disease. *Clinical nephrology*, *89*(6), 429-437.

Hicks, C. W., Selvarajah, S., Mathioudakis, N., Perler, B. A., Freischlag, J. A., Black, J. H., &Abularrage, C. J. (2014). Trends and determinants of costs associated with the inpatient care of diabetic foot ulcers. *Journal of vascular surgery*, 60(5), 1247-1254.

Hinchliffe, R. J., Valk, G. D., Apelqvist, J., Armstrong, D. G., Bakker, K., Game, F. L., ... &Jeffcoate, W. J. (2008). A systematic review of the effectiveness of interventions to enhance the healing of chronic ulcers of the foot in diabetes. *Diabetes/metabolism research and reviews*, *24*(S1).

Hirsh, J., & Levine, M. N. (1992). Low molecular weight heparin. *Blood*, *79*(1), 1-17.

Hoffstad, O., Mitra, N., Walsh, J., & Margolis, D. J. (2015). Diabetes, lower-extremity amputation, and death. *Diabetes Care*, 38(10), 1852-1857.

Howell, W. H. (1922). Heparin, an anticoagulant. Am J Physiol, 63(434-435), 3.

Huang, C. Y., & Choong, M. Y. (2017). Is low-molecular-weight heparin beneficial to chronic ulcers? A meta-analysis of randomised control trials. *International Wound Journal*.

Hwang, D. J., Lee, K. M., Park, M. S., hee Choi, S., Park, J. I., Cho, J. H., ... & Woo, S. J. (2017). Association between diabetic foot ulcer and diabetic retinopathy. *PloS one*, *12*(4), e0175270.

Jensen T. Pathogenesis of diabetic vascular disease: evidence for the role of reduced heparan sulfate proteoglycan. Diabetes 1997, 46: suppl 2:98-99.

Jensen, T., &Deckert, T. (1992). Diabetic retinopathy, nephropathy and neuropathy. Generalized vascular damage in insulin-dependent diabetic patients. *Hormone and metabolic research. Supplement series*, *26*, 68-70.

Joannides, R., Haefeli, W. E., Linder, L., Richard, V., Bakkali, E. H., Thuillez, C., &Lüscher, T. F. (1995). Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*, *91*(5), 1314-1319.

Jörneskog, G., Brismar, K., &Fagrell, B. (1993). Low molecular weight heparin seems to improve local capillary circulation and healing of chronic foot ulcers in diabetic patients. *VASA. Zeitschrift fur Gefasskrankheiten*, *22*(2), 137-142.

Kabedev, A., &Lobaskin, V. (2018). Structure and elasticity of bush and brush-like models of the endothelial glycocalyx. *Scientific reports*, 8(1), 240.

Kalani, M., Apelqvist, J., Blombäck, M., Brismar, K., Eliasson, B., Eriksson, J. W., ...&Jörneskog, G. (2003). Effect of dalteparin on healing of chronic foot ulcers in diabetic patients with peripheral arterial occlusive disease: a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Diabetes care*, *26*(9), 2575-2580.

Kalani, M., Silveira, A., Blombäck, M., Apelqvist, J., Eliasson, B., Eriksson, J. W., ...&Jörneskog, G. (2007). Beneficial effects of dalteparin on haemostatic function and local tissue oxygenation in patients with diabetes, severe vascular disease and foot ulcers. *Thrombosis research*, *120*(5), 653-661.

Kim, H. K., Kim, J. E., Park, S. H., Kim, Y. I., Nam-Goong, I. S., & Kim, E. S. (2014). High coagulation factor levels and low protein C levels contribute to enhanced thrombin generation in patients with diabetes who do not have macrovascular complications. *Journal of Diabetes and its Complications*, 28(3), 365-369.

Kimmelstiel, P., & Wilson, C. (1936). Intercapillary lesions in the glomeruli of the kidney. The *American journal of pathology*, 12(1), 83.

Klein, B. E., Knudtson, M. D., Tsai, M. Y., & Klein, R. (2009). The relation of markers of inflammation and endothelial dysfunction to the prevalence and progression of diabetic retinopathy: Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. *Archives of Ophthalmology*, 127(9), 1175-1182.

Kolluru, G. K., Bir, S. C., & Kevil, C. G. (2012). Endothelial dysfunction and diabetes: effects on angiogenesis, vascular remodeling, and wound healing. *International journal of vascular medicine*, 2012.

Kreisberg, J. I., & Ayo, S. H. (1993). The glomerular mesangium in diabetes mellitus. *Kidneyinternational*, *43*(1), 109-113.

La Selva, M., Beltramo, E., Passera, P., Porta, M., &Molinatti, G. M. (1993). The role of endothelium in the pathogenesis of diabetic microangiopathy. Acta diabetologica, 30(4), 190-200.

Lapolla, A., Piarulli, F., Sartore, G., Rossetti, C., Martano, L., Carraro, P., ...&Fedele, D. (2003).

Peripheral artery disease in type 2 diabetes: the role of fibrinolysis. *Thrombosis and haemostasis*, *89*(01), 91-96.

Lawson, C., & Wolf, S. (2009). ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacological Reports*, *61*(1), 22-32.

Leone, S., Pascale, R., Vitale, M., & Esposito, S. (2012). Epidemiology of diabetic foot. *Infez Med*, *20*(Suppl 1), 8-13.

Lindahl, U., Feingold, D. S., &Rodén, L. (1986). Biosynthesis of heparin. *Trends in biochemical sciences*, *11*(5), 221-225.

Lipowsky, H. H., &Lescanic, A. (2017). Inhibition of inflammation induced shedding of the endothelial glycocalyx with low molecular weight heparin. *Microvascular research*, *112*, 72-78.

Lipsky, B. A., Peters, E. J. G., Senneville, E., Berendt, A. R., Embil, J. M., Lavery, L. A., ... &Jeffcoate, W. J. (2012). Expert opinion on the management of infections in the diabetic foot. *Diabetes/metabolism research and reviews*, *28*(S1), 163-178.

LoGerfo, F. W., & Gibbons, G. W. (1996). Vascular disease of the lower extremities in diabetes mellitus. *Endocrinology and Metabolism Clinics*, *25*(2), 439-445.

Löndahl, M., Katzman, P., Hammarlund, C., Nilsson, A., & Landin-Olsson, M. (2011). Relationship between ulcer healing after hyperbaric oxygen therapy and transcutaneous oximetry, toe blood pressure and ankle–brachial index in patients with diabetes and chronic foot ulcers. *Diabetologia*, *54*(1), 65-68.

Loomans, C. J., de Koning, E. J., Staal, F. J., Rookmaaker, M. B., Verseyden, C., de Boer, H. C., ... & van Zonneveld, A. J. (2004). Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes. *Diabetes*, *53*(1), 195-199.

Loots, M. A., Lamme, E. N., Zeegelaar, J., Mekkes, J. R., Bos, J. D., &Middelkoop, E. (1998). Differences in cellular infiltrate and extracellular matrix of chronic diabetic and venous ulcers versus acute wounds. *Journal of Investigative Dermatology*, 111(5), 850-857.

Lorenzi, M., &Cagliero, E. (1991). Pathobiology of endothelial and other vascular cells in diabetes mellitus: call for data. *Diabetes*, 40(6), 653-659.

McLean, J. (1916). The thromboplastic action of cephalin. American *Journal of Physiology-Legacy Content*, 41(2), 250-257

Madan, R., Gupt, B., Saluja, S., Kansra, U. C., Tripathi, B. K., &Guliani, B. P. (2010). Coagulation profile in diabetes and its association with diabetic microvascular complications. *J Assoc Physicians India*, *58*, 481-484.

Mahmood, S., Lew, E., & Armstrong, D. G. (2015). Offloading diabetic foot ulcers: Updates by the International Working Group on the Diabetic Foot. *The Diabetic Foot Journal*, *18*

Marcum, J. A., & Rosenberg, R. D. (1987, October). Anticoagulantly active heparan sulfate proteoglycan and the vascular endothelium. In *Seminars in thrombosis and hemostasis* (Vol. 13, No. 04, pp. 464-474). Copyright© 1987 by Thieme Medical Publishers, Inc.

Margolis, D. J., Gelfand, J. M., Hoffstad, O., & Berlin, J. A. (2003). Surrogate end points for the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers. *Diabetes Care*, *26*(6), 1696-1700.

Martin, C. L., Albers, J. W., Pop-Busui, R., & DCCT/EDiC research Group. (2014). Neuropathy and related findings in the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes

interventions and complications study. *Diabetes Care*, 37(1), 31-38.

Masmiquel, L., Burgos Peláez, R., & Simó Canonge, R. (1997). Membrana basal y diabetes mellitus. *Medicina clínica*, *109*(8), 302-310.

Mirhoseini, M., Saleh, N., Momeni, A., Deris, F., &Asadi-Samani, M. (2016). A study on the association of diabetic dermopathy with nephropathy and retinopathy in patients with type 2 diabetes mellitus. Journal of nephropathology, 5(4), 139.

Morgan, A. J., & Schwartz, R. A. (2008). Diabetic dermopathy: A subtle sign with grave implications. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *58*(3), 447-451.

Moss, S. E., Klein, R., & Klein, B. E. (1992). The prevalence and incidence of lower extremity amputation in a diabetic population. *Archives of internal medicine*, *152*(3), 610-616.

Muona, P., Peltonen, J., Jaakkola, S., &Uitto, J. (1991). Increased matrix gene expression by glucose in rat neural connective tissue cells in culture. *Diabetes*, *40*(5), 605-611.

Myrup, B., Hansen, P. M., Kofoed-Enevoldsen, A., Feldt-Rasmussen, B., Deckert, T., Jensen, T., ...&Kluft, C. (1995). Effect of low-dose heparin on urinary albumin excretion in insulin-dependent diabetes mellitus. *The Lancet*, *345*(8947), 421-422.

Nader, H. B., Buonassisi, V., Colburn, P., & Dietrich, C. P. (1989). Heparin stimulates the synthesis and modifies the sulfation pattern of heparan sulfate proteoglycan from endothelial cells. *Journal of cellular physiology*, *140*(2), 305-310.

Nakagawa, T., Tanabe, K., Croker, B. P., Johnson, R. J., Grant, M. B., Kosugi, T., & Li, Q. (2011). Endothelial dysfunction as a potential contributor in diabetic nephropathy. Nature Reviews Nephrology, 7(1), 36-44.

Natarajan, A., Zaman, A. G., & Marshall, S. M. (2008). Platelet hyperactivity in type 2 diabetes: role of antiplatelet agents. *Diabetes and Vascular Disease Research*, *5*(2), 138-144.).

Nathan, D. M., & DCCT/Edic Research Group. (2014). The diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study at 30 years: overview. *Diabetes care*, *37*(1), 9-16.

Nawroth, P. P., & Stern, D. M. (1985). A pathway of coagulation on endothelial cells. *Journal of cellular biochemistry*, *28*(4), 253-264.

NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC)*
Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4·4 million participants. Lancet 2016; 387: 1513–30
http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736 (16)00618-8

Nieuwdorp, M., van Haeften, T. W., Gouverneur, M. C., Mooij, H. L., van Lieshout, M. H., Levi, M., ... &Kastelein, J. J. (2006). Loss of endothelial glycocalyx during acute hyperglycemia coincides with endothelial dysfunction and coagulation activation in vivo. *Diabetes*, 55(2), 480-486.26, 44

Nogami, K., Muraki, I., Imano, H., & Iso, H. (2017). Risk of disseminated intravascular coagulation in patients with type 2 diabetes mellitus: retrospective cohort study. *BMJ open*, *7*(1), e013894.

Nowak, C., Sundström, J., Gustafsson, S., Giedraitis, V., Lind, L., Ingelsson, E., &Fall, T. (2015). Protein biomarkers for insulin resistance and type 2 diabetes risk in two large community

cohorts. *Diabetes*, db150881.

O'Brien, P. J., Cox, M. W., Shortell, C. K., & Scarborough, J. E. (2013). Risk factors for early failure of surgical amputations: an analysis of 8,878 isolated lower extremity amputation procedures. *Journal of the American College of Surgeons*, 216(4), 836-842.

Ogawa, H., Nakayama, M., Morimoto, T., Uemura, S., Kanauchi, M., Doi, N., & Japanese Primary Prevention of Atherosclerosis With Aspirin for Diabetes (JPAD) Trial Investigators. (2008). Low-dose aspirin for primary prevention of atherosclerotic events in patients with type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *Jama*, 300(18), 2134-2141.).

Osende, J. I., Badimon, J. J., Fuster, V., Herson, P., Rabito, P., Vidhun, R., ...&Heflt, G. (2001). Blood thrombogenicity in type 2 diabetes mellitus patients is associated with glycemic control. *Journal of the American College of Cardiology*, *38*(5), 1307-1312.

Østergaard, L., Finnerup, N. B., Terkelsen, A. J., Olesen, R. A., Drasbek, K. R., Knudsen, L., ... & Christiansen, J. S. (2015). The effects of capillary dysfunction on oxygen and glucose extraction in diabetic neuropathy. *Diabetologia*, *58*(4), 666-677.

Østerby, R. (1992). Glomerular structural changes in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: causes, consequences, and prevention. *Diabetologia*, *35*(9), 803-812.

Otero-Siliceo, E., & Ruano-Calderón, L. A. (2003). Neuropatía diabética:¿ una enfermedad vascular?. *Revista de neurología*, *37*(7), 658-661.

Parving, H. H., Gall, M. A., Skøtt, P., Jørgensen, H. E., Løkkegaard, H., Jørgensen, F., ...&Larsen, S. (1992). Prevalence and causes of albuminuria in non-insulin-dependent diabetic patients. *Kidney international*, 41(4), 758-762.

Paulsson, M. (1992). Basement membrane proteins: structure, assembly, and cellular interactions. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, *27*(1-2), 93-127.

Perk, J., De Backer, G., Gohlke, H., Graham, I., Reiner, Ž., Verschuren, M., ... & Deaton, C. (2012). European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). *European heart journal*, 33(13), 1635-1701.

Pham, H. T., Economides, P. A., &Veves, A. (1998). The role of endothelial function on the foot. Microcirculation and wound healing in patients with diabetes. *Clinics in podiatric medicine and surgery*, *15*(1), 85-93.

Pickwell, K., Siersma, V., Kars, M., Apelqvist, J., Bakker, K., Edmonds, M., ...&Piaggesi, A. (2015). Predictors of lower-extremity amputation in patients with an infected diabetic foot ulcer. *Diabetes Care*, *38*(5), 852-857.

Pober, J. S., &Cotran, R. S. (1990). Cytokines and endothelial cell biology. *Physiological reviews*, *70*(2), 427-451.

Pop-Busui, R., Lu, J., Lopes, N., & Jones, T. L. (2009). Prevalence of diabetic peripheral neuropathy and relation to glycemic control therapies at baseline in the BARI 2D cohort. *Journal of the Peripheral Nervous System*, *14*(1), 1-13.

Porta, M., La Selva, M., Bertagna, A., &Molinatti, G. M. (1988). High glucose concentrations inhibit DNA synthesis and replication without causing death or impairing injury repair in cultured human endothelial cells. *Diabetes research (Edinburgh, Scotland)*, 7(2), 59-63.

Prandoni, P. (2007). Links between arterial and venous disease. *Journal of internal medicine*, *262*(3), 341-350.

Preil, S. A., Kristensen, L. P., Beck, H. C., Jensen, P. S., Nielsen, P. S., Steiniche, T., ... & Rasmussen, L. M. (2015). Quantitative proteome analysis reveals increased content of basement membrane proteins in arteries from patients with type 2 diabetes mellitus and lower levels among metformin users. *Circulation: Genomic and Precision Medicine*, *8*(5), 727-735.

Prompers, L., Huijberts, M., Apelqvist, J., Jude, E., Piaggesi, A., Bakker, K., ...&Tennvall, G. R. (2007). High prevalence of ischaemia, infection and serious comorbidity in patients with diabetic foot disease in Europe. Baseline results from the Eurodiale study. *Diabetologia*, *50*(1), 18-25.

Prompers, L., Schaper, N., Apelqvist, J., Edmonds, M., Jude, E., Mauricio, D., ...&Jirkovska, A. (2008). Prediction of outcome in individuals with diabetic foot ulcers: focus on the differences between individuals with and without peripheral arterial disease.TheEURODIALE Study. Diabetologia, 51(5), 747-755.

Pugliese, G., Pricci, F., Locuratolo, N., Romeo, G., Romano, G., Gianninr, S., ...&Di Mario, U. (1996). Increased activity of the insulin-like growth factor system in mesangial cells cultured in high glucose conditions. Relation to glucose-enhanced extracellular matrix production. *Diabetologia*, *39*(7), 775-784.

Raats, C. I., Van Den Born, J., &Berden, J. H. (2000). Glomerular heparan sulfate alterations: mechanisms and relevance for proteinuria. *Kidney international*, *57*(2), 385-400.

Reddy, M. A., & Natarajan, R. (2011). Epigenetic mechanisms in diabetic vascular complications. *Cardiovascular research*, *90*(3), 421-429.

Rogers, L. C., Frykberg, R. G., Armstrong, D. G., Boulton, A. J., Edmonds, M., Van, G. H., ...& Jude, E. (2011). The Charcot foot in diabetes. Diabetes Care, 34(9), 2123-2129.

Roy, S., Maiello, M., &Lorenzi, M. (1994). Increased expression of basement membrane collagen in human diabetic retinopathy. Journal of Clinical Investigation, 93(1), 438.

Rullan, M., Cerda, L., Frontera, G., &Llobera, J. (2002). Diabetic foot ulcers and treatment with low molecular weight heparin. *Medicina clinica*, *118*(19), 757-757.

Rullán, M., Cerdà, L., Frontera, G., Llobera, J., Masmiquel, L., & Olea, J. L. (2003). Triple-blind clinical trial with placebo control to evaluate the efficacy of a heparin of low molecular weight (bemiparin) for treating slow-responding ulcers in diabetic foot in primary care. *Atencion primaria*, *31*(8), 539-544.

Rullan, M., Cerdà, L., Frontera, G., Masmiquel, L., & Llobera, J. (2008). Treatment of chronic diabetic foot ulcers with bemiparin: a randomized, triple-blind, placebo-controlled, clinical trial. *Diabetic medicine*, *25*(9), 1090-1095.

Rutllant M, Fontcuberta J, Martínez Jubitera J, Borrell M.(1986) The influence of low molecular weight heparin or standard heparin on fibrinolysis [resumen]. Fibrinolysis. VIII Internacional Congress 1986; 205

Sasisekharan, R., Venkataraman, G. (2000). Heparin and heparan sulfate: biosynthesis, structure and function. *Current opinion in chemical biology*, 4(6), 626-631.

Schalkwijk, C. G., &Stehouwer, C. D. (2005). Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clinical science*, *109*(2), 143-159.

Schaper, N. C., Apelqvist, J., & Bakker, K. (2012). Reducing lower leg amputations in diabetes: a challenge for patients, healthcare providers and the healthcare system. *Diabetologia*, *55*(7), 1869-1872.

Schaper, N. C., Van Netten, J. J., Apelqvist, J., Lipsky, B. A., Bakker, K., & International Working Group on the Diabetic Foot. (2017). Prevention and management of foot problems in diabetes: a Summary Guidance for Daily Practice 2015, based on the IWGDF Guidance Documents. *Diabetes research and clinical practice*, 124, 84-92.

Schittny, J. C., &Yurchenco, P. D. (1989). Basement membranes: molecular organization and function in development and disease. *Current opinion in cell biology*, *1*(5), 983-988.

Schönauer, M., Thomas, A., Morbach, S., Niebauer, J., Schönauer, U., & Thiele, H. (2008). Cardiac autonomic diabetic neuropathy. *Diabetes and Vascular Disease Research*, 5(4), 336-344.

Schram, M. T., Chaturvedi, N., Schalkwijk, C. G., Fuller, J. H., Stehouwer, C. D. A., & EURODIAB Prospective Complications Study Group. (2005). Markers of inflammation are cross-sectionally associated with microvascular complications and cardiovascular disease in type 1 diabetes—the EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetologia*, 48(2), 370-378

Schratzberger, P., Walter, D. H., Rittig, K., Bahlmann, F. H., Pola, R., Curry, C., ...&Isner, J. M. (2001). Reversal of experimental diabetic neuropathy by VEGF gene transfer. *The Journal of clinical investigation*, *107*(9), 1083-1092.

Schulman, S., & Kearon, C. (2005). Definition of major bleeding in clinical investigations of antihemostatic medicinal products in non-surgical patients. *Journal of thrombosis and haemostasis*, 3(4), 692-694.

Schulze, M. B., Rimm, E. B., Li, T., Rifai, N., Stampfer, M. J., & Hu, F. B. (2004). C-reactive protein and incident cardiovascular events among men with diabetes. *Diabetes care*, 27(4), 889-894.

Seegers, W. H. (1969). Blood clotting mechanisms: Three basic reactions. *Annual Review of physiology*, 31(1), 269-294.

Serra, R., Buffone, G., de Franciscis, A., Mastrangelo, D., Vitagliano, T., Greco, M., & de Franciscis, S. (2012). Skin grafting followed by low-molecular-weight heparin long-term therapy in chronic venous leg ulcers. *Annals of vascular surgery*, 26(2), 190-197.

Shaw, J. E., Sicree, R. A., &Zimmet, P. Z. (2010). Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. Diabetes research and clinical practice, 87(1), 4-14.

Sheehan, P., Jones, P., Caselli, A., Giurini, J. M., &Veves, A. (2003). Percent change in wound area of diabetic foot ulcers over a 4-week period is a robust predictor of complete healing in a 12-week prospective trial. *Diabetes care*, *26*(6), 1879-1882.

Silver, A. E., & Vita, J. A. (2006). Shear Stress–Mediated Arterial Remodeling in Atherosclerosis: Too Much of a Good Thing? *Circulation*, 113(24): 2787–2789.

Simó, R., & Hernández, C. (2014). Neurodegeneration in the diabetic eye: new insights and therapeutic perspectives. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *25*(1), 23-33.

Sims, D. E. (1991). Recent advances in pericyte biology--implications for health and disease. *The Canadian journal of cardiology*, *7*(10), 431-443.

Singh, N., Armstrong, D. G., & Lipsky, B. A. (2005). Preventing foot ulcers in patients with diabetes. *Jama*, 293(2), 217-228.

Singh Grewal, A., Bhardwaj, S., Pandita, D., Lather, V., & Singh Sekhon, B. (2016). Updates on

aldose reductase inhibitors for management of diabetic complications and non-diabetic diseases. *Mini reviews in medicinal chemistry*, *16*(2), 120-162.

Soriguer, F., Goday, A., Bosch-Comas, A., Bordiú, E., Calle-Pascual, A., Carmena, R., ...& Delgado, E. (2012). Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@ bet. es Study. *Diabetologia*, *55*(1), 88-93.

Spijkerman, A. M. W., Gall, M. A., Tarnow, L., Twisk, J. W. R., Lauritzen, E., Lund-Andersen, H., Stehouwer, C. D. A. (2007). Endothelial dysfunction and low-grade inflammation and the progression of retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetic Medicine*, 24(9), 969-976.

Stehouwer, C. D. (2004). Endothelial dysfunction in diabetic nephropathy: state of the art and potential significance for non-diabetic renal disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 19(4), 778-781.

Stem, M. S., & Gardner, T. W. (2013). Neurodegeneration in the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy: Molecular Mechanisms and Therapeutic Implications. *Current Medicinal Chemistry*, *20*(26), 3241–3250.

Stitt, A. W., Anderson, H. R., Gardiner, T. A., & Archer, D. B. (1994). Diabetic retinopathy: quantitative variation in capillary basement membrane thickening in arterial or venous environments. *British journal of ophthalmology*, *78*(2), 133-137.

Stratton, I. M., Adler, A. I., Neil, H. A. W., Matthews, D. R., Manley, S. E., Cull, C. A., ... & Holman, R. R. (2000). Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *Bmj*, *321*(7258), 405-412.

Stratton, I. M., Kohner, E. M., Aldington, S. J., Turner, R. C., Holman, R. R., Manley, S. E., & Matthews, D. R. (2001). UKPDS 50: risk factors for incidence and progression of retinopathy in Type II diabetes over 6 years from diagnosis. *Diabetologia*, 44(2), 156-163.

Su, N., Tong, N., Du, L., Wu, B., & Xu, T. (2016) Heparin and related substances for treating diabetic foot ulcers. The Cochrane Library.

Sugahara, K., & Kitagawa, H. (2002). Heparin and heparan sulfate biosynthesis. *IUBMB life*, 54(4), 163-175.

Tabit, C. E., Chung, W. B., Hamburg, N. M., & Vita, J. A. (2010). Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: molecular mechanisms and clinical implications. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 11(1), 61-74.

Targher, G., Bertolini, L., Zoppini, G., Zenari, L., &Falezza, G. (2005). Increased plasma markers of inflammation and endothelial dysfunction and their association with microvascular complications in Type 1 diabetic patients without clinically manifest macroangiopathy. *Diabetic Medicine*, *22*(8), 999-1004.

Taslıpınar, A., Yaman, H., Yılmaz, M. I., Demırbas, S., Saglam, M., Taslıpınar, M. Y., ...&Bolu, E. (2011). The relationship between inflammation, endothelial dysfunction and proteinuria in patients with diabetic nephropathy. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, 71(7), 606-612.

Tesauro, M., Rizza, S., Iantorno, M., Campia, U., Cardillo, C., Lauro, D., &Panza, J. A. (2007). Vascular, metabolic, and inflammatory abnormalities in normoglycemic offspring of patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*, 56(3), 413-419.

The Saint Vincent Declaration by the Regional office of WHO and IDF. October 1989. Diabetes

Care and Research on Diabetes in Europe. Diabetes Program, 1996

Thor, M., Yu, A., & Swedenborg, J. (2002). Markers of inflammation and hypercoagulability in diabetic and nondiabetic patients with lower extremity ischemia. *Thrombosis research*, *105*(5), 379-383.

Tilton, R. G., Faller, A. M., Burkhardt, J. K., Hoffmann, P. L., Kilo, C., & Williamson, J. R. (1985). Pericyte degeneration and acellular capillaries are increased in the feet of human diabetic patients. *Diabetologia*, *28*(12), 895-900.

Tilton, R. G., Hoffmann, P. L., Kilo, C., & Williamson, J. R. (1981). Pericyte degeneration and basement membrane thickening in skeletal muscle capillaries of human diabetics. *Diabetes*, *30*(4), 326-334.

Tooke, J. E. (1995). Microvascular function in human diabetes: a physiological perspective. *Diabetes*, *44*(7), 721-726.

Tripodi, A., Branchi, A., Chantarangkul, V., Clerici, M., Merati, G., Artoni, A., &Mannucci, P. M. (2011). Hypercoagulability in patients with type 2 diabetes mellitus detected by a thrombin generation assay. *Journal of thrombosis and thrombolysis*, *31*(2), 165-172.

Turner R C, Holman R R, Cull C A, Stratton I M. 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;352:837-853

Turner R C, Holman R R, Stratton I M, Cull C A. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). Lancet 1998; 352:854-865.

Turner R, Holman R, Stratton I, Cull C. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38.BMJ 1998; 317: 703-713

Tyrrell, D. J., Kilfeather, S., & Page, C. P. (1995). Therapeutic uses of heparin beyond its traditional role as an anticoagulant. *Trends in pharmacological sciences*, *16*(6), 198-204.

Vairel, E. G., Bouty-Boye, H., Toulemonde, F., Doutremepuich, C., Marsh, N. A., & Gaffney, P. J. (1983). Heparin and a low molecular weight fraction enhances thrombolysis and by this pathway exercises a protective effect against thrombosis. *Thrombosis research*, *30*(3), 219-224.

Vallance, P., & Chan, N. (2001). Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart*, *85*(3), 342-350.

Van Acker, K. (2002). The choice of diabetic foot ulcer classification in relation to the final outcome. *Wounds*, *14*, 16-25.

Van derPijl, J. W., van derWoude, F. J., Swart, W., van Es, L. A., &Lemkes, H. H. (1997). Effect of danaparoid sodium on hard exudates in diabetic retinopathy. *The Lancet*, *350*(9093), 1743-1745.

Van Det, N. F., Van Den Born, J., Tamsma, J. T., Verhagen, N. A., Berden, J. H., Bruijn, J. A., ... & Van Der Woude, F. J. (1996). Effects of high glucose on the production of heparan sulfate proteoglycan by mesangial and epithelial cells. *Kidney international*, *49*(4), 1079-1089.

Van Hecke, M. V., Dekker, J. M., Nijpels, G., Moll, A. C., Heine, R. J., Bouter, L. M., Stehouwer, C. D. A. (2005). Inflammation and endothelial dysfunction are associated with retinopathy: the Hoorn Study. *Diabetologia*, 48(7), 1300-1306.

Varki, A., &Gagneux, P. (2017). Biological functions of glycans.Essentials of Glycobiology [Internet].3rd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015-2017.

Villeneuve, L. M., Natarajan, R. (2010). The role of epigenetics in the pathology of diabetic complications. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 299(1), F14-F25.

Vinik, A. I., Erbas, T., Park, T. S., Nolan, R., &Pittenger, G. L. (2001). Platelet dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes care*, *24*(8), 1476-1485.

Wagner Jr, F. W. (1981). The dysvascular foot: a system for diagnosis and treatment. *Foot & ankle*, *2*(2), 64-122.

Walenga JM, Fareed J, Hoppensteadt D, Murphy R, Schumacher H. (1990) Ex vivo actions of low-molecular weight heparins: possible relevance to clinical effect. En: Bounameaux H, Samarna M, Ten Cate JW, editores. Fraxiparina. Second Internacional Symposium. Stuttgart: 103-117

Wardrop, D., & Keeling, D. (2008). The story of the discovery of heparin and warfarin. *British journal of haematology*, 141(6), 757-763.

Ware, J. A., &Heistad, D. D. (1993). Platelet-endothelium interactions. *New England Journal of Medicine*, *328*(9), 628-635.

Webb, D. R., Zaccardi, F., Davies, M. J., Griffin, S. J., Wareham, N. J., Simmons, R. K., ... &Khunti, K. (2017). Cardiovascular risk factors and incident albuminuria in screen-detected type 2 diabetes. *Diabetes/metabolism research and reviews*, *33*(4), e2877.

Weitz, J. I. (1997). Low-molecular-weight heparins. *New England Journal of Medicine*, *337*(10), 688-699.

Whiting, D. R., Guariguata, L., Weil, C., & Shaw, J. (2011). IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes research and clinical practice*, *94*(3), 311-321.

WHO-IDF 1989. The Saint Vincent Declaration by the Regional office of WHO and IDF. October 1989. Diabetes Care and Research on Diabetes in Europe. Diabetes Program, 1996).

Widlansky, M. E., Gokce, N., Keaney, J. F., & Vita, J. A. (2003). The clinical implications of endothelial dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology*, 42(7), 1149-1160.

Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., & King, H. (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes care*, *27*(5), 1047-1053.

Wilkinson, C. P., Ferris, F. L., Klein, R. E., Lee, P. P., Agardh, C. D., Davis, M., ... &Verdaguer, J. T. (2003). Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. *Ophthalmology*, *110*(9), 1677-1682.

Williams, S. B., Goldfine, A. B., Timimi, F. K., Ting, H. H., Roddy, M. A., Simonson, D. C., & Creager, M. A. (1998). Acute hyperglycemia attenuates endothelium-dependent vasodilation in humans in vivo. *Circulation*, *97*(17), 1695-1701.

Williams, D. T., Price, P., & Harding, K. G. (2006). The influence of diabetes and lower limb arterial disease on cutaneous foot perfusion. *Journal of vascular surgery*, *44*(4), 770-775.

Williamson, J. R., & Kilo, C. (1976). Basement-membrane thickening and diabetic microangiopathy. *Diabetes*, *25*(2 SUPPL), 925-927.

Williamson, J. R., Tilton, R. G., Chang, K., & Kilo, C. (1988). Basement membrane abnormalities in diabetes mellitus: relationship to clinical microangiopathy. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, *4*(4), 339-370.

Wigington, G., Ngo, B., & Rendell, M. (2004). Skin blood flow in diabetic dermopathy. *Archives of dermatology*, *140*(10), 1248-1250.

Xie, J., Li, R., Wu, H., Chen, J., Li, G., Chen, Q & Xu, B. (2017). Advanced glycation endproducts impair endothelial progenitor cell migration and homing via syndecan 4 shedding. *Stem Cells*, *35*(2), 522-531.

Yazdanpanah, L., Nasiri, M., &Adarvishi, S. (2015). Literature review on the management of diabetic foot ulcer. *World journal of diabetes*, *6*(1), 37.

Yang, C. W., Vlassara, H., Striker, G. E., & Striker, L. J. (1995). Administration of AGEs in vivo induces genes implicated in diabetic glomerulosclerosis. *Kidney International Supplement*, (49).

Yurchenco, P. D., &Schittny, J. C. (1990). Molecular architecture of basement membranes. *The FASEB Journal*, 4(6), 1577-1590.

Zajac, J., Shrestha, A., Patel, P., &Poretsky, L. (2010). The main events in the history of diabetes mellitus. In Principles of diabetes mellitus (pp. 3-16). Springer US.

Zeng, H. Y., Green, W. R., & Tso, M. O. (2008). Microglial activation in human diabetic retinopathy. *Archives of ophthalmology*, *126*(2), 227-232.

Zhang P., Lu, J., Jing, Y., Tang, S., Zhu, D., & Bi, Y. (2017). Global epidemiology of diabetic foot ulceration: a systematic review and meta-analysis. *Annals of medicine*, 49(2), 106-116.