



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**EFFECTO DE LA OXIGENOTERAPIA HIPERBÁRICA EN LA EXPRESIÓN DE KLF2 Y
FoxO1 SOBRE LA ANGIOGÉNESIS Y LA CICATRIZACIÓN DE PACIENTES CON
DM2 Y PIE DIABÉTICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

CONTRERAS MÉNDEZ LILIA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. CÉSAR RAÚL GONZÁLEZ BONILLA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: **DR. ADOLFO RENÉ MÉNDEZ CRUZ**
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES-IZTACALA, UNAM
DR. JOSÉ RAFAEL JIMÉNEZ FLORES
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES-IZTACALA, UNAM

MÉXICO, D.F.

ENERO, 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**EFFECTO DE LA OXIGENOTERAPIA HIPERBÁRICA EN LA EXPRESIÓN DE KLF2 Y
FoxO1 SOBRE LA ANGIOGÉNESIS Y LA CICATRIZACIÓN DE PACIENTES CON
DM2 Y PIE DIABÉTICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

CONTRERAS MÉNDEZ LILIA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. CÉSAR RAÚL GONZÁLEZ BONILLA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: **DR. ADOLFO RENÉ MÉNDEZ CRUZ**
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES-IZTACALA, UNAM
DR. JOSÉ RAFAEL JIMÉNEZ FLORES
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES-IZTACALA, UNAM

MÉXICO, D.F.

ENERO, 2016.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 30 de noviembre de 2015, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **CONTRERAS MÉNDEZ LILIA** con número de cuenta **514012489**, con la tesis titulada **"EFECTO DE LA OXIGENOTERAPIA HIPERBÁRICA EN LA EXPRESIÓN DE KLF2 Y FoxO1 SOBRE LA ANGIOGÉNESIS Y LA CICATRIZACIÓN DE PACIENTES CON DM2 Y PIE DIABÉTICO"**, realizada bajo la dirección del **DR. CÉSAR RAÚL GONZÁLEZ BONILLA**:

Presidente: DRA. SELVA LUCÍA RIVAS ARANCIBIA
Vocal: DRA. CLARA ORTEGA CAMARILLO
Secretario: DR. JOSÉ RAFAEL JIMÉNEZ FLORES
Suplente: DR. ALONSO ANTONIO VILCHES FLORES
Suplente: DR. ADOLFO RENÉ MÉNDEZ CRUZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 13 de enero de 2016



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por su excelencia y calidad académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero otorgado a su servidora para la formación y obtención del grado (número de CVU/becario: 545204 / 294494).

Al Fondo de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social por el apoyo económico concedido durante el desarrollo de presente trabajo de investigación (Núm. de Registro: FIS/IMSS/PROT/910)

Al Programa de Apoyo a Estudios del Posgrado (PAEP) de la UNAM por su apoyo económico para la asistencia al XXVI Congreso de la Federación Mexicana de Diabetes 2014 realizado en Mérida Yucatán.

A mi tutor principal, el Dr. César Raúl González Bonilla Jefe de División de Laboratorios de la Vigilancia e Investigación Epidemiológica, Coordinación de Vigilancia Epidemiológica, IMSS.

A mi comité tutorial conformado por: Dr. Adolfo Rene Méndez Cruz Jefe de la carrera en Médico Cirujano y al Dr. José Rafael Jiménez Flores Profesor Titular A de la Unidad de Morfología y Función en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala

A mi jurado conformado por: Dra. Selva Lucía Rivas Arancibia Profesor Titular C del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medica, UNAM, a la Dra. Clara Ortega Camarillo Investigador Asociado D de la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del CMN Siglo XXI, IMSS, y al Dr. Alonso Antonio Vilches Flores Asociado C de la Unidad de Investigación en Biomedicina en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A mi tutor el Dr. César Raúl González Bonilla por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, ser mi tutor, por sus enseñanzas, su apoyo académico y por los conocimientos compartidos.

Al Dr. Adolfo René Méndez Cruz por formar parte de mi comité tutorial, facilitarme amablemente las instalaciones de su oficina para la realización de las evaluaciones tutorales, por los consejos y apreciaciones que tuvo hacia mi trabajo.

Al Dr. José Rafael Jiménez Flores por formar parte de mi comité tutorial, por su amabilidad, su atención incondicional hacia mi trabajo, sus apreciaciones y observaciones hacia mi trabajo.

A los miembros de mi jurado por su tiempo, al haber revisado mi tesis, por sus valiosos comentarios y sugerencias: Dra. Selva Lucía Rivas Arancibia, Dra. Clara Ortega Camarillo y al Dr. Alonso Antonio Vilches Flores.

A la Dra. Melisa Ángela Martínez Paniagua por su apoyo incondicional, sus enseñanzas, sus consejos, la motivación para realizar esta Maestría y sobre todo por brindarme su preciada amistad.

A la M. en C. Yu-Mei Anguiano Hernández por sus observaciones, el aprendizaje, su ayuda y apoyo en la elaboración de esta tesis.

A la Dra. Clara Esperanza Santacruz Tinoco por permitirme realizar el trabajo experimental en su laboratorio, sus sugerencias y observaciones en la elaboración de este proyecto.

Al M. en C. Julio Alvarado Yaah por sus atenciones, asesorías, ayudas técnicas, y sugerencias.

A la Dra. María de los Ángeles Hernández Cueto por sus enseñanzas y consideraciones hacia mi persona.

A la M. en C. Berenice Sánchez Arellano y al M. en C. Juan Carlos Vázquez por su apoyo y consejos.

A todas las personas que conforman el Laboratorio Central de Epidemiología: gracias por sus atenciones y momentos compartidos.

DEDICATORIA

En el camino a la formación y elaboración de esta tesis me encontré con toda clase de circunstancias y sorpresas, mostrándome que no hay patrones fijos de comportamiento sino que todo se encuentra en un cambio constante, y como siempre he pensado: el futuro es impredecible. En retrospectiva, pienso que esto no hubiera sucedido de esta manera si las personas implicadas hubieran seguido un patrón predecible. Muchas cosas cambiaron, pero no pensaré en lo que cambio sino en lo que me dejó: en primer lugar, me demostró que no todo es sencillo, pero con trabajo, esfuerzo y dedicación todo se puede lograr; ahora sé que soy capaz de adaptarme a los cambios y de encontrar una solución; valoro más, agradezco y aprecio lo que tengo; cuento con nuevos conocimientos, he aumentado mi círculo de amigos y conexiones sociales tanto aquí como en el extranjero.

Todo esto no lo hubiera realizado sin la fuerza que me da mi Dios y tampoco sin el apoyo, esperanza y amor que me ha depositado mi familia y amigos.

Mi madre María Méndez Cruz mujer fuerte, trabajadora, que antepone su propio bienestar al de su familia y quien nunca me puso límites, porque me permitió ser lo que muy pocos encuentran el significado de ser Biólogo Experimental y, por consiguiente, orgullosa de convertirme en Maestra en Ciencias Biológicas.

A mi hermana Ana Contreras Méndez por ser alguien muy noble a pesar de las circunstancias, por su apoyo y por compartir conmigo las dificultades y enseñarme que a pesar de ello se puede ser diferente.

A mi padre Jaime Contreras Acevedo, que me enseñó a ser alguien muy independiente y a sacar fortaleza de las situaciones difíciles.

A mi tía Malena una persona con un corazón muy caritativo muy capaz de compartir todo lo que Dios le da, por su apoyo en todo momento de mi vida.

A mis primas Marcela, Gaby y mis sobrinitos siempre brindándome un momento ameno y agradable muy necesario para sobrellevar las circunstancias difíciles que he pasado.

A mi madrina Toñita siempre alguien tan hogareña y orgullosa de su hogar por compartirme parte de él y por su apoyo.

A "Titi", muchas gracias por el apoyo, los buenos deseos y la comprensión en todos estos años. A "ama" muchas gracias por el afecto y cariño incondicional, los abrazos y los momentos amenos.

A mi plantilla de amigas (nombradas conforme se fueron cruzando en mi línea de vida, todas muy valiosas para mí): Alinne, Paola, Blanca, Erandi, Bere, Meli, Paty, Dulce; por brindarme su apoyo, su hombro y oídos; sin sus consejos, su comprensión y su cariño no sé qué sería de mí.

Seguiré con los que ya no se encuentran en este plano terrenal, pero quienes siguen presentes en mi corazón y memoria. A mi tío Agustín le agradezco porque siempre creyó en mí y porque sé, que en cada proyecto que me plantee, él está conmigo. A mi abuelito Vicente le agradezco todas las anécdotas y consejos. A mi madrina Angelita que en el cielo muy feliz sé que esta, por sus conocimientos y apoyo.

Dedico esta tesis a todos los nombrados anteriormente, porque lo que han aportado a mi vida no tiene precio, valor, ni escala medible. ¡Muchas, muchas Gracias!

"Porque ahí donde este vuestro tesoro,
ahí estará también vuestro corazón" *Lucas 12:34*

ÍNDICE

Contenido

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	i
ABREVIATURAS.....	ii
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
Panorama Epidemiológico	5
Conceptos.....	6
Marcadores.....	9
ANTECEDENTES	12
JUSTIFICACIÓN	14
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	14
HIPÓTESIS	14
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
Modelo experimental	16
Pacientes.....	16
Tamaño de la muestra.....	17
Aspectos éticos y de bioseguridad	17
<i>Aspectos éticos</i>	17
Tratamiento y toma de la muestra	20
Procesamiento de las biopsias	20
Elaboración de la Inmunohistoquímica	20

Visualización y análisis de las Inmunohistoquímicas.....	21
Western blot a partir de biopsias	21
Análisis del Western blot.....	22
Extracción de RNA de muestras de tejido parafinado	22
Cuantificación y determinación de la integridad del RNA	22
PCR en tiempo real	22
Determinación de la concentración de óxido nítrico	23
Tinción de tricromo de Masson.....	23
Determinación de fibrosis	24
Determinación de angiogénesis.....	24
Análisis estadístico	24
RESULTADOS	25
Ulceras de pie diabético antes y después de la OTH	25
Características basales de los pacientes que tomaron OTH	26
Control de Isotipo.....	27
Expresión de KLF2 por la técnica en Inmunohistoquímica	27
Expresión de FoxO1 por la técnica en Inmunohistoquímica	29
Expresión de P-FoxO1 por la técnica en Inmunohistoquímica	31
Expresión de biomarcadores en biopsias de pacientes tratados con OTH.....	33
Angiogénesis y Fibrosis	38
KLF2 en el núcleo fomenta la angiogénesis	40
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	44
LITERATURA CITADA	46

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Fig. 1. Ulceras de pie diabético antes y después de OTH.....	25
Fig. 2. Control de isotipo..	27
Fig. 3. Expresión de KLF2 por inmunohistoquímica.	28
Fig. 4. Expresión de FoxO1 por inmunohistoquímica.....	30
Fig. 5. Expresión de P-FoxO1 por inmunohistoquímica.	32
Fig. 6. Expresión de biomarcadores.....	36
Fig. 7. Producción de NO.....	37
Fig. 8. Angiogénesis y Fibrosis.....	39
Fig. 9. KLF2 en el núcleo fomenta la angiogénesis.....	40
Tabla 1. Sistema Internacional de Wagner	7
Tabla 2. Características basales de los pacientes	26
Tabla 3. Producción de NO y Angiogénesis.....	37

ABREVIATURAS

FID	Federación Internacional para la Diabetes
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
OTH	Oxigenoterapia Hiperbárica
ATA	Atmosferas Absolutas
pO ₂	Presión de Oxígeno
FoxO1	Factor Forkhead-box-O1
AKT/PKB	Proteín-cinasa B de serina-treonina
IGF-1	Factor de Crecimiento tipo Insulina-1
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinasa
KLF2	Krüppel-like factor-2
eNOS	Óxido Nítrico Sintasa Endotelial
NO	Óxido Nítrico
GMPc	Guanosín Monofosfato Cíclico
sGC	Guanilato Ciclasa Soluble
PKG	Proteína-cinasa G
VEGF	Factor de Crecimiento Endotelio Vascular
FGFb	Factor de Crecimiento Fibroblástico
PBS	Buffer de fosfatos
SBF	Suero Fetal Bovino
RT-qPCR	Real Time-quantitative Polymerase Chain Reaction

RP	RNAsa P
L-NAME	N-Nitro-L-Arginina-Metil-Ester
IMC	Índice de Masa Corporal

RESUMEN

En México actualmente la Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) es la principal causa de muerte. El pie diabético es una de las principales complicaciones en pacientes con DM2. Esta complicación se debe en parte a la disfunción endotelial que causa hipoxia tisular en los tejidos blandos de las extremidades inferiores. La disfunción endotelial se ha atribuido a una reducción en la bioactividad de óxido nítrico (NO). El NO induce la angiogénesis. KLF2 es un factor de transcripción que regula la expresión de la enzima eNOS en el endotelio, pero este factor de transcripción disminuye su expresión debido a la hipoxia y a las concentraciones altas de glucosa en los tejidos. FoxO1 es un factor de transcripción que afecta la expresión de KLF2 en condiciones de hiperglicemia. FoxO1 se mantiene en el citoplasma debido a su fosforilación en la serina (ser256) por AKT en la vía de señalización de la insulina y del IGF-1. Cuando existe resistencia a la insulina, este factor se puede translocar al núcleo. Se sabe que el aumento en la expresión de FoxO1 disminuye la producción de colágena, lo que se traduce como fibrosis. La fibrosis es importante en la cicatrización, principalmente en la fase de proliferación cuando se genera una red de colágena que permite la movilización de células endoteliales para la formación de nuevos vasos. En el CMN La Raza IMSS se cuenta con una Unidad de Medicina Hiperbárica donde se da atención a pacientes con pie diabético. Para determinar si la oxigenoterapia hiperbárica (OTH) afecta la angiogénesis y fibrosis mediada por KLF2 y FoxO1 en pacientes con pie diabético, se seleccionaron pacientes con pie diabético con Wagner 3 y 4. De los cuales sólo 18 completaron los criterios de inclusión y exclusión. A estos pacientes se les administró oxígeno al 100% a 1.5 ATA en una cámara hiperbárica por 1 hora, durante un total de 20 sesiones. Se les tomó sangre periférica en las sesiones 1, 11, y 20. También se les tomó biopsia del tejido ulcerado antes y después de las 20 sesiones. En el plasma se realizó la reacción de Griess para determinar las concentraciones de NO. En las biopsias se realizó la tinción de tricromo de Masson, inmunohistoquímica, western blot y extracción de RNA para RT-qPCR para determinar la angiogénesis, fibrosis, expresión de KLF2, FoxO1 y

FoxO1 fosforilado. La OTH favoreció la cicatrización con 20 sesiones. Se determinó que hay un aumento en la expresión *in situ* de KLF2 en los pacientes con IMC normal. Esto se ve afectado en pacientes con IMC alto. También hay una disminución en la actividad de FoxO1, por aumento en la fosforilación de la ser256 en las biopsias. Se observó una tendencia al aumento en los depósitos de colágena y en la angiogénesis vista con la tinción de tricromo de Masson. La concentración de NO en plasma fue mayor en los pacientes que mostraron aumento en la angiogénesis y contrario a los pacientes que no la mostraron. El efecto de la OTH sobre la resistencia a la insulina, el metabolismo de grasas y carbohidratos podrá seguir esclareciendo los efectos benéficos de la OTH en esta complicación. También, determinar el efecto de esta terapia en otros padecimientos que causen isquemia podrá fortalecer el efecto de la terapia y aclarar sus vías de acción.

ABSTRACT

In Mexico Type 2 Diabetes Mellitus (DM2) is currently the leading cause of death. Diabetic foot is one of the major complications in patients with DM2. This complication is partly due to endothelial dysfunction that causes hypoxia of the soft tissues in the lower extremities. Endothelial dysfunction has been attributed to a reduction in bioactivity of nitric oxide (NO) which induces angiogenesis. KLF2 is a transcription factor that regulates the expression of eNOS in the endothelium. However, this transcription factor decreases its expression during hypoxia and high glucose concentrations in tissues. FoxO1 is a transcription factor that affects expression of KLF2 in conditions of hyperglycemia. FoxO1 is held in the cytoplasm by phosphorylation of AKT at ser256 after insulin and IGF-1 signaling pathway. When insulin resistance is present, this factor can translocate to the nucleus. It is known that an increase in the expression of FoxO1 also decreases collagen production which causes fibrosis. Fibrosis is important feature during healing, mainly in the proliferation phase, when collagen forms a network which allows the mobilization of endothelial cells and new vessels are generated. The Infectious Diseases Hospital at CMN La Raza IMSS has a Hyperbaric Medicine Unit where patients with diabetic foot are treated. To determine whether hyperbaric oxygen therapy (OTH) has an effect on angiogenesis and fibrosis mediated KLF2 and Foxo1, patients with diabetic foot at stages Wagner 3 and 4 were studied, 18 compelled with the selection criteria. These patients were subjected to 100% oxygen in a hyperbaric chamber for 1 hour, for a total of 20 sessions. Peripheral blood was obtained in sessions 1, 11, and 20. Biopsy from the ulcerated tissue was obtained before and after 20 sessions. Plasma was obtained to determine the concentrations of NO by the Griess reaction. Biopsies were stained the Masson's trichrome immunohistochemistry, Western blotting and RNA extraction for RT-qPCR was performed to determine angiogenesis, fibrosis expression KLF2, FoxO1 and phosphorylated FoxO1. The OTH promotes healing with 20 sessions. There is an increase in the expression in situ of KLF2 in patients with normal BMI. This is affected in patients with high BMI. There is also a decrease in activity of FoxO1, by increased phosphorylation of ser256 detected in biopsies. A tendency to increased collagen deposition and angiogenesis view with Masson trichrome staining was

observed. There is an increase in NO production in plasma of patients showing increased angiogenesis and the opposite occurs in patients who did not. The effect of the OTH on insulin resistance, metabolism of fats and carbohydrates may further clarify the beneficial effects of the OTH in this complication. Also, to determine the effect of this therapy in other diseases that cause ischemia may strengthen the effect of therapy and clarify their courses of action.

Panorama Epidemiológico

Diabetes Mellitus

La Federación Internacional para la Diabetes (FID) calcula que en el 2014 existieron 387 millones de casos de Diabetes Mellitus (DM) en el mundo en personas de entre 20-79 años de edad, con el mayor número de casos en personas entre 40 a 59. Se considera que más de la mitad no están diagnosticados. La DM causó 4.9 millones de muertes en el 2014, aproximadamente 77%, de las cuales ocurrieron en países de ingresos bajos o medios. La DM es la cuarta o quinta causa de muerte en la mayoría de los países de ingresos altos y se considera una epidemia en muchos países en vías de desarrollo. México ocupa el sexto lugar mundial en el número de personas con diabetes(1). En México la DM representa la primera causa de muerte y su tendencia muestra un incremento del 3% cada año (2). De acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud (ENSANUT-2012), 6.4 millones de personas fueron diagnosticadas con DM en 2012 , lo que equivale al 9.2% de adultos en México (3). La FID reportó que para el 2014 hubo una prevalencia del 11.9%, mostrando un aumento del 2.7% en 2 años (1).

En el IMSS se atiende el 73.9% de la población diabética, la enfermedad consume entre el 4.7 y el 6.5% del presupuesto para la atención de la salud y es la primera causa de muerte desde el año 2000. En 2011 se reportaron 21,096 defunciones que corresponden del 18-20% del total de ocurridas en el periodo del 2004-2011. Se estima que entre 7 y 8 de cada 10 personas con DM mueren por daño macrovascular. En la consulta de medicina familiar ocupó el segundo lugar de demanda; en la consulta de especialidades el quinto lugar; y en la consulta de urgencias y como motivo de egreso hospitalario, el octavo lugar (4). La diabetes es la primera causa de alta hospitalaria en el IMSS, que es el proveedor de atención médica para el 60% de la población. La duración de la estancia hospitalaria también es mayor en los diabéticos (6.1 días), en comparación con todas las

demás enfermedades (3.5 días) (5) . Entre las complicaciones presentadas por los pacientes diabéticos, la retinopatía (13.9%) y las úlceras de pie diabético (7.2%) fueron las más frecuentes (3).

Pie diabético

La DM es la principal causa de amputaciones de origen no traumático (1). En el IMSS cada año se realizan más de 6 000 amputaciones por pie diabético en el territorio nacional de las cuales el 79% ocurre en personas entre 40 y 74 años de edad, afectando en una mayor proporción a la población masculina (6). El riesgo de por vida de una persona con diabetes a desarrollar úlceras de pie diabético podría ser hasta en un 25%, y se estima que cada 30 segundos se pierde una extremidad inferior en algún lugar del mundo como una consecuencia de la diabetes. Se presume un aumento en la carga de la enfermedad del pie diabético ya que los factores que contribuyen a la enfermedad, tales como la neuropatía periférica y la enfermedad vascular, están presentes en más de 10% de las personas en el momento de diagnóstico de DM2, y el primer año posterior al diagnóstico es un período de riesgo para desarrollar las úlceras del pie y amputaciones. Por otra parte, el aumento en la prevalencia de DM2 es mayor en los países en desarrollo que se encuentran en continentes como: África, Asia y América. Las personas con DM2 en estos países son más propensas a padecer úlceras de pie de origen neuropático (7). Los problemas en las extremidades inferiores representan más hospitalizaciones que cualquiera de las otras complicaciones a largo plazo entre los pacientes con diabetes (8).

Conceptos

Diabetes Mellitus

La DM es una enfermedad crónica que se desarrolla cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce (9). En la DM2, el páncreas produce insulina, pero esta no es suficiente o bien el organismo no puede responder a sus efectos, dando lugar a una acumulación de glucosa en sangre. Los principales factores de riesgo para el desarrollo de la DM2 son la obesidad, la mala alimentación, la inactividad física, la

edad avanzada, los antecedentes familiares de diabetes y el grupo étnico. Los niveles altos constantes de glucosa en sangre pueden conducir a enfermedades graves que afectan a los ojos, riñones, corazón, los vasos sanguíneos y nervios. Las personas con diabetes también tienen un mayor riesgo de desarrollar infecciones (1).

Pie diabético

El signo característico de la diabetes no controlada es la hiperglucemia, su persistencia por largo tiempo daña gravemente varios órganos y sistemas, especialmente los nervios periféricos y los vasos sanguíneos (1). Los factores de riesgo que fomentan la formación de úlceras de pie diabético son: la neuropatía, isquemia, deformidad del pie, callosidades en el área de presión (8). La neuropatía se caracteriza por la disminución y/o ausencia en la sensibilidad del pie y pérdida de la sudoración, esto favorece a aparición de traumas leves, la formación de callos y grietas, que al no ser percibidos a tiempo pueden desencadenar una infección. Por otro lado, también se genera daño endotelial y vascular que desencadena la hipoxia tisular. El conjunto de todos estos factores llevan a la aparición del pie diabético, que pueden derivarse en una afectación crónica que al no ser tratada con los cuidados necesarios se traducirá en una amputación de la extremidad (8;10;11). Las úlceras del pie diabético se clasifican según la profundidad de la úlcera y presencia de osteomielitis (infección ósea) o gangrena (tejido necrótico) en 5 grados en el sistema internacional de Wagner descritos en la Tabla 1. (10).

Tabla 1. Sistema Internacional de Wagner	
Grado 0	Lesión pre-ulcerativa
Grado 1	Herida de espesor parcial que no atraviesa la dermis
Grado 2	Herida de espesor completo que se extiende a los tendones o tejido subcutáneo más profundo pero sin afectación ósea u osteomielitis
Grado 3	Herida de espesor completo que se extiende e involucra hueso
Grado 4	Gangrena localizada

Oxigenoterapia Hiperbárica (OTH)

Existen diversos tratamientos para las úlceras crónicas del pie diabético, encaminadas a revertir la inflamación, oxigenar el tejido y por consiguiente promover la cicatrización. Entre los tratamientos alternativos, cuya eficacia es controversial, se encuentran la ozonoterapia, la presión negativa y la oxigenoterapia hiperbárica (OTH). La OTH consiste en dar a respirar al paciente oxígeno al 100% a través de una mascarilla en un cuarto hermético, denominado cámara hiperbárica, a 1.5 atmósferas absolutas de presión (ATA). Esto permite que el oxígeno penetre con mayor facilidad en la sangre y los tejidos del paciente llegando especialmente a aquellas áreas afectadas por alguna lesión. En condiciones normales de perfusión, los tejidos en descanso requieren aproximadamente 50 ml de oxígeno por litro de sangre, los cuales se transportan a través de la hemoglobina. Durante la respiración de aire a presión normobárica (1 ATA), la hemoglobina se satura alrededor del 97% al salir de la circulación pulmonar, y sólo una pequeña fracción de oxígeno se disuelve en la sangre, alrededor de 3 mL de oxígeno por litro de sangre. Si se administra oxígeno al 100% a 1.5 ATA el oxígeno aumenta hasta 50 mL por litro de sangre. En la OTH, mediante el aumento de la presión y de la concentración de oxígeno aumenta la presión de oxígeno (pO_2) y las moléculas de oxígeno adicionales se disuelven en la sangre del paciente (12). Esta terapia ha tenido una historia controversial y se requiere más investigación para dilucidar los mecanismos por los cuales promueve la cicatrización. La OTH aumenta los factores de crecimiento y de señalización en las heridas, promoviendo al mismo tiempo liberación de células progenitoras del endotelio (EPC) de la médula ósea por el NO (13). Los efectos benéficos de la OTH incluyen la mejoría de las úlceras, reducción del edema, cicatrización y aumento de la respuesta inmune del hospedero (14).

Proceso de cicatrización

La cicatrización de heridas ocurre como una respuesta al daño e involucra la activación de queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales, macrófagos y plaquetas, además de factores de crecimiento y citocinas que inducen a estas células y que son necesarias para coordinar la cicatrización (15). Este proceso conlleva cuatro fases principales superpuestas. En primer lugar, al presentarse un daño se tiende a la homeostasis mediante la activación de la cascada de coagulación, dando lugar a la formación de un entramado de fibrina con plaquetas que evitan el sangrado. En segundo lugar, se presenta la fase de inflamación, caracterizada por infiltración de leucocitos, principalmente neutrófilos, y posteriormente de macrófagos al sitio de la lesión para eliminar a patógenos. Esta fase requiere de regulación, ya que puede generar más daño en el tejido e impedir el progreso a la siguiente fase. En tercer lugar, se produce la fase de proliferación, al haberse regulado la fase anterior comienza la infiltración de fibroblastos que producen colágena, la cual conforma la matriz extracelular (fibrosis) y juegan un papel importante en el sostén de la migración de nuevas células en formación, como es en caso de las células endoteliales, facilitando así la angiogénesis que fomenta la buena oxigenación del tejido. Por último, ocurre la remodelación del tejido nuevo, cuando se contrae la cicatriz y desarrollan apoptosis las células innecesarias (16).

Marcadores

FoxO1

Los factores de transcripción Forkhead box (Fox) constituyen una superfamilia de más de 100 proteínas estructuralmente relacionadas con un residuo conservado de unión a DNA, el dominio forkhead. En los seres humanos se han descrito 19 subgrupos llamados FoxA-FoxS. La clase O incluye FoxO1, FoxO3, FoxO4 y FoxO6 los cuales tienen un papel importante durante la función celular normal, se expresan en todos los tejidos del organismo, se encuentran en ovario, próstata, músculo esquelético, cerebro, corazón, pulmón, hígado, páncreas, bazo, timo y los testículos. Se ha demostrado que FoxO1, FoxO3, y FoxO4 pueden promover la proliferación celular, así como la muerte celular. En lo que respecta a la inhibición

de la actividad de la proteína FoxO, la proteín-kinasa B de serinatreonina (AKT/PKB) es un mediador primario de la fosforilación de FoxO1, FoxO3, y FoxO4. La activación de Akt tiene un efecto citoprotector, y se activa durante la exposición a radicales libres, la hiperglucemia, la hipoxia, la toxicidad de beta-amiloide, y el estrés oxidativo (17). FoxO1 se encuentra transcripcionalmente activo en el núcleo y al haber señales externas mediadas por factores de crecimiento como IGF-1 se activa AKT/PKB (18). AKT/PKB fosforila a FoxO1 en ser256 y lo transloca al citoplasma inactivándolo (19). FoxO1 activa genes que participan en gluconeogénesis en hígado e inhibe la adipogénesis, la insulina revierte estos efectos a través de AKT/PKB y así se transloca al citoplasma (20). FOXO1 inhibe la proliferación celular a través de la regulación transcripcional de inhibidores del ciclo celular; inhibidor cinasa dependiente de ciclina1B (p27) y el inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina 1 (p21) (21).

KLF2

Los miembros de la familia de KLF (Krüppel-like factor) son factores de transcripción que regulan diversos procesos biológicos que incluyen la proliferación, diferenciación, crecimiento, desarrollo, supervivencia y respuestas al estrés. Hasta el momento se han identificado 17 miembros de la familia KLF los cuales se ha observado que son reguladores importantes en el desarrollo y la homeostasis de numerosos órganos y sistemas tales como el sistema cardiovascular, el digestivo, el respiratorio, el hematológico y el inmune; también se han visto que están involucrados en desórdenes tales como la obesidad, la enfermedad cardiovascular, el cáncer y en condiciones inflamatorias (22). Todo ello debido a su capacidad para reprimir y activar la expresión de un gran número de genes. Se han denominado así debido a su homología con los genes *Krüppel* de *Drosophila Melanogaster* que regulan la segmentación del tórax y del abdomen anterior. Los miembros de la familia KLF2 se caracterizan por contener 3 dominios bien conservados de dedos de zinc C_2H_2 , localizados en el carboxilo terminal lo cual les permite interactuar con secuencias ricas en GC. La región amino terminal es variable en los diferentes KLF's concediéndoles su capacidad para interactuar con co-activadores y co-represores, culminando en la activación o

represión de un promotor dado (23). KLF2, es un factor de transcripción, con funciones que dependen del tipo de célula y tejido en el cual se expresen (24). KLF2 en el endotelio, induce la vasculogénesis en etapas tempranas del desarrollo, tiene un efecto vaso-protector, genera vasodilatación y mantiene el tono vascular. Además se ha demostrado por medio de experimentos que KLF2 es inducido por el estrés generado por el flujo sanguíneo laminar (25;26). KLF2 induce la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) uniéndose directamente a su promotor (26).

Óxido Nítrico (NO)

El óxido nítrico (NO) es un gas incoloro producido por la oxído nítrico sintasa (NOS). Existen 3 tipos de NOS en mamíferos: NOS neuronal (nNOS o NOS1), NOS inducible (iNOS o NOS2) y NOS endotelial (eNOS o NOS3). eNOS sintetiza NO en el endotelio y es liberado al flujo sanguíneo, lo cual fomenta la vasodilatación, previene la agregación plaquetaria y la formación de placas ateroscleróticas (27). También, induce la angiogénesis por medio de la formación de guanósín monofosfato cíclico (GMPc) por activación de la guanilato ciclasa soluble (sGC). El GMPc activa la cascada de señalización de cinasas como; proteín-cinasa G (PKG) y protein-cinasas activadas por mitógeno (MAPK) con la consiguiente activación de Ras, Raf1 y ERK. Además, refuerza la angiogénesis por incremento en la expresión de factor de Crecimiento Endotelio Vascular (VEGF) y Factor de Crecimiento Fibroblástico (bFGF). El NO también induce la migración de las células endoteliales por estimulación de la podogénesis y la integrina $\alpha\beta_3$, que es un receptor de fibronectina (28).

ANTECEDENTES

La disfunción endotelial forma parte de la fisiopatología del pie diabético, esto se ha atribuido a una reducción en la bioactividad de NO y un aumento en la formación de radicales libres de oxígeno (29). El NO inhibe la activación y agregación plaquetaria, impide la adhesión de leucocitos, fomenta la vasodilatación y la angiogénesis (30). La angiogénesis, es el proceso de nuevo crecimiento capilar a través de la formación de pequeños vasos sanguíneos y se inicia a partir de la activación de células endoteliales (31). Se ha demostrado que la presencia de NO es fundamental para la angiogénesis. Por medio de experimentos en ratones “knockout” para la eNOS, con isquemia en sus extremidades, se ve alterado el remodelado vascular aun con la administración de Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF) exógeno (32). En otro experimento *in vitro*, donde se estudiaron células endoteliales de explantes de aorta de conejo cultivadas en presencia de Lipoproteína de Baja Densidad (LDL) oxidada, se reduce la biodisponibilidad de NO y disminuyó la angiogénesis (33).

KLF2 es fundamental para el desarrollo del sistema vascular, como se demostró en ratones deficientes de KLF2 (“knockout”), donde los ratones mueren en el útero por hemorragia, debido a una malformación de los vasos sanguíneos. Además, la sobre-expresión de KLF2 induce la expresión de la eNOS que confiere un efecto anti-inflamatorio, anti-trombótico, y anti-proliferativo, inhibiendo la expresión de la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1) y de la molécula de adhesión vascular selectina E (E-Selectina). Estos datos sugieren que KLF2 como un regulador anti-ateroesclerótico y anti-inflamatorio (24). Se ha determinado que la expresión de KLF2 se suprime cuando existen niveles elevados de glucosa en células endoteliales (34) y en condiciones de hipoxia en monocitos (35;36). Se sugiere que la inhibición por efecto de la hiperglucemia se debe al factor FoxO1, ya que se ha encontrado que la región promotora de KLF2 tiene un sitio de unión para el factor de transcripción FoxO1 (37). Se ha reportado que la hiperglucemia activa a FoxO1. La sobre-expresión de FoxO1 debido a hiperglucemia crónica induce muerte celular programada o apoptosis y detiene la proliferación de las células β -pancreáticas en pacientes con DM2 (21). El incremento en la actividad

de FoxO1 aumenta la apoptosis y la inflamación, lo que disminuye la eficiencia de la cicatrización en condiciones de hiperglucemia. En condiciones normales de cicatrización FoxO1 mejora la migración de queratinocitos; en condiciones de hiperglucemia FoxO1 se hiperactiva lo que disminuye la migración de queratinocitos en más de un 50%, esto se demostró en experimentos *in vitro* o *in vivo* en ratones diabéticos (38). En una línea celular endotelial (HUVEC) donde se sobre-expresó FoxO1, se observó una disminución en la división y migración de estas células; por lo contrario al silenciar FoxO1 se promovió la angiogénesis (39).

Existen terapias alternativas que facilitan y aceleran la cicatrización de heridas como: dermis humana cultivada, factores de crecimiento, presión negativa, larvoterapia y la OTH (11). La OTH consiste en dar a respirar al paciente oxígeno al 100% a través de una mascarilla en un cuarto hermético denominado cámara hiperbárica, para poder alcanzar la misma presión en todo el cuerpo, llegando a 1.5 atmósferas absolutas de presión. Esto permite que el oxígeno penetre con mayor facilidad en la sangre y los tejidos del paciente llegando especialmente a aquellas áreas afectadas por alguna lesión. Los efectos benéficos de la OTH incluyen la mejoría de las úlceras, reducción del edema, cicatrización y aumento de la respuesta inmune del hospedero (14). En diferentes estudios en pacientes con pie diabético se ha visto que la OTH facilita la cicatrización de las úlceras comparados con un grupo placebo a los cuales se les administra sólo aire (40). En el grupo de trabajo se ha observado que los pacientes con pie diabético con tratamiento convencional de control de diabetes y OTH presentan una disminución en la hipoxia e inflamación, así como mejoría significativa de las úlceras (manuscrito en elaboración).

JUSTIFICACIÓN

En el Hospital de Infectología del C.M.N. La Raza, IMSS se cuenta con una cámara hiperbárica, en la cual se tratan diversos tipos de úlceras del pie diabético, en los cuales se ha reportado mejoría clínica significativa comparado con aquellos que no reciben el tratamiento, presentándose cicatrización de las úlceras. La importancia de explicar los mecanismos de la regulación de la inflamación y la angiogénesis a través del estudio de la expresión de moléculas implicadas, proporcionará evidencias para apoyar la aplicación de esta terapia alternativa para los pacientes diabéticos con úlceras en el pie.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Puede la OTH modular la expresión y acción de KLF2 y FoxO1 sobre el NO y su efecto en la angiogénesis y cicatrización de pacientes con DM2 y pie diabético?

HIPÓTESIS

La OTH aumenta la disponibilidad de oxígeno en los tejidos, esto genera resolución del estrés hipóxico y disminución en los niveles de expresión de FoxO1, aumento de KLF2 y activación de sus genes blanco como es el caso de eNOS, por lo que se espera la reducción de la inflamación y por consiguiente la restauración del proceso de angiogénesis y cicatrización.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión de FoxO1 y KLF2, la angiogénesis y la fibrosis en pacientes con DM2 y pie diabético sometidos a OTH

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la presencia de las proteínas KLF2 y FoxO1 por medio de inmunohistoquímica de biopsias de pacientes con pie diabético antes y después de la OTH.
- Determinar los niveles de expresión a nivel traduccional de KLF2 y FoxO1 en biopsias de pacientes con pie diabético antes y después de la OTH.
- Determinar los niveles de expresión a nivel transcripcional de KLF2 en biopsias de pacientes con pie diabético antes y después de la OTH.
- Determinar la producción de NO por medio de la reacción de Griess en plasma de pacientes con pie diabético antes y después de OTH.
- Determinar la angiogénesis y fibrosis por medio de la tinción de tricromo de Masson en cortes histológicos de biopsias de pacientes tratados antes y después de OTH.

MATERIAL Y MÉTODOS

Modelo experimental

Pacientes con DM2 y pie diabético que cursan con Wagner 3 y 4 fueron seleccionados para participar en el ensayo.

Pacientes

Criterios de inclusión

- Pacientes mayores de 18 años de edad.
- Sexo masculino o femenino.
- Con diagnóstico de DM2 y pie diabético.
- Con lesión de tejidos blandos de extremidades inferiores, vírgenes al tratamiento.
- Con lesiones abiertas evidentes que dentro de su manejo incluyan desbridamiento (bordes quirúrgicos) previo al tratamiento con OTH y susceptibles de tomar la muestra inicial previa aceptación del consentimiento informado.
- Con toma de muestra de lesiones persistentes que dentro de su manejo incluyan desbridamiento después de iniciado el tratamiento con OTH previa aceptación del consentimiento informado.
- Con o sin insuficiencia arterial o venosa (superficial y/o profunda)
- Con o sin padecimientos asociados que no influyan sobre la oxigenación de tejidos blandos como hipertensión arterial sistémica.

Criterios de exclusión

- Pacientes con diagnóstico de Diabetes tipo 1.
- Pacientes con diagnóstico de sepsis u otro padecimiento que curse con respuesta inflamatoria sistémica severa (SIRPA) o falla orgánica múltiple.
- Pacientes con cualquier otra enfermedad que curse con hipoxia de origen cardiaco o no cardiaco o, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

- Pacientes con complicaciones graves como por ejemplo coma hipoglucémico.
- Úlceras resueltas.

Criterios de eliminación

- Pacientes que se retiren voluntariamente del estudio.
- Pacientes con expediente clínico incompleto.
- Pacientes cuyas muestras sanguíneas o tejidos no sean factibles de procesar por situaciones inherentes a la toma y/o procesamiento de la misma.
- Pacientes en quienes no se pueda tener acceso al tejido productivo de desbridamiento (bordes quirúrgicos) o estas sean insuficientes o inadecuadas.
- Úlceras resueltas

Tamaño de la muestra

Se reclutaron un total de 18 pacientes de los cuales 11 completaron las 20 sesiones de OTH y de ellos sólo a 9 se les pudo tomar biopsia tanto al principio como al final. Los otros 3 pacientes no se les pudo tomar biopsia al final de la terapia debido a la cicatrización avanzada que mostraron después del tratamiento.

Aspectos éticos y de bioseguridad

Aspectos éticos

Se requirió carta de consentimiento informado, la cual fue discutida con los médicos tratantes.

Riesgo de la investigación

Se trató de un estudio con riesgo mayor al mínimo. Se realizaron seis tomas de muestra de sangre periférica antes y después de la sesiones 1, 11, y 20 de OTH, en dónde el riesgo fue bajo ya que sólo implicó una punción venosa y recolección de 10 ml de sangre, la cual pudo presentar dolor en la toma y en algunas ocasiones inflamación local y hematoma. Se tomaron dos biopsias como riesgo agregado, una de lesiones evidentes en el momento del diagnóstico con tejidos vírgenes al tratamiento con OTH y la otra después de 20 sesiones de iniciado el tratamiento en lesiones residuales.

Confidencialidad

Todos los datos proporcionados por los pacientes fueron manejados de manera estrictamente confidencial por personal autorizado, y no fueron revelados, nombres, ni datos personales de los pacientes.

Se solicitó el consentimiento informado una semana antes de la OTH, una vez que los pacientes fueron evaluados por el médico infectólogo y cumplieron con los criterios de inclusión, previa autorización del médico cirujano tratante. El médico internista no forma parte del equipo tratante.

- Se obtuvo consentimiento informado de los pacientes.
- Los datos clínicos requeridos son los asociados al proceso infeccioso y fueron recabados por el médico encargado de la exploración inicial de los pacientes.
- En este estudio no se administraron medicamentos distintos al esquema terapéutico establecido por el médico tratante.
- Este estudio se apegó a la norma ética de la Ley General de Salud y la declaración de Helsinki, enmendada en 1993. Así como al Código Sanitario de los Estados Unidos Mexicanos.
- Se informó al médico tratante de cualquier hallazgo del estudio del paciente que pueda ser de relevancia. El mismo fue quien evaluó la pertinencia de cualquier otro procedimiento diagnóstico o terapéutico oportuno, y si fue requerido, la derivación del enfermo para su adecuada atención.

Aspectos de Bioseguridad

Los participantes contaron con la capacitación adecuada para la toma, manejo, transporte, manipulación y almacenamiento de las muestras biológica.

El Laboratorio Central de Epidemiología (LCE), conto con la infraestructura y equipamiento de nivel de bioseguridad 2, adecuados para realizar los procedimientos del laboratorio.

Asimismo, declara que se conoce, se ha leído y se cumplió con las normas, reglamentos y manuales de bioseguridad que apliquen al proyecto:

- Ley General de Salud.
- Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación Para La Salud.
- Bioseguridad en laboratorios biomédicos y microbiológicos 2009, (5ª Edición), Centro para el control y prevención de enfermedades (CDC), Institutos Nacionales de Salud, Departamento de Salud y Servicios Humanos, USA.
- Manual de Bioseguridad en el Laboratorio OMS (2005).
- Norma Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012. Disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos.
- Norma Oficial Mexicana NOM-087-SSA1-2002. Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.
- Manual de Bioseguridad y Biocustodia del LCE, DLVIE. Vigente.
- OMS. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances. WHO/HSE/GCR/2015.

También manifiesta que existió evidencia documental auditable de que:

- Se contó con los permisos y/o licencias oficiales que se requieran para llevar a cabo el trabajo propuesto.

- Las instalaciones del laboratorio involucrado se encontraban en estado satisfactorio de operación y eran adecuadas para llevar a cabo el trabajo propuesto.
- El equipo que se utilizó se encontraba en estado satisfactorio de operación.
- Se utilizaron dispositivos personales de protección que se encuentran en estado satisfactorio de operación.
- Los involucrados en el proyecto, incluyendo a los estudiantes que participaron en el mismo, recibieron la capacitación necesaria para trabajar con el material señalado anteriormente.
- Se mantuvieron las condiciones adecuadas de instalaciones, equipo y personal durante el desarrollo del proyecto.
- El LCE contó con un sistema nacional de transporte de muestras que garantizó la bioseguridad y biocustodia del material biológico.

Tratamiento y toma de la muestra

Los pacientes que cumplieron los criterios de inclusión, recibieron la terapia de oxígeno hiperbárico (OTH) en sesiones diarias, de una hora durante veinte días. Se tomaron muestras de sangre total antes y después de la OTH, en las sesiones 1, 11 y 20. También se tomaron biopsias antes de la sesión 1 y después de la sesión 20.

Procesamiento de las biopsias

Las biopsias fueron fijadas con formol/PBS 1X (4% v/v) por 8 días. Posteriormente fueron procesadas y embebidas en parafina. Se realizaron cortes de 4 μm y fueron montadas en un baño maría de flotación que contenía agua con gelatina en portaobjetos para la tinción de tricromo de Masson y en portaobjetos cargados electrostáticamente para las inmunohistoquímicas con agua a 60°C.

Elaboración de la Inmunohistoquímica

Los cortes histológicos se desparafinaron a 60°C. A continuación, se colocaron en el equipo automatizado marca Roche Ventana modelo BenchMARK GX. Posteriormente, se adicionó el anticuerpo diluido con SBF/PBS 1X (10% v/v)

según fuera el caso. Los anticuerpos utilizados fueron: (Mouse IgG Abcam, No. de Cat. ab102445), anti-KLF2 (LKLF rabbit IgG Santa Cruz Biotechnology, No. Cat. sc-28675), anti-FoxO1 (FoxO1 rabbit IgG Cell Signaling 1:100, No. Cat. 2880) y P-FoxO1 (P-FoxO1 [Ser-256] rabbit IgG Cell Signaling 1:100). El desarrollo de color se realizó con el kit ultraView Universal DAB Detection (Ventana Medical Systems). Después de terminado el tratamiento en el equipo, las laminillas se lavaron con agua y jabón neutro y se secaron a temperatura ambiente por 12 horas y se montaron con resina sintética y cubre objetos.

Visualización y análisis de las Inmunohistoquímicas

Las laminillas se visualizaron y analizaron en el microscopio Olympus modelo BX53 a 10X, 40X y 100X, utilizando el software cellSens Dimension. Se tomaron 10 campos al azar a 40X y posteriormente se seleccionó el tono de color café que revela la expresión de la proteína de interés. Esta tonalidad del color varía dependiendo si se encuentra en el núcleo (café intenso) y en el citoplasma (café claro), esto ayudó a determinar la expresión en los diferentes compartimientos celulares. Se obtuvo un valor en porcentaje de Región de Interés (%ROI) del tono seleccionado en píxeles.

Western blot a partir de biopsias

Las biopsias de pie diabético fueron procesadas para la técnica de western blot. Brevemente, los tejidos fueron triturados en un mortero estéril con la adición de nitrógeno líquido. Posteriormente los extractos de proteínas totales se obtuvieron utilizando buffer de lisis. Las proteínas fueron cuantificadas y desnaturalizadas con calor y a partir de las concentraciones de las proteínas totales de cada muestra problema, se ajustaron a una concentración de 20 µg/mL de proteínas. Se realizaron geles de acrilamida al 12% para separar la proteína KLF2 (37 kDa) y al 8% para FoxO1 (78-82 kDa) y p-FoxO1 (82 kDa). La transferencia se realizó en membranas de nitrocelulosa. Los anticuerpos usados fueron; primario anti-KLF2 (LKLF (H-60) rabbit IgG, Santa Cruz Biotechnology, 1:500, No. Cat. sc-28675), anti-FoxO1 (FoxO1 rabbit IgG Cell Signaling, 1:1000, No. Cat. 2880), P-FoxO1 (P-FoxO1 [Ser-256] rabbit IgG Cell Signaling, 1:1000, No. Cat. 9461) y como control de carga 1^{ro} anti-β-actina (mouse IgG Millipore, 1:2500, No. Cat. MAB1501). Para

el revelado, se adicionó sustrato para quimioluminiscencia (Super Signal® West-Pico, Thermo Scientific).

Análisis del Western blot

Se tomó la imagen del western blot en el equipo de revelado BioRad ChemiDoc™ XRS+ System. Para el análisis de western blot se utilizó el programa Image J que toma valores en pixeles de la banda en específico. Posteriormente esto se normalizó con β -actina obteniendo un valor de expresión relativa (E.R.).

Extracción de RNA de muestras de tejido parafinado

Las muestras de tejido embebido en parafina fueron usadas para la extracción de RNA total por medio del kit RecoverALL™ (Life Technologies™ No. de Cat. AM1975). Se realizó la extracción según las especificaciones del kit. Brevemente, se cortaron de 300 μ m del bloque de parafina con el tejido en un micrótopo marca Microm No. de Cat. HM325, se homogeneizó el tejido con nitrógeno líquido y se adiciono xileno al 100% a la muestra mezclando con vortex. Se centrifugo y decanto el xileno sin perturbar el pellet. Posteriormente se añadió etanol al 100%. Se decantó el alcohol y se dejó secar a temperatura ambiente hasta que se eliminó. A continuación, se adiciono buffer de digestión. Los pasos siguientes consistieron en pasar el tejido por columnas de exclusión/afinidad molecular, realizando lavados e incubaciones con proteasa y DNasa. Al final el RNA fue obtenido de la columna por medio de un buffer de elución.

Cuantificación y determinación de la integridad del RNA

El RNA obtenido fue cuantificado en un Nanodrop marca ThermoScientific No. de Cat. 2000C. Se realizó un gel de agarosa 8 % para correr las muestras de RNA y localizar las bandas del RNA ribosomal que corresponden a 18S y 28S, todo eso para verificar la integridad del RNA y que no se encuentre contaminado con DNA y proteínas.

PCR en tiempo real

Por medio de la enzima Super Script III Platinum® One Step RT-qPCR (No. de Cat. 11732-088), se realizó la retrotranscripción del RNA extraído y la amplificación del cDNA. Se utilizaron sondas TaqMan® prediseñadas para KLF2 la

secuencia consenso de reconocimiento fue: 5´ CTG CAG GAG CGC TGG CCG CGC GCC G 3´. La RT-qPCR fue realizado en un termociclador 7500 Fast (Applied Biosystem) Para la cuantificación de la expresión de KLF2 se utilizó el método de Curva Estándar Relativa. Brevemente, se seleccionó una muestra de referencia donde se exprese de forma constante KLF2 en este caso fue RNA extraído de la línea celular Raji. Se realizan los cálculos para saber cuántas copias del RNA de KLF2 se encuentran en la muestra de referencia. Posteriormente se hacen diluciones 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 y se realiza la RT-qPCR tanto de las muestras de los pacientes tratados con OTH como de las muestras de la curva estándar. Los resultados se obtienen al interpolar los datos en la curva estándar. Se utilizó RP como gen endógeno con secuencia consenso de reconocimiento: 5´ TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG 3´.

Determinación de la concentración de óxido nítrico

Se realizó la reacción de Griess con el kit colorimétrico Cayman Chemical (No. de Catálogo 780001) para la determinación de nitratos y nitritos. La cual es directamente proporcional a la concentración de NO medida en plasma de pacientes que recibieron OTH antes y después de 20 sesiones. El desarrollo de color se midió a 540 nm en un espectrofotómetro de microplacas marca xMark BioRad.

Tinción de tricromo de Masson

Se realizó la tinción de tricromo de Masson para la determinación del porcentaje de fibrosis y la angiogénesis de *novo*. Brevemente, las biopsias de los pacientes recolectadas antes y después del tratamiento, fueron fijadas e incluidas en parafina y se tiñeron con hematoxilina de Weigerth, fucsina ácida-Biebrich Scarlet y contrateñidas con azul de anilina. Se realizó el análisis a 40X utilizando un microscopio Olympus, modelo BX53 (Center Valley, PA, USA). Se analizaron las laminillas de los pacientes antes y después del tratamiento.

Determinación de fibrosis

Para la determinación de fibrosis se utilizó la tinción de tricromo de Masson ya que esta técnica permite distinguir la colágena en color azul, la cual es característica de un proceso de fibrosis. Se seleccionaron 10 campos al azar a 40X y se seleccionó el área de fibrosis que es directamente proporcional a la cantidad e intensidad del color azul de la tinción utilizando el software cellSens Dimension® (Olympus, Center Valley, PA, USA). Se obtuvo el promedio de los valores obtenidos en diez campos. Los resultados se analizaron con la prueba estadística de Wilcoxon.

Determinación de angiogénesis

Para la determinación de la angiogénesis se contaron vasos sanguíneos en un total de 10 campos a 40 X de cada laminilla y se calculó un valor promedio.

Análisis estadístico

Por medio del paquete estadístico GraphPad Prism versión 6, se realizaron las gráficas y las pruebas estadísticas de Wilcoxon, Friedman y correlación de Pearson. $P \leq 0.05$ se consideró estadísticamente significativa.

RESULTADOS

Úlceras de pie diabético antes y después de la OTH

Los pacientes autorizaron la toma de imágenes fotográficas de las úlceras de pie diabético antes y después de las sesiones de OTH, lo que permitió monitorear la cicatrización. Como se puede observar las heridas antes del tratamiento con OTH se encuentran más expuestas (fig. 1 A y C), en la imagen después del tratamiento se ve una reducción del tamaño de la herida y formación de tejido de granulación (fig. 1 B y D).



Fig. 1. Úlceras de pie diabético antes y después de OTH. Se observa fotografías de las úlceras de pie diabético antes de las sesiones de OTH (A y C) y después de OTH (B y D). Las flechas señalan la localización de tejido de granulación.

Características basales de los pacientes que tomaron OTH

Se recopiló información de los pacientes mediante un cuestionario que incluyó antecedentes sobre su enfermedad y su tratamiento. En la tabla se observan las características basales de los pacientes y su tratamiento antes de tomar la OTH (Tabla 2).

Tabla 2. Características basales de los pacientes.	
Número de pacientes	18
Hombres	15
Mujeres	3
Edad	51 (25-78)
Duración de diabetes (años)	17 (0-34)
Tiempo con aparición de úlceras de pie diabético (meses)	4 (1-14)
Factores de riesgo (%)	
Tabaquismo	28
Alcoholismo	28
Clasificación Wagner (%)	
Wagner 3	72.8
Wagner 4	22.2
Tratamiento (%)	
Insulina	27.8
Glibenclamida	27.8
Metformina	5.6
Glibenclamida + Insulina	16.7
Glibenclamida + Metformina	5.6
Insulina + Metformina	5.6
Insulina + Dioglitazona	5.6

Variables continuas en medianas y variables categóricas en porcentaje.

Control de Isotipo

Antes de realizar las inmunohistoquímicas con los anticuerpos primarios para KLF2, FoxO1 y P-FoxO1 se realizó un ensayo con anticuerpo anti-mouse IgG.

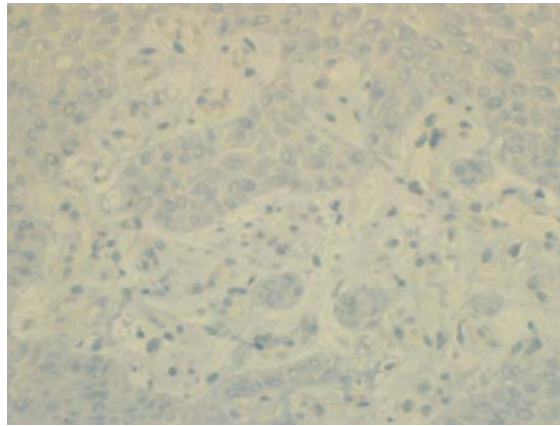
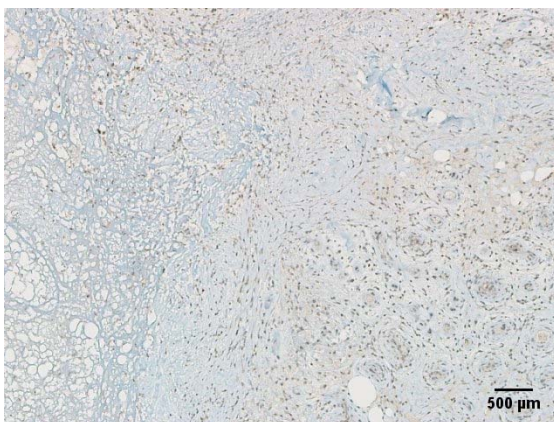


Fig. 2. Control de isotipo. Se observa el control de isotipo realizado con tejido de la biopsia de pie diabético visualizada a 40X.

Expresión de KLF2 por la técnica en Inmunohistoquímica

Se observan las imágenes de las inmunohistoquímicas más representativas de la expresión de KLF2 realizadas con biopsias de pacientes con pie diabético antes y después del tratamiento (20 sesiones de OTH) (fig. 3A-F). En las imágenes a 100X se observó que antes de OTH (fig.3E) la proteína KLF2 se encuentra principalmente en el citoplasma (flecha regular) y después de OTH (fig. 3F) KLF2 se localiza en su totalidad en el núcleo (flecha gruesa).

A



B



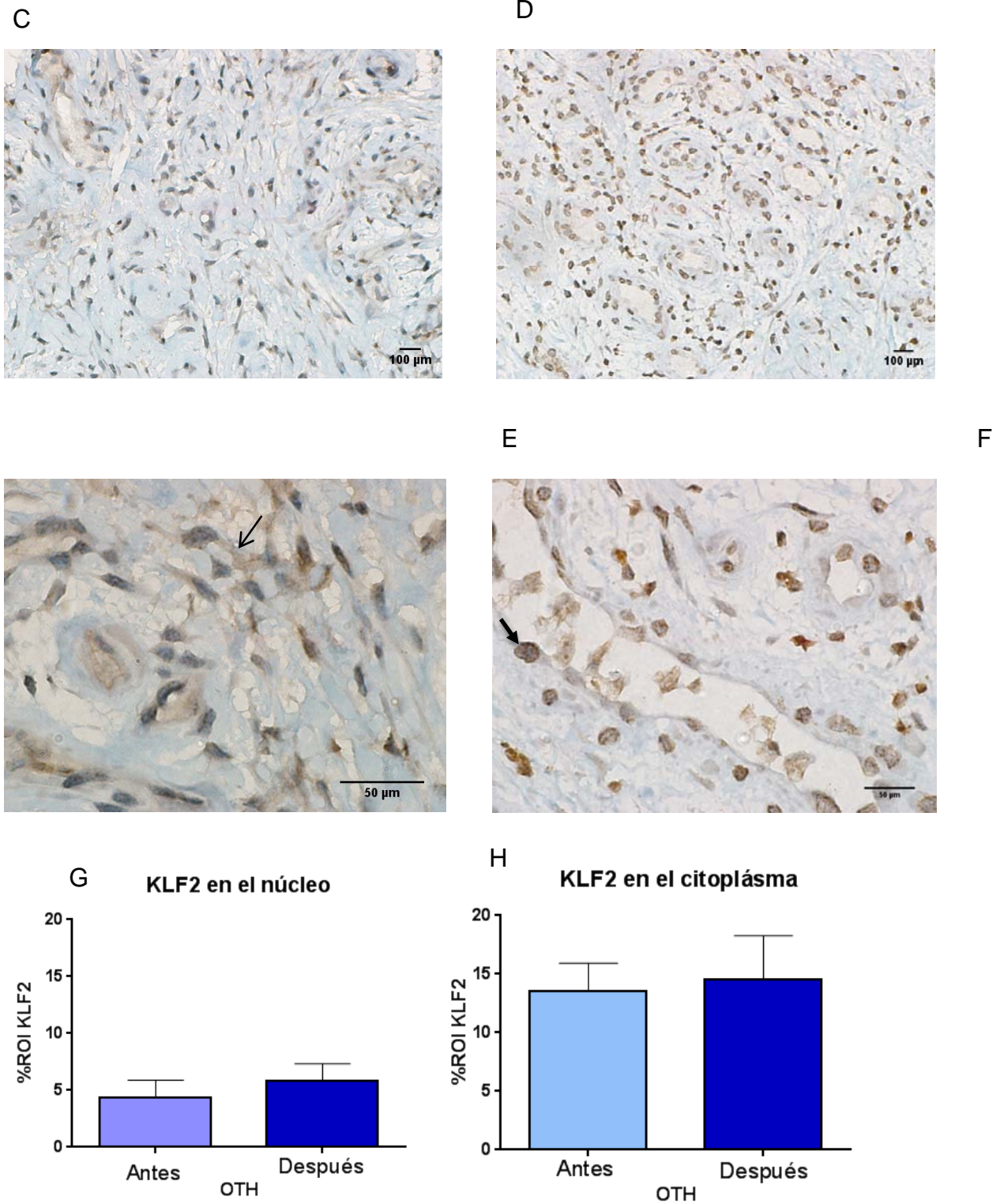


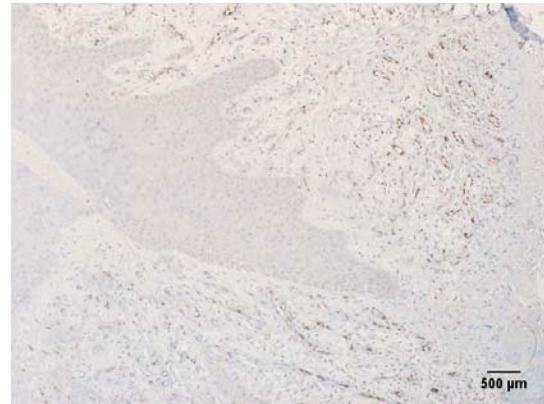
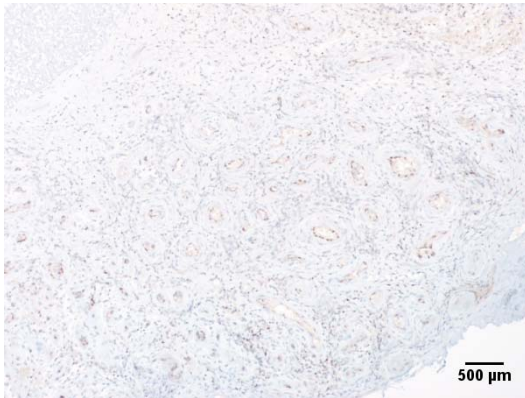
Fig. 3. Expresión de KLF2 por inmunohistoquímica. Inmunohistoquímicas realizadas con biopsias tomadas antes de las sesiones de OTH visualizadas a 10X (A), 40X (C) y 100X (E) y después de 20 sesiones 10X (B), 40X (D) y 100X (F). (G) La gráfica representa el porcentaje de Región de Interés (% ROI) de la expresión de KLF2 en el núcleo (flecha gruesa) obtenido con el software cellSens de Olympus con las biopsias recolectadas

antes y después de OTH ($p=0.57$). (H) La gráfica representa el % ROI de la expresión de KLF2 en el citoplasma (flecha regular) ($p=0.99$).

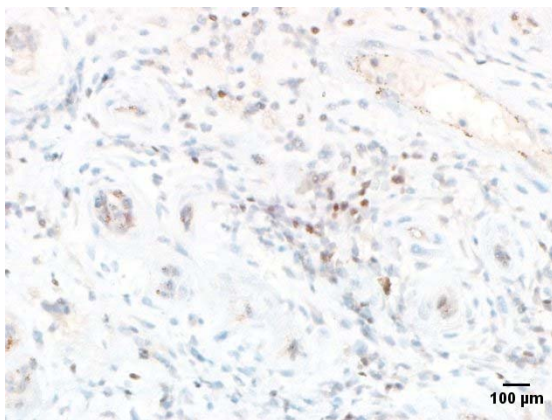
Expresión de FoxO1 por la técnica en Inmunohistoquímica

Se realizaron las inmunohistoquímicas para el análisis de la expresión de FoxO1 en las biopsias de pacientes tratados antes y después de la OTH (fig. 4A-F). Se observa una disminución en la presencia de FoxO1 en el núcleo en las biopsias de pacientes tratados con OTH ($p=0.07$) (fig. 4G). En consecuencia se observa un aumento de la presencia de FoxO1 en el citoplasma ($p<0.05$) (fig.4H). En las imágenes a 100X se observa que hay más células con presencia de FoxO1 en el núcleo antes de OTH (fig. 4E flecha gruesa) y una disminución después de la OTH (fig. 4F flecha gruesa).

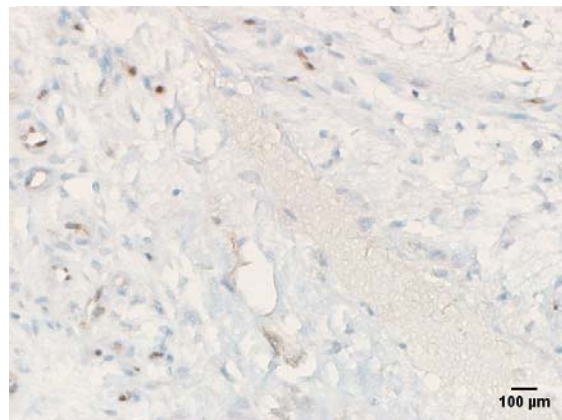
B



C



D



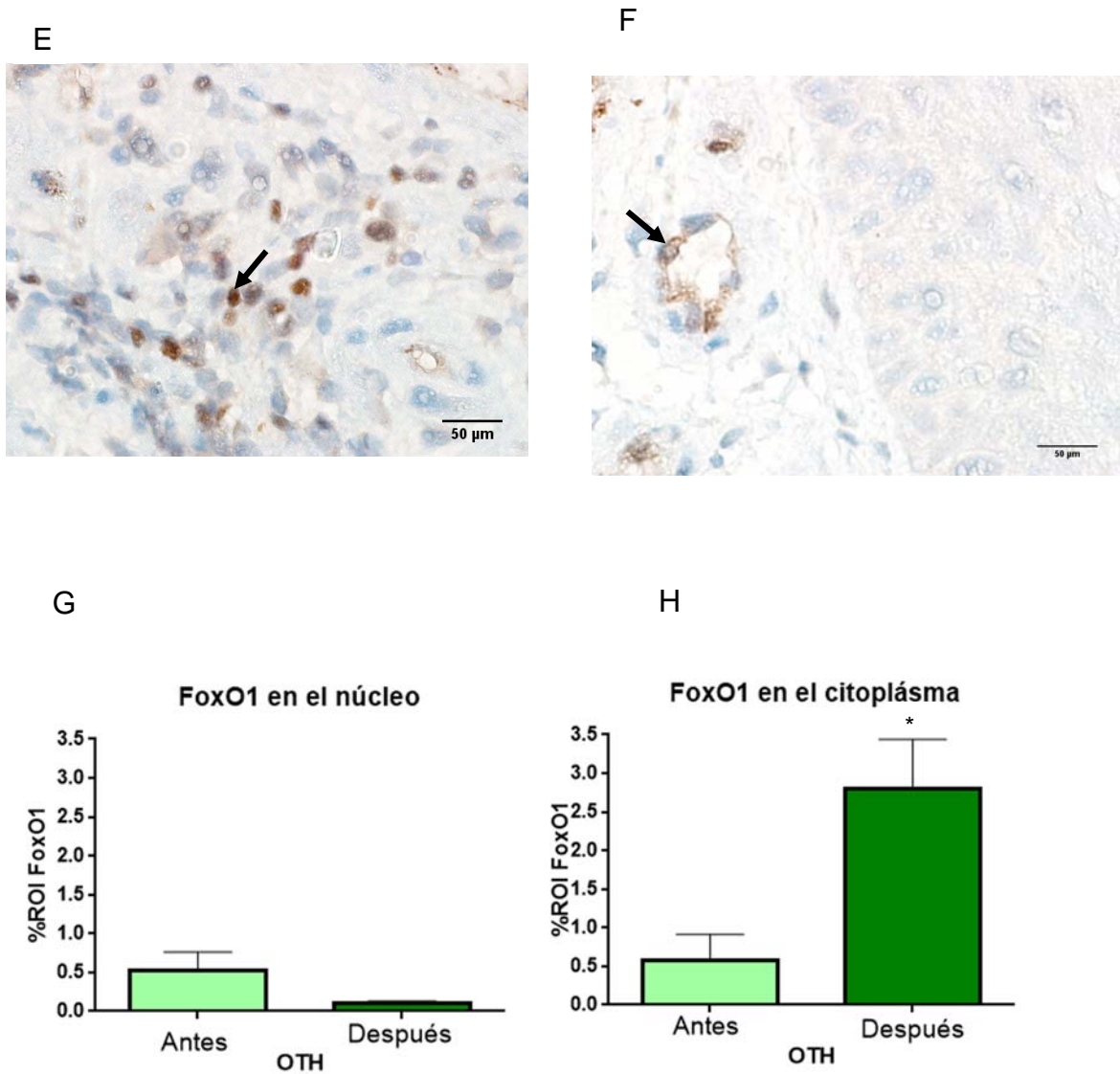
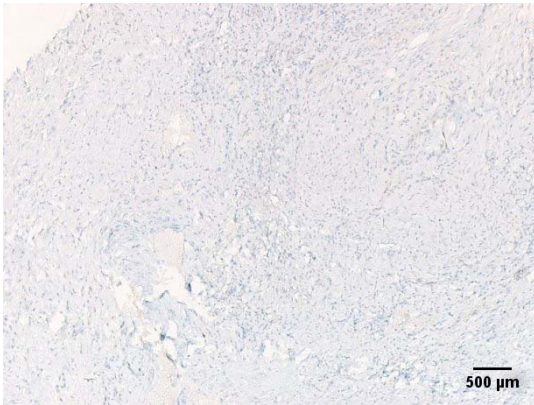


Fig. 4. Expresión de FoxO1 por inmunohistoquímica. Inmunohistoquímicas realizadas con biopsias tomadas antes de las sesiones de OTH visualizadas a 10X (A), 40X (C) y 100X (E) y después de 20 sesiones 10X (B), 40X (D) y 100X (F). (G) La gráfica representa el porcentaje de Región de Interés (% ROI) de la expresión de FoxO1 en el núcleo obtenido con el software cellSens de Olympus con las biopsias recolectadas antes y después de OTH ($p=0.07$). (H) La gráfica representa el % ROI de la expresión de FoxO1 en el citoplasma ($p<0.05$). La flecha negra señala la presencia de FoxO1 en el núcleo.

Expresión de P-FoxO1 por la técnica en Inmunohistoquímica

En las inmunohistoquímicas realizadas para detectar la presencia de FoxO1 fosforilado (P-FoxO1) (fig. 5A-F), se encontró un aumento en la fosforilación de FoxO1 después de OTH en citoplasma (fig. 5F flecha) ($p < 0.05$) (fig. 5H). Además de que la proteína fosforilada de FoxO1 no se encontró en núcleo (fig. 5G).

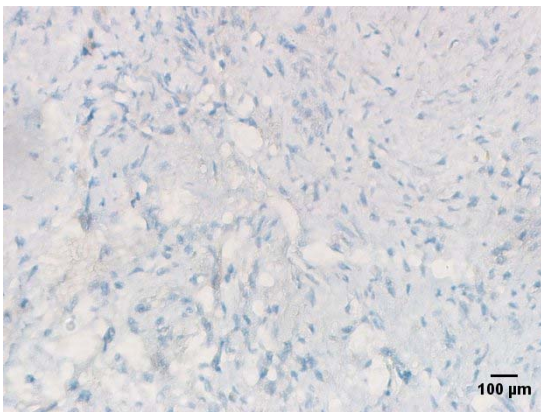
A



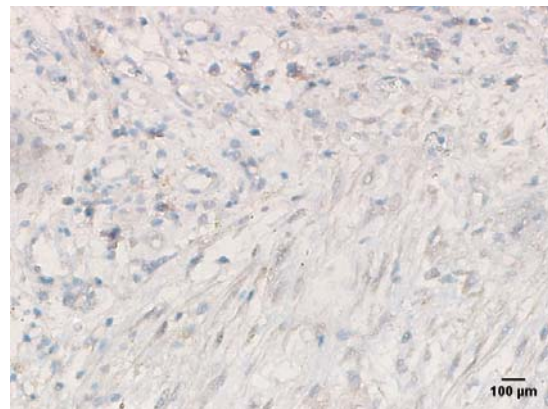
B



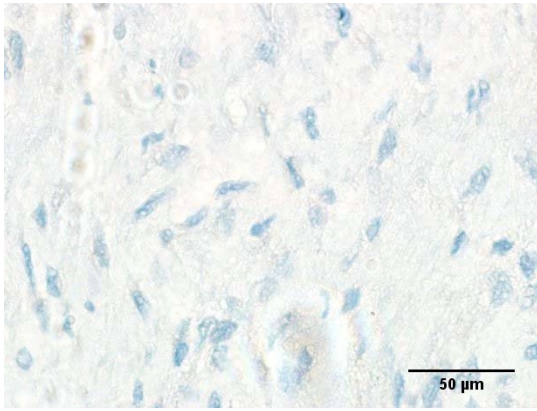
C



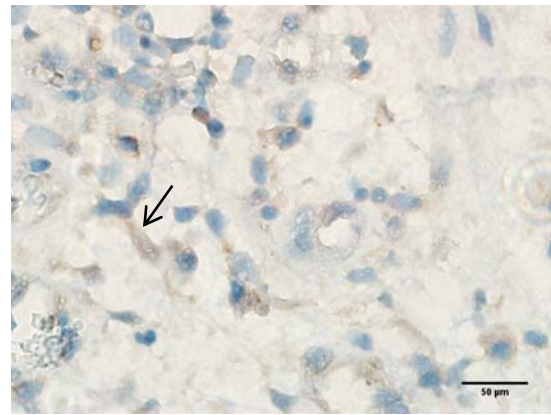
D



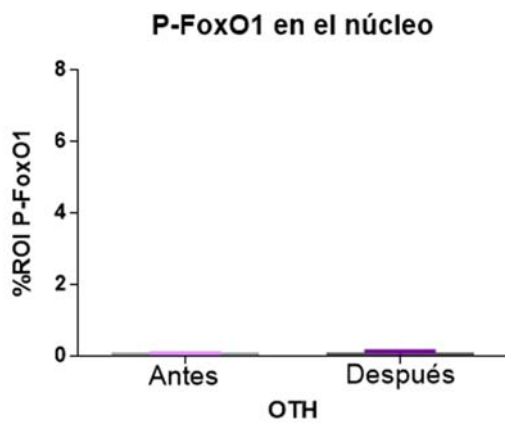
E



F



G



H

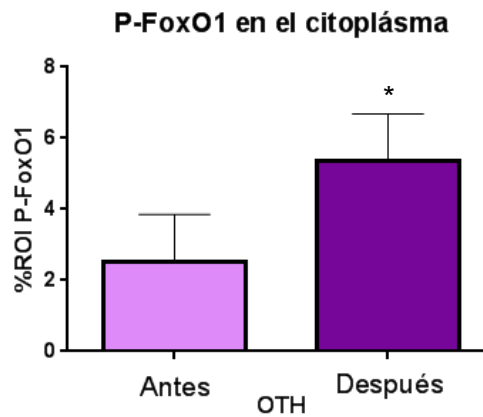
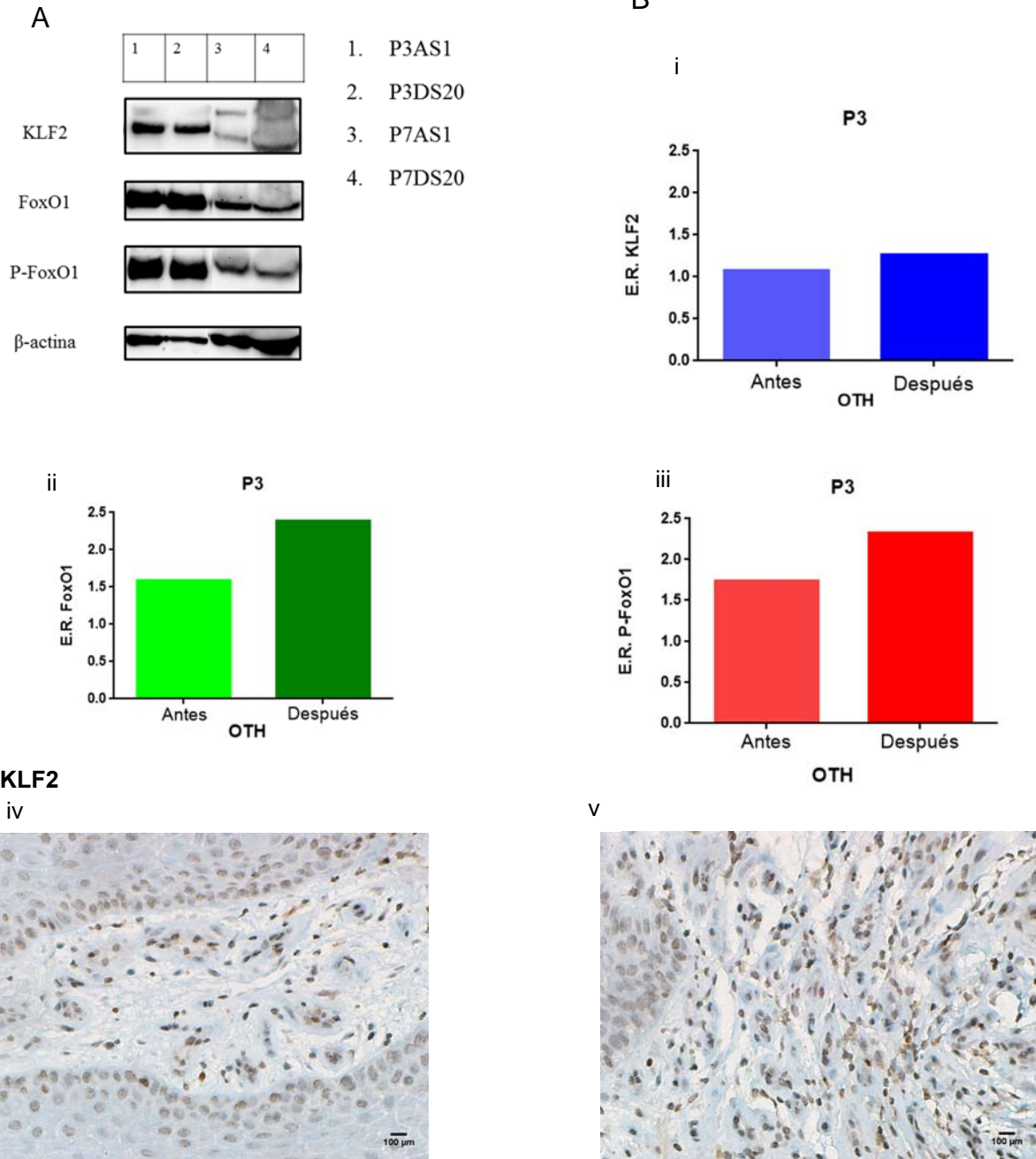


Fig. 5. Expresión de P-FoxO1 por inmunohistoquímica. Inmunohistoquímicas realizadas con biopsias tomadas antes de las sesiones de OTH visualizadas a 10X (A), 40X (C) y 100X (E) y después 10X (B), 40X (D) y 100X (F). (G) La gráfica representa el porcentaje de Región de Interés (% ROI) de la expresión de P-FoxO1 en el núcleo obtenido con el software cellSens de Olympus con las biopsias recolectadas antes y después de OTH. (H) La gráfica representa el % ROI de la expresión de FoxO1 en el citoplasma ($p < 0.05$). La flecha negra señala la presencia de P-FoxO1 en el núcleo.

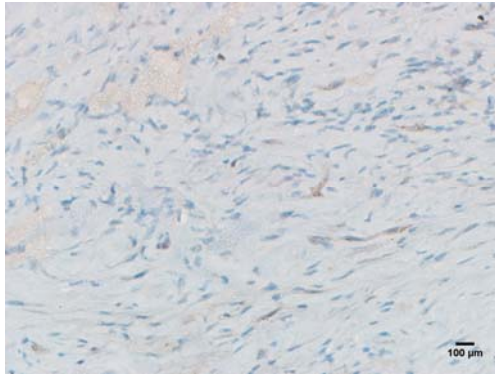
Expresión de biomarcadores en biopsias de pacientes tratados con OTH

Se realizaron western blot con extractos de proteínas totales de biopsias de pie diabético tomadas antes y después de la OTH (fig. 6A). Se considera que cada paciente es su propio control, es por ello que se realizó un análisis individual comparando la expresión del western blot y su inmunohistoquímica correspondiente. Paciente 3 (Fig. 6B i-ix). Paciente 7 (Fig. 6C i-ix).

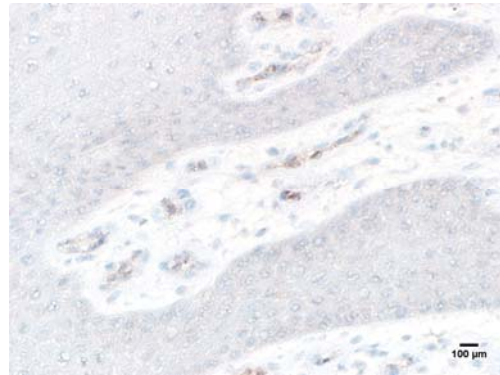


FoxO1

vi

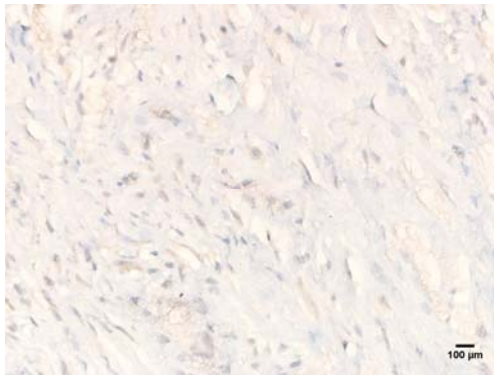


vii

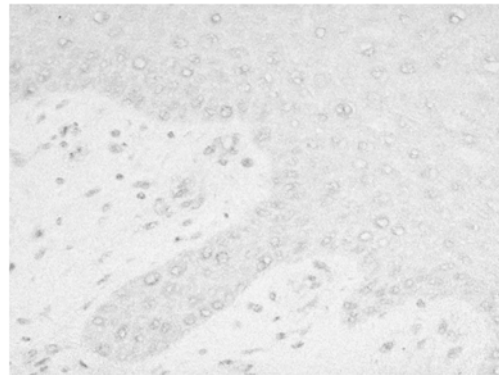


P-FoxO1

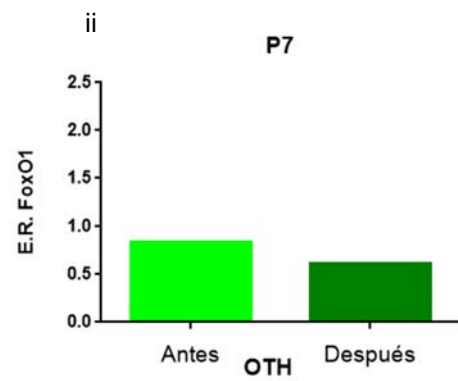
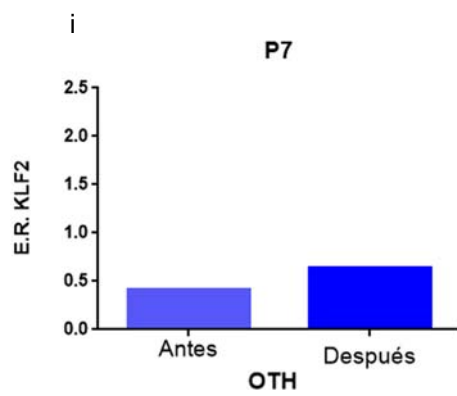
viii



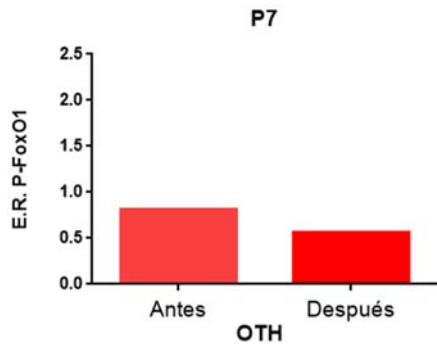
ix



C

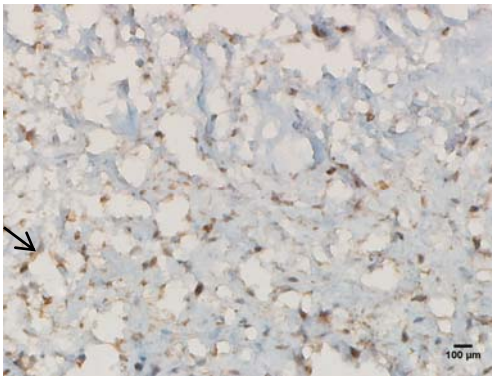


iii

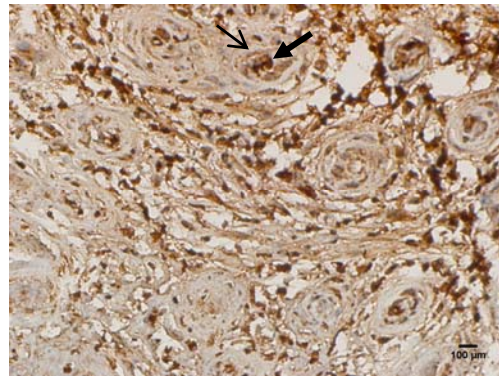


KLF2

iv

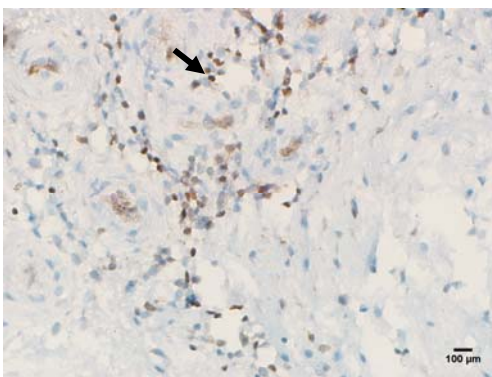


v

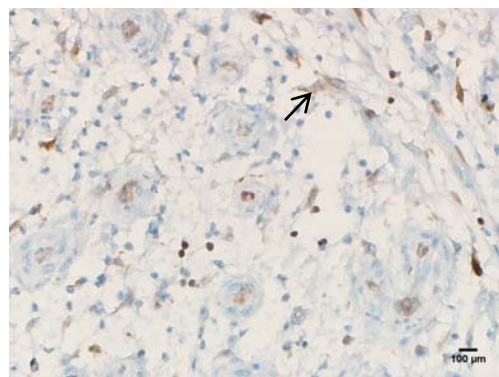


FoxO1

vi

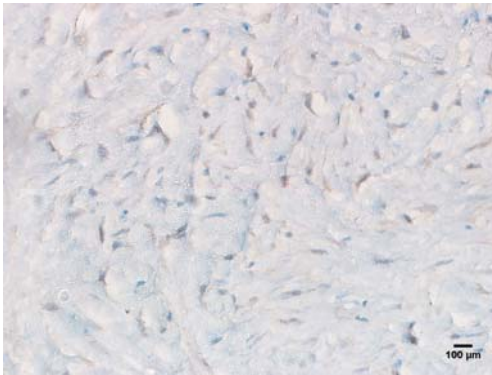


vii



P-FoxO1

viii



vii

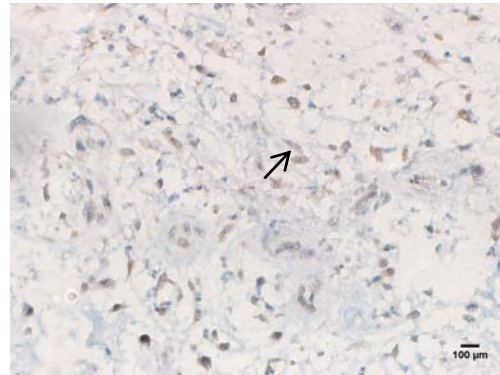


Fig. 6. Expresión de biomarcadores. (A) Western blot realizado con biopsias tomadas antes de la OTH de los pacientes 3 y 7 (P3AS1, P7AS1) y después de la OTH de los pacientes 3 y 7 (P3DS20, P7DS20) de OTH. (B) Gráficas con la expresión relativa (E.R.) de KLF2 (i), Foxo1(ii) y P-Foxo1(iii) del paciente 3 obtenido con el software Image J. Inmunohistoquímicas del paciente 3, para KLF2 antes (iv) y después (v) de OTH, FoxO1 (vi, vii) y P-FoxO1 (viii, ix). Imágenes a 40x. (C) Gráficas con la expresión relativa (E.R.) de KLF2 (i), Foxo1(ii) y P-Foxo1(iii) del paciente 7 obtenido con el software Image J. Inmunohistoquímicas para KLF2 del paciente 7 antes (iv) y después (v) de OTH, FoxO1 (vi, vii) y P-FoxO1 (viii, ix). Imágenes a 40x. Las flechas gruesas señalan la Región de Interés en núcleo y las flechas regulares la Región de Interés en citoplasma.

Producción de Óxido Nítrico (NO) y Angiogénesis

Se realizó la determinación de la concentración de NO en el plasma de los pacientes tratados con OTH con la reacción colorimétrica de Griess (tabla 3). De los 12 pacientes que tomaron las 20 sesiones de OTH 9 presentaron un aumento en la producción de NO y 3 presentaron una disminución de la producción de NO. Se correlacionaron con los datos de la angiogénesis. Aquellos pacientes que presentaron disminución en la producción de NO, se observó que no tuvieron cambio o disminución en el número de vasos fig. 7B.

Tabla 3. Producción de NO y Angiogénesis. En la tabla se encuentran la media \pm error estándar de los datos presentados en la fig. 7.

Pacientes con aumento de NO (media \pm ES)			Pacientes sin aumento de NO (media \pm ES)		
Sesión 0	Sesión 11	Sesión 20	Sesión 0	Sesión 11	Sesión 20
13.88 \pm 2.69	21.61 \pm 3.28	20.67 \pm 3.64	27.78 \pm 2.96	17.01 \pm 2.82	20.27 \pm 1.87

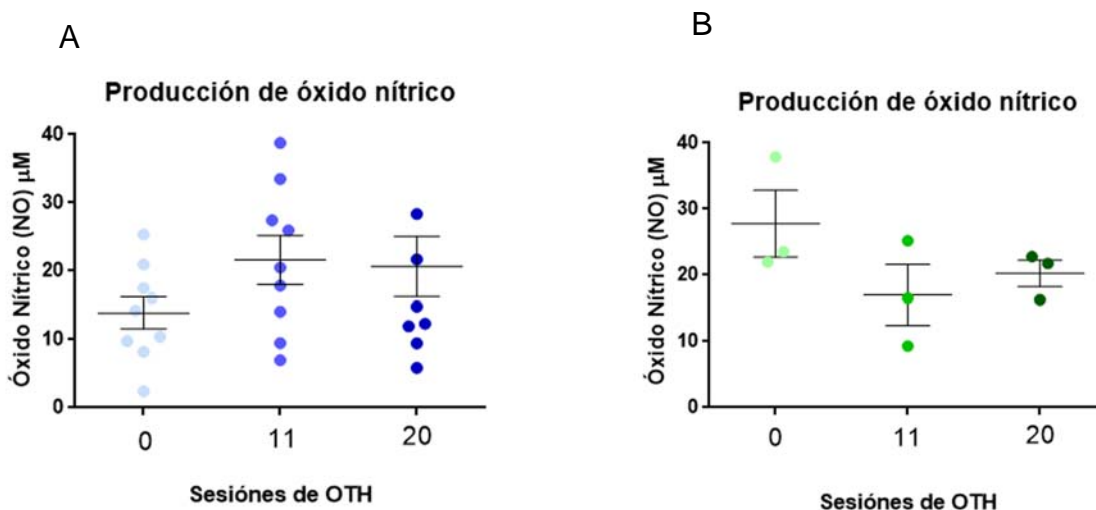
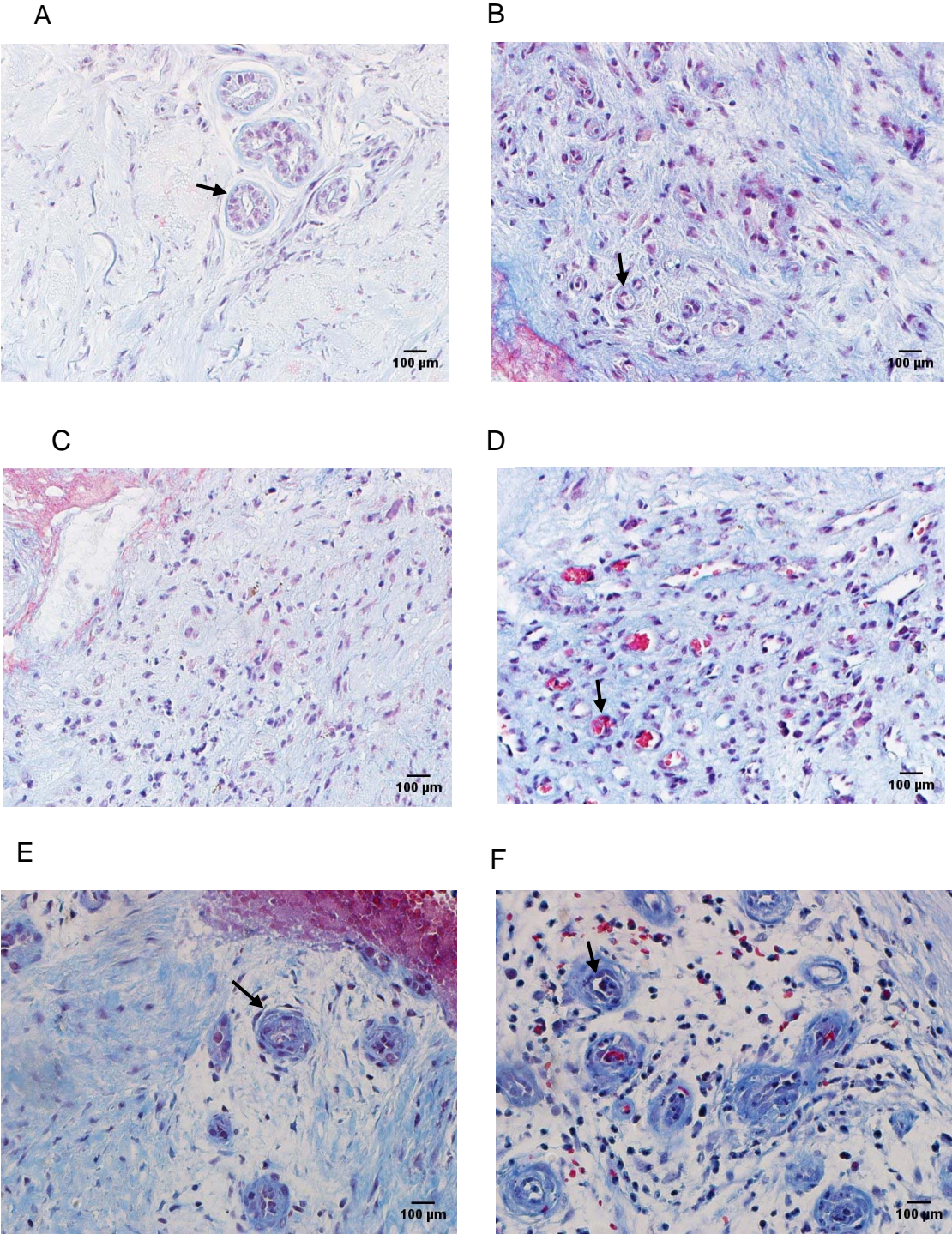


Fig. 7. Producción de NO. Las muestras analizadas corresponden a la sesión 0 (estado basal, antes de la sesión 1), en la sesión 11 (después de la sesión 11) y en la sesión 20 (después de la sesión 20). (A) La gráfica representa la producción de NO de aquellos pacientes que mostraron un aumento ($p=0.39$). (B) Producción de NO en pacientes que no presentaron disminución ($p=0.19$).

Angiogénesis y Fibrosis

Se observan imágenes representativas de laminillas con la tinción de tricromo de Masson realizadas con las biopsias de pacientes que recibieron OTH antes (fig. 8A, C y E) y después de 20 sesiones (fig. 8B, D y F) para determinar la angiogénesis y la fibrosis.



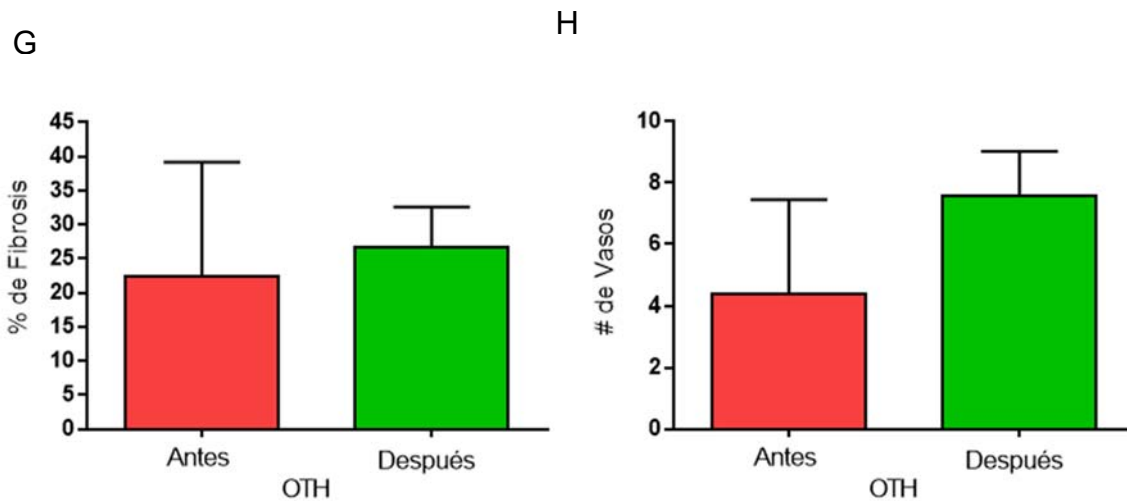


Fig. 8. Angiogénesis y Fibrosis. Tinciones con tricromo de Masson de biopsias tomadas antes de las sesiones de OTH (A, C y E) y después de 20 sesiones (B, D y F) visualizadas a 40X. Se puede observar de color azul las fibras de colágena, de negro o azul oscuro los núcleos, de rojo o morado citoplasma y eritrocitos. Vasos sanguíneos (flechas negras). (G) La gráfica representa el % de Región de Interés de fibrosis (tonalidad azul-violeta) de 10 campos a 40X calculado con el software cellSens de Olympus con las biopsias recolectadas antes y después de OTH ($p=0.314$). (H) La gráfica representa el promedio del número de vasos de 10 campos a 40X antes y después de OTH ($p=0.110$).

KLF2 en el núcleo fomenta la angiogénesis

Al analizar los datos de la presencia de KLF2 en el núcleo se encontró que sólo 2 de los 9 pacientes tuvieron disminución en la presencia de KLF2 en el núcleo (fig. 9A). Estos pacientes no tuvieron aumento en la producción de NO, no presentaron o no hubo cambio en la angiogénesis y tienen un índice de masa corporal de 28.24 y 37.98 respectivamente que es mayor al de los 9 pacientes estudiados. Se observó una correlación positiva (Pearson ($p < 0.05$) entre la presencia de KLF2 en el núcleo y el aumento y/o la formación de nuevos vasos después de OTH (fig. 9B). También se determinó que el 57% de la angiogénesis se debe a la presencia de KLF2 en el núcleo después de la OTH.

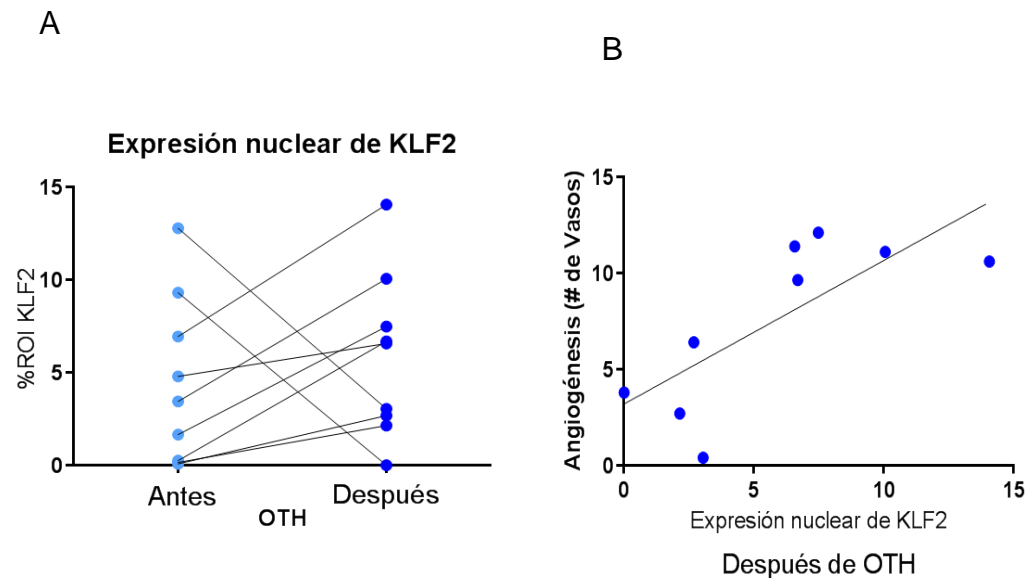


Fig. 9. KLF2 en el núcleo fomenta la angiogénesis. (A) La gráfica representa % Región de Interés (%ROI) de KLF2 en el núcleo en los diferentes pacientes. (B) Correlación de Pearson entre KLF2 nuclear contra la angiogénesis después de la OTH ($p < 0.05$; R^2 linear=0.568; $r=0.75$).

DISCUSIÓN

En México la DM2 ha aumentado de forma alarmante debido principalmente al incremento de los factores que afectan su desarrollo tales como la obesidad (41;42). El mal manejo clínico y el descontrol de los pacientes con DM2 aceleran la presentación de complicaciones como la angiopatía y neuropatía que en conjunto conducen al desarrollo del pie diabético, que eventualmente terminará en amputación. Es por ello la relevancia de evaluar terapias alternativas como la OTH, que favorezcan la cicatrización en pacientes con DM2 y reducir la incidencia de amputaciones de extremidades inferiores.

La presurización a 1.5 ATA y toma de oxígeno al 100% por medio de una mascarilla en los pacientes, caracteriza la terapia con oxígeno hiperbárico. Fomentando la oxigenación a nivel sistémico por medio de la saturación completa de la hemoglobina al 100% y la dilución de 50 mL de O₂ (43). Lo que repercute en la expresión de algunas proteínas, que dependen de las condiciones de oxígeno, por ejemplo, hipoxia induce la expresión de algunos factores de transcripción como es el caso de HIF-1 α que lleva a la expresión de p65 y VEGF. (44). Por lo contrario, cuando las condiciones de oxígeno en las células se restablecen (normoxia) se induce la expresión de KLF2 (36). Se sabe que la condición diabética reduce la expresión de KLF2, en el endotelio glomerular, esto se demostró en ratones diabéticos inducidos con estreptozotocina muestran una reducción de KLF2 (45) En este estudio se encontró que la OTH induce un aumento de KLF2 en el núcleo de fibroblastos y células endoteliales de úlceras de pie diabético en 7 de 9 pacientes estudiados. KLF2 en células endoteliales fomenta la expresión de proteínas de las uniones estrechas y modificaciones en las cadenas ligeras de miosina, importantes para mantener la integridad vascular. KLF2 también induce la expresión de eNOS que produce NO en el endotelio (46).

Los 2 pacientes que presentaron una disminución de KLF2 nuclear después de OTH, presentaron un IMC alto y menor concentración de NO en el plasma. Esto podría correlacionarse con los niveles elevados de LDL que hay en personas con obesidad y DM2, ya que en investigaciones anteriores se encontró que los niveles

de LDL oxidado y no oxidado afecta la expresión de KLF2 y la actividad del promotor de su gen (47).

KLF2 en el núcleo puede fomentar la angiogénesis en pacientes con pie diabético tratados con OTH. Los resultados mostraron que la translocación de KLF2 al núcleo tiene una correlación positiva con la angiogénesis después de la OTH. Previamente se observó que la sobreexpresión de KLF2 con lentivirus en un modelo de ratón viejo con isquemia en extremidades inferiores, aumenta el número de células pro-angiogénicas circulantes y aumenta los niveles de mRNA de eNOS, esto en consecuencia fomenta la neovascularización al restablecer la perfusión sanguínea de las extremidades inferiores (48).

Reportes anteriores han demostrado que la actividad transcripcional de FoxO1 en heridas de ratones diabéticos (*db/db*), se encuentra muy elevada en comparación con el control sano (*db/db⁺*) (49), y su inhibición en ratones deficientes de FoxO1 (*FoxO1^{+/-}*) favorece y aumenta el proceso de cicatrización en comparación a los ratones Wild-Type (50). Se sabe que en células HUVECs que FoxO1 inhiben la expresión de KLF2 y sus genes blanco como eNOS (37;51). En este estudio se observó un aumento muy significativo en la fosforilación de FoxO1 en ser256, la cual disminuye la actividad de FoxO1 (18), en las biopsias de pie diabético tratadas con OTH. Esto sugiere que la OTH favorece una reducción en la actividad de FoxO1 lo que en instancia conlleva a la cicatrización y evitar la disminución en la actividad de KLF2.

Se ha demostrado un deterioro en la producción y biodisponibilidad de NO por efecto de la hiperglucemia, tanto en modelo de ratones como en pacientes diabéticos (52-54). En este estudio se encontró que la OTH aumenta la producción de NO en plasma de algunos pacientes; lo que ha sido previamente demostrado en ratones diabéticos sometidos a OTH (55). El incremento de NO correlacionó positivamente con formación de nuevos vasos sanguíneos. Se sabe que el NO y la OTH inducen la circulación de células progenitoras de endotelio (CPE) en sangre periférica de ratones con isquemia en extremidades inferiores y ratones diabéticos, lo que fomenta y mejora la angiogénesis (55;56). Por lo tanto, el aumento de NO debido al tratamiento con OTH es fundamental para la angiogénesis, lo que ayuda

a revertir la isquemia y a propiciar la cicatrización de las heridas por aumento de la perfusión sanguínea.

Se observó en este estudio, una tendencia al aumento en los depósitos de colágena (fibrosis) en el tejido. Esto también se observó en un reporte anterior donde las heridas de ratones diabéticos tratados con OTH y en ratones con delección parcial del FoxO1 (*FoxO1^{+/-}*) (50;55). Por lo tanto, al revertir los efectos de FoxO1 e inducir la producción NO vía KLF2 por medio de la OTH se propiciará la cicatrización en pacientes con pie diabético y DM2.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La OTH (20 sesiones de 1 hora a 1.5 ATA) resultó ser una alternativa terapéutica coadyuvante junto con el tratamiento hipoglucemiante para favorecer de manera notoria la cicatrización. La OTH también aumento la expresión *in situ* de la proteína KLF2, y que ello se verá afectado si el paciente tiene sobrepeso. Por lo tanto, favorece la expresión de eNOS, la producción de NO y fomenta la angiogénesis. Además, se observó inactivación de FoxO1 por el aumento en su fosforilación, lo que previene la inactivación de KLF2 y mejora en el proceso de cicatrización. El uso de la OTH en pacientes con pie diabético en este proyecto, parece favorecer en la formación de nuevos vasos, la acumulación de colágena y propicia la cicatrización de úlceras.

Cabe mencionar que el RNA que se obtuvo de las muestras parafinadas a partir de biopsias, no tuvo la pureza necesaria, es por ello que no se pudo obtener amplificación en todas las muestras al realizar la RT-qPCR. Además de que la eficiencia de la extracción de RNA disminuye por la lisis incompleta de tejidos incluidos en parafina. También disminuye la síntesis de cDNA debido a que el formaldehído reacciona de mayormente con el grupo amino de la adenina bloqueando la unión de la cola de poli A con el oligo dT. Por lo que la expresión de KLF2 en respuesta a la OTH, se realizará posteriormente en muestras sin parafina.

La oxigenación adecuada en los pacientes con DM2 no sólo favorece la cicatrización y la angiogénesis, sino que también podría favorecer otros tejidos afectados por esta enfermedad como las células β -pancreáticas. La oxigenación apropiada en estas células es crucial para su funcionamiento, dado que contienen un gran número de mitocondrias que consumen grandes cantidades de oxígeno. Estudiar la función de este órgano también en las condiciones del estudio también podría esclarecer los efectos de esta terapia en las condiciones propias de la DM2.

Estudiar los efectos de la OTH en pacientes con otros padecimientos que causen isquemia podrán seguir esclareciendo sus efectos, buscando nuevos moduladores que se ven alterados con la terapia.

LITERATURA CITADA

- (1) FID. Federación Internacional de Diabetes. 2015.
Ref Type: Internet Communication
- (2) SINAIS. Sistema Nacional de Información en Salud. Secretaría de Salud/Dirección General de Información en Salud. Elaborado a partir de la base de datos de defunciones 1979-2008 INEGI/SS . 2015.
Ref Type: Internet Communication
- (3) ENSANUT. Encuesta Nacional de Salud. 2012.
Ref Type: Internet Communication
- (4) Gil-Velázquez LE, Sil-Acosta MJ, Aguilar-Sánchez L, Echevarría-Zuno S, Michaus-Romero F, Torres-Arreola L. Perspectiva de la diabetes mellitus tipo 2 en el Instituto Mexicano del Seguro Social. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2013;51:58-67.
- (5) Rull JA, Aguilar-Salinas CA, Rojas R, Rios-Torres JM, Gomez-Perez FJ, Olaiz G. Epidemiology of type 2 diabetes in Mexico. *Arch Med Res.* 2005;36:188-96.
- (6) Fundación IMSS. Programa integral del pie diabético. Programa de actividades IMSS. 2011.
- (7) Boulton AJ, Vileikyte L, Ragnarson-Tennvall G, Apelqvist J. The global burden of diabetic foot disease. *Lancet.* 2005;366:1719-24.
- (8) Boulton AJM. The diabetic foot. *Medicine.* 2010;38:644-48.
- (9) OMS. Estadísticas Sanitarias Mundiales. 2014.
Ref Type: Internet Communication
- (10) Boulton AJM, Cavanagh PR, Rayman G. *The Foot in Diabetes.* 4th Edition ed. John Wiley & Sons, Ltd; 2006.
- (11) Fermín R. Martínez de Jesús, Isabel Mendiola Segura. Pie diabético. *Tratado de Cirugía General.* Editorial El Manual Moderno; 2000.
- (12) Londahl M. Hyperbaric oxygen therapy as treatment of diabetic foot ulcers. *Diabetes Metab Res Rev.* 2012;28 Suppl 1:78-84.
- (13) Goldstein LJ. Hyperbaric oxygen for chronic wounds. *Dermatol Ther.* 2013;26:207-14.

- (14) Feldman-Idov Y, Melamed Y, Ore L. Improvement of ischemic non-healing wounds following hyperoxygenation: the experience at Rambam-Elisha Hyperbaric Center in Israel, 1998-2007. *Isr Med Assoc J.* 2011;13:524-29.
- (15) Brem H, Tomic-Canic M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J Clin Invest.* 2007;117:1219-22.
- (16) Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science.* 1997;276:75-81.
- (17) Maiese K, Chong ZZ, Shang YC, Hou J. A "FOXO" in sight: targeting Foxo proteins from conception to cancer. *Med Res Rev.* 2009;29:395-418.
- (18) Huang H, Tindall DJ. Dynamic FoxO transcription factors. *J Cell Sci.* 2007;120:2479-87.
- (19) Maiese K, Chong ZZ, Shang YC, Hou J. A "FOXO" in sight: targeting Foxo proteins from conception to cancer. *Med Res Rev.* 2009;29:395-418.
- (20) Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7:85-96.
- (21) Kitamura T. The role of FOXO1 in beta-cell failure and type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* 2013;9:615-23.
- (22) McConnell BB, Yang VW. Mammalian Kruppel-like factors in health and diseases. *Physiol Rev.* 2010;90:1337-81.
- (23) Swamynathan SK. Kruppel-like factors: three fingers in control. *Hum Genomics.* 2010;4:263-70.
- (24) Suzuki T, Aizawa K, Matsumura T, Nagai R. Vascular implications of the Kruppel-like family of transcription factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1135-41.
- (25) Atkins GB, Jain MK. Role of Kruppel-like transcription factors in endothelial biology. *Circ Res.* 2007;100:1686-95.
- (26) Dekker RJ, van Thienen JV, Rohlena J, de Jager SC, Elderkamp YW, Seppen J et al. Endothelial KLF2 links local arterial shear stress levels to the expression of vascular tone-regulating genes. *Am J Pathol.* 2005;167:609-18.
- (27) Jablecka A, Bogdanski P, Balcer N, Cieslewicz A, Skoluda A, Musialik K. The effect of oral L-arginine supplementation on fasting glucose, HbA1c, nitric oxide and total antioxidant status in diabetic patients with atherosclerotic peripheral arterial disease of lower extremities. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2012;16:342-50.

- (28) Bir SC, Xiong Y, Kevil CG, Luo J. Emerging role of PKA/eNOS pathway in therapeutic angiogenesis for ischaemic tissue diseases. *Cardiovasc Res.* 2012;95:7-18.
- (29) De Haro MJ, Martinez-Aguilar E, Florez A, Varela C, Bleda S, Acin F. Nitric oxide: link between endothelial dysfunction and inflammation in patients with peripheral arterial disease of the lower limbs. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2009;9:107-12.
- (30) Potenza MA, Gagliardi S, Nacci C, Carratu' MR, Montagnani M. Endothelial dysfunction in diabetes: from mechanisms to therapeutic targets. *Curr Med Chem.* 2009;16:94-112.
- (31) Bir SC, Xiong Y, Kevil CG, Luo J. Emerging role of PKA/eNOS pathway in therapeutic angiogenesis for ischaemic tissue diseases. *Cardiovasc Res.* 2012;95:7-18.
- (32) Murohara T, Witzendichler B, Spyridopoulos I, Asahara T, Ding B, Sullivan A et al. Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:1156-61.
- (33) Chen CH, Cartwright J, Jr., Li Z, Lou S, Nguyen HH, Gotto AM, Jr. et al. Inhibitory effects of hypercholesterolemia and ox-LDL on angiogenesis-like endothelial growth in rabbit aortic explants. Essential role of basic fibroblast growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:1303-12.
- (34) Lee HY, Youn SW, Oh BH, Kim HS. Kruppel-like factor 2 suppression by high glucose as a possible mechanism of diabetic vasculopathy. *Korean Circ J.* 2012;42:239-45.
- (35) Botusan IR, Sunkari VG, Savu O, Catrina AI, Grunler J, Lindberg S et al. Stabilization of HIF-1alpha is critical to improve wound healing in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:19426-31.
- (36) Mahabeleshwar GH, Kawanami D, Sharma N, Takami Y, Zhou G, Shi H et al. The myeloid transcription factor KLF2 regulates the host response to polymicrobial infection and endotoxic shock. *Immunity.* 2011;34:715-28.
- (37) Lee HY, Youn SW, Cho HJ, Kwon YW, Lee SW, Kim SJ et al. FOXO1 impairs whereas statin protects endothelial function in diabetes through reciprocal regulation of Kruppel-like factor 2. *Cardiovasc Res.* 2013;97:143-52.
- (38) Hameedaldeen A, Liu J, Batres A, Graves GS, Graves DT. FOXO1, TGF-beta Regulation and Wound Healing. *Int J Mol Sci.* 2014;15:16257-69.
- (39) Potente M, Urbich C, Sasaki K, Hofmann WK, Heeschen C, Aicher A et al. Involvement of Foxo transcription factors in angiogenesis and postnatal neovascularization. *J Clin Invest.* 2005;115:2382-92.

- (40) Londahl M, Katzman P, Nilsson A, Hammarlund C. Hyperbaric oxygen therapy facilitates healing of chronic foot ulcers in patients with diabetes. *Diabetes Care*. 2010;33:998-1003.
- (41) Costacou T, Mayer-Davis EJ. Nutrition and prevention of type 2 diabetes. *Annu Rev Nutr*. 2003;23:147-70.
- (42) Rtveladze K, Marsh T, Barquera S, Sanchez Romero LM, Levy D, Melendez G et al. Obesity prevalence in Mexico: impact on health and economic burden. *Public Health Nutr*. 2014;17:233-39.
- (43) Londahl M. Hyperbaric oxygen therapy as adjunctive treatment of diabetic foot ulcers. *Med Clin North Am*. 2013;97:957-80.
- (44) Eltzschig HK, Carmeliet P. Hypoxia and inflammation. *N Engl J Med*. 2011;364:656-65.
- (45) Zhong F, Chen H, Wei C, Zhang W, Li Z, Jain MK et al. Reduced Kruppel-like factor 2 expression may aggravate the endothelial injury of diabetic nephropathy. *Kidney Int*. 2015;87:382-95.
- (46) Novodvorsky P, Chico TJ. The role of the transcription factor KLF2 in vascular development and disease. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2014;124:155-88.
- (47) Kumar A, Kumar S, Vikram A, Hoffman TA, Naqvi A, Lewarchik CM et al. Histone and DNA methylation-mediated epigenetic downregulation of endothelial Kruppel-like factor 2 by low-density lipoprotein cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33:1936-42.
- (48) Boon RA, Urbich C, Fischer A, Fontijn RD, Seeger FH, Koyanagi M et al. Kruppel-like factor 2 improves neovascularization capacity of aged proangiogenic cells. *Eur Heart J*. 2011;32:371-77.
- (49) Siqueira MF, Li J, Chehab L, Desta T, Chino T, Krothpali N et al. Impaired wound healing in mouse models of diabetes is mediated by TNF-alpha dysregulation and associated with enhanced activation of forkhead box O1 (FOXO1). *Diabetologia*. 2010;53:378-88.
- (50) Mori R, Tanaka K, de KM, Okamoto M, Kashiyaama K, Tanaka K et al. Reduced FOXO1 expression accelerates skin wound healing and attenuates scarring. *Am J Pathol*. 2014;184:2465-79.
- (51) Lee HY, Youn SW, Oh BH, Kim HS. Kruppel-like factor 2 suppression by high glucose as a possible mechanism of diabetic vasculopathy. *Korean Circ J*. 2012;42:239-45.
- (52) de Haro MJ, Martinez-Aguilar E, Florez A, Varela C, Bleda S, Acin F. Nitric oxide: link between endothelial dysfunction and inflammation in patients with

peripheral arterial disease of the lower limbs. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2009;9:107-12.

- (53) Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest.* 2001;108:1341-48.
- (54) Potenza MA, Gagliardi S, Nacci C, Carratu' MR, Montagnani M. Endothelial dysfunction in diabetes: from mechanisms to therapeutic targets. *Curr Med Chem.* 2009;16:94-112.
- (55) Gallagher KA, Liu ZJ, Xiao M, Chen H, Goldstein LJ, Buerk DG et al. Diabetic impairments in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1 alpha. *J Clin Invest.* 2007;117:1249-59.
- (56) Goldstein LJ, Gallagher KA, Bauer SM, Bauer RJ, Baireddy V, Liu ZJ et al. Endothelial progenitor cell release into circulation is triggered by hyperoxia-induced increases in bone marrow nitric oxide. *Stem Cells.* 2006;24:2309-18.