



CIENCIAS BIOMÉDICAS

Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba, 2020

Efectos sistémicos del tratamiento intralesional con factor de crecimiento epidérmico (Heberprot-P) en pacientes con úlceras de pie diabético

Ariana García Ojalvo ^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-9519-0139>
Jorge Berlanga Acosta ^{1,2} <https://orcid.org/0000-0001-9797-1986>
Yssel Mendoza Marí ¹ <https://orcid.org/0000-0002-2788-0701>
Maday Fernández Mayola ¹ <https://orcid.org/0000-0002-0818-1972>
Mónica Béquet Romero ¹ <https://orcid.org/0000-0003-0351-857X>
Calixto Valdés Pérez ² <https://orcid.org/0000-0001-6227-3002>
William Savigne Gutiérrez ³ <https://orcid.org/0000-0001-6516-2199>
Alain Figueroa Martínez ³ <https://orcid.org/0000-0002-7894-9334>
Ileydis Iglesias Marichal ⁴ <https://orcid.org/0000-0001-6354-1347>
Eduardo Álvarez Seijas ⁴ <https://orcid.org/0000-0003-2744-9863>
Amirelia Fabelo Martínez ³ <https://orcid.org/0000-0001-5832-8808>
Gerardo Guillén Nieto ¹ <https://orcid.org/0000-0003-3098-0970>

¹ Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. La Habana, Cuba

² Titular de la Academia de Ciencias de Cuba. La Habana, Cuba

³ Instituto Nacional de Angiología y Cirugía Vasculár. La Habana, Cuba

⁴ Centro de Atención al Diabético. Instituto Nacional de Endocrinología. La Habana, Cuba

*Autor para la correspondencia: ariana.garcia@cigb.edu.cu

RESUMEN

Palabras clave

diabetes; úlcera de pie diabético; factor de crecimiento epidérmico; estrés oxidativo; inflamación

Introducción. La infiltración intralesional con factor de crecimiento epidérmico (EGF) ha emergido como alternativa terapéutica para la cicatrización de las úlceras de pie diabético (UPD). Los objetivos de esta investigación fueron: determinar el perfil molecular de los pacientes con UPD y caracterizar los efectos sistémicos del tratamiento intralesional con EGF en tales pacientes atendiendo a marcadores de balance redox, componentes de la vía de los productos avanzados de glicación (AGE), factores relacionados con la estabilidad de la matriz extracelular (MEC) y marcadores pro-inflamatorios. **Métodos.** Se caracterizaron 13 pacientes con UPD en comparación con diabéticos sin úlceras (compensados y no compensados) e individuos no diabéticos, atendiendo a marcadores de balance redox, componentes de la vía de los AGE y elementos relacionados con la estabilidad de la MEC. La respuesta sistémica de los pacientes con UPD al tratamiento intralesional con EGF se evaluó atendiendo a los mismos parámetros, además de otros marcadores pro-inflamatorios. **Resultados.** Los pacientes con UPD exhibieron un perfil bioquímico muy alterado, con elevado estrés oxidativo, bajas reservas antioxidantes, aumento de los productos de glicoxidación y de las



metaloproteasas de la matriz (MMP), con respecto a los diabéticos sin úlceras y a los no diabéticos. La administración intralesional de EGF estuvo asociada a una recuperación significativa de los parámetros estudiados y a la atenuación sistémica de varios marcadores pro-inflamatorios. Conclusiones: Los resultados indican que la infiltración intralesional con EGF se traduce en efectos sistémicos antioxidantes, anti-inflamatorios, anti-degradativos y anti-AGE, que contribuyen a restaurar la homeostasia del paciente diabético.

Systemic effects of the intralesional treatment with epidermal growth factor (Heberprot-P) in patients with diabetic foot ulcers

ABSTRACT

Introduction. Intralesional infiltration of epidermal growth factor (EGF) has emerged as a therapeutic alternative for diabetic foot ulcer (DFU) healing. The objectives of this research were: to determine the molecular profile of patients with DFU and to characterize the systemic effects of EGF intralesional treatment in such patients, taking into account redox balance markers, components of the advanced glycation end-product (AGE) pathway, factors related to the extracellular matrix (ECM) stability and pro-inflammatory markers. **Methods.** Thirteen patients with DFU were characterized in comparison with diabetic patients without ulcers (compensated and non-compensated) and non-diabetic subjects, attending to redox balance markers, components of the AGE pathway, and elements related to the stability of the ECM. The systemic response of patients with DFU to the intralesional treatment with EGF was evaluated according to the same parameters, in addition to other pro-inflammatory markers. **Results.** Patients with DFU exhibited the most disheveled biochemical profile, with elevated oxidative stress, low antioxidant reserves, increased glycoxidation products and matrix metalloproteases (MMP), with respect to non-ulcerated diabetic patients and to non-diabetic subjects. The intralesional administration of EGF was associated with a significant recovery of the parameters studied and with the systemic attenuation of several pro-inflammatory markers. **Conclusions:** These results indicate that intralesional infiltration of EGF translates into systemic antioxidant, anti-inflammatory, anti-degradative and anti-AGE effects, which contribute to restoring homeostasis in the diabetic patient.

Keywords

diabetes; diabetic foot ulcer; epidermal growth factor; oxidative stress; inflammation

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) tipo II se ha expandido progresivamente hasta alcanzar la magnitud de pandemia, y es responsable de 90 % a 95 % de toda la población diabética. ⁽¹⁾ Es un grupo heterogéneo y complejo de enfermedades que involucra múltiples factores patogénicos y complicaciones multiorgánicas. La hiperglucemia es su marcador más constante y directo. ⁽²⁾ La úlcera de pie diabético (UPD) es una de las complicaciones más temidas ya que conduce a la amputación de extremidades inferiores, con la consecuente discapacidad, exclusión social y mortalidad temprana. La población diabética contribuye con el 80 % de todas las amputaciones no traumáticas de miembros inferiores a nivel mundial. ⁽³⁾

En la patogénesis de la diabetes ocurre una interacción multifacética entre la UPD y su hospedero. ⁽⁴⁾ Las heridas dia-

béticas exhiben una compleja red de citoquinas inflamatorias, especies reactivas del oxígeno (ROS) y el nitrógeno (RNS), productos avanzados de glicación (AGE), proteasas de la matriz extracelular (MEC), y una biopelícula polimicrobiana que, en conjunto, contribuyen a la senescencia de las células de la herida, la cronificación de la lesión y el desbalance en la homeostasia del paciente. ⁽⁵⁾ Este daño funcional parece relacionarse con una desregulación en la disponibilidad y actividad de los factores de crecimiento. ⁽⁶⁾ El sistema formado por el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y su receptor (EGFR) se deteriora como consecuencia de la diabetes, ⁽⁷⁾ lo que comprende la reducción del EGF circulante, salival y tisular; y el descenso de la actividad tirosina quinasa del EGFR. ⁽⁸⁾

El EGF es el factor de crecimiento más ampliamente estudiado en relación con la cicatrización. La biodisponibilidad

local prolongada y la estimulación oportuna de los receptores son requisitos para un impacto significativo del EGF en el cierre de la herida.⁽⁹⁾ Como alternativa para evadir el ambiente hostil de la UPD y para asegurar una adecuada disponibilidad del EGF a su receptor en células respondedoras, nuestro grupo ha realizado infiltraciones intralesionales de EGF durante más de una década.⁽¹⁰⁾ En estos estudios, se ha mostrado la capacidad intrínseca del EGF para desencadenar las acciones biológicas requeridas para la cicatrización de UPD.⁽¹¹⁾ Amplios estudios de farmacovigilancia confirman la eficacia clínica del procedimiento de infiltración en términos de seguridad y de respuesta de los pacientes, con reducciones del riesgo de amputación absoluto y relativo de 16 % y 71 %, respectivamente; y solo un 5 % de re-ulceración durante un período de seguimiento de 12 meses.^(12,13)

En esta investigación, nos propusimos como objetivos determinar el perfil molecular de los pacientes con UPD y caracterizar los efectos sistémicos del tratamiento intralesional con EGF en tales pacientes atendiendo a marcadores de balance redox, componentes de la vía de los AGE, factores relacionados con la estabilidad de la MEC y marcadores pro-inflamatorios. El presente trabajo recoge 2 estudios independientes y extemporáneos.^(14,15) Los resultados demuestran que la terapia intralesional con EGF se asocia a la recuperación del equilibrio redox sistémico, la atenuación de marcadores pro-inflamatorios, el control de la vía de los AGE, y la restauración del equilibrio entre las fuerzas pro-degradativas y pro-sintéticas de la MEC.

MÉTODOS

Consideraciones éticas

Los protocolos de los estudios están en concordancia con las guías éticas recogidas en la Declaración de Helsinki (1975). Además, estos protocolos fueron revisados y aprobados por los comités de ética del Instituto Nacional de Angiología y Cirugía Vasculosa (INACV) y del Centro de Atención al Diabético (CAD), ambos en La Habana, Cuba. Todos los pacientes y los voluntarios no diabéticos firmaron un documento de consentimiento informado antes de ser reclutados para el estudio.

Poblaciones en estudio

Se incluyeron pacientes con UPD neuropáticas moderadas a severas según la escala de Wagner (16) (n=13 en el primer estudio y n=11 en el segundo). Todos los pacientes forman parte del Programa nacional para la atención integral al paciente diabético, que incluye la infiltración intralesional de EGF humano recombinante (Heberprot-P).

Poblaciones control

En el primer estudio, como referencia respecto al grupo con UPD, se incluyeron grupos de pacientes diabéticos metabólicamente compensados (n=12) y no compensados (n=12). Estos pacientes se reclutaron en el CAD. El criterio de compensación se basó en la hemoglobina glicada (HbA1c) ≤ 7 %.⁽¹⁷⁾ Adicionalmente, se reclutaron 13 voluntarios no diabéticos, aparentemente sanos, de edades similares a las de los pacientes, que constituyeron el grupo control para todos los pacientes diabéticos.

EGF humano recombinante

El EGF humano recombinante (Heberprot-P [HeberBiotec S.A., Cuba]), se obtuvo en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (La Habana, Cuba).⁽¹⁸⁾ Los pacientes recibieron 75 μ g de EGF mediante infiltración intralesional, 3 veces por semana, en días alternos. El medicamento y el procedimiento para su administración se han descrito en detalle previamente.^(19,20)

Colecta de muestras

Se colectaron 10 mL de sangre de cada individuo, en ayunas. Para los pacientes con UPD, la colecta en "tiempo cero" (T0) se corresponde con la muestra obtenida antes de la primera infiltración con EGF. La muestra "tiempo uno" (T1) se obtuvo de 3 a 4 semanas después, cuando se habían completado de 9 a 12 sesiones de infiltración.

Determinaciones bioquímicas

Todos los parámetros bioquímicos se determinaron por métodos espectrofotométricos utilizando juegos de reactivos comerciales de las firmas Immundiagnostik (Alemania), Oxix International Inc. (EE.UU.), Abcam (Gran Bretaña), Innovative Research (EE.UU.), Cusabio (China), Donglin (China), BlueGene (China), Alpco (EE.UU.). Los marcadores de estrés oxidativo incluyeron capacidad oxidante total, productos avanzados de oxidación de proteínas (PAOP), organoperóxidos totales (OPT), malondialdehído (MDA), y relación nitrito/nitrato. Los marcadores de reserva antioxidante incluyeron: capacidad antioxidante total; estado de los grupos sulfhidrilo (SH), y superóxido dismutasa (SOD). Se evaluaron los niveles circulantes de AGE, su receptor (RAGE), pentosidina (PTD) y HbA1c. También se cuantificaron la metaloproteasa de la matriz (MMP)-9 y el inhibidor tisular de MMP (TIMP)-1. Los reactantes de fase aguda fueron eritrosedimentación y proteína C reactiva (CRP); mientras que los marcadores pro-inflamatorios incluyeron interleuquina (IL)-1 β , IL-6, y molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1). En cada caso, se siguieron las instrucciones del fabricante.

Perfil de citoquinas

En el segundo estudio, se determinaron 17 citoquinas mediante ensayos en perlas magnéticas (HCD8MAG15 K17PMX human [Millipore Sigma Corp., EE.UU.]). Se analizaron muestras de los pacientes en T0 y T1, según las instrucciones del fabricante. La cuantificación se realizó en un equipo Luminex MAGPIX utilizando el programa xPONENT 4,2 y se analizó con el programa Milliplex Analyst (v5.1, Millipore) con una regresión lineal de 5 parámetros ($r^2 > 0,99$ en todos los casos).

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism 6,01. La distribución normal y la homogeneidad de varianza se analizaron mediante las pruebas de D'Agostino-Pearson y Brown-Forsythe, respectivamente. En caso de que los datos cumplieran con la distribución normal y la homogeneidad de varianza, las comparaciones entre grupos se realizaron mediante el ANOVA de una vía seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Holm-Sidak. En caso contrario, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis seguida por la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. Las comparaciones entre T0 y T1 se realizaron mediante análisis de medidas repetidas. Los datos con distribución normal se analizaron mediante la prueba t de Student para datos pareados. De lo contrario, se realizó la prueba de Wilcoxon. Los valores de $p < 0,05$ se interpretaron como indicativos de diferencias estadísticamente significativas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Esta investigación abarca 2 estudios independientes y extemporáneos. En el primer estudio se caracterizó un grupo de pacientes con UPD en comparación con diabéticos sin úlceras, compensados y no compensados, e individuos no diabéticos; atendiendo a marcadores de balance redox, componentes de la vía de los AGE y elementos relacionados con la estabilidad de la MEC. A continuación, se evaluó la respuesta sistémica de los pacientes con UPD al tratamiento intralesional con EGF atendiendo a los mismos parámetros. El segundo estudio se enfocó hacia los reactantes de fase aguda y marcadores pro-inflamatorios. Asimismo, se validaron algunos de los resultados obtenidos en el estudio anterior.

Características demográficas

En el primer estudio se evaluaron 4 grupos experimentales: pacientes con UPD ($n = 13$), diabéticos sin úlceras compensados ($n = 12$) y no compensados ($n = 12$), e individuos no diabéticos ($n=13$). No se encontraron diferencias significativas entre estos grupos en relación con la edad y el tiempo de evolución de la diabetes. En el segundo estudio, se caracteri-

zaron 11 pacientes con UPD. El sexo masculino predominó en los grupos con UPD y en los no diabéticos, mientras que entre los diabéticos sin úlceras predominó el sexo femenino. Los pacientes tenían edades entre 30 años y 85 años. El tiempo de evolución de la diabetes estuvo en el rango de 2 años a 40 años. En los grupos con UPD, el tiempo de evolución de las heridas estuvo entre 7 d y 270 d.

Caracterización de los pacientes con UPD

En la tabla 1 se muestran los resultados de la caracterización molecular de los grupos estudiados. Los pacientes con UPD mostraron niveles de capacidad oxidante, PAOP, y MDA significativamente superiores con respecto al resto de los grupos experimentales. Con relación a la concentración de OPT, aunque no se detectaron diferencias estadísticas, los pacientes con UPD exhibieron valores que triplicaron los de los restantes grupos.

Los parámetros de reserva antioxidante mostraron un comportamiento opuesto: los pacientes ulcerados exhibieron niveles significativamente inferiores de capacidad antioxidante y grupos SH con respecto a los otros grupos (tabla 1). La actividad SOD en los pacientes con UPD fue significativamente menor que en los no diabéticos, pero no se diferenció de los diabéticos sin úlceras.

En correspondencia con hallazgos previos,^(21, 22) este estudio muestra que los pacientes ulcerados exhiben una exacerbación del estrés oxidativo con un deterioro concomitante de la reserva antioxidante, en comparación con el resto de los grupos estudiados. La interrogante acerca de si el estrés oxidativo es una causa de la ulceración o una consecuencia del proceso glucotóxico, permanece incógnita.⁽²³⁾ Independientemente de esta controversia, varios estudios indican que el estrés oxidativo está asociado a anomalías en la migración, secreción, proliferación y polarización de los fibroblastos y queratinocitos,^(24, 25) y que la manipulación farmacológica de este sector bioquímico mejora la cicatrización de las heridas.⁽²⁶⁾

Los AGE constituyen un grupo heterogéneo de moléculas que, al interactuar con el RAGE, conducen a la generación de ROS, la sobreexpresión de citoquinas pro-inflamatorias y moléculas de adhesión, todos ellos involucrados en la fisiopatología de las complicaciones de la diabetes.⁽²⁷⁾

No se detectaron diferencias estadísticas entre los grupos experimentales para AGE y RAGE. Sin embargo, los niveles de pentosidina fueron significativamente superiores para los pacientes con UPD en comparación con los diabéticos sin úlceras (tabla 1). La pentosidina es un producto de glicoxidación, o sea, glicación y oxidación,⁽²⁸⁾ lo que se corresponde con el predominio del estrés oxidativo y las bajas reservas antioxi-

dantes observadas en el grupo con UPD. En estudios previos se describe que los pacientes diabéticos con complicaciones crónicas presentan mayores concentraciones de pentosidina que los diabéticos sin complicaciones. ⁽²⁹⁾ Por tanto, el nivel de pentosidina se considera como un predictor confiable para las complicaciones de la DM. ⁽³⁰⁾

La HbA1c es otro tipo de AGE. En este caso, los pacientes con UPD y diabéticos no compensados presentaron niveles significativamente superiores a los pacientes compensados e individuos sanos (tabla 1). Al respecto se plantea que un alto nivel de HbA1c refleja una mayor generación de AGE. ⁽³¹⁾

Las MMPs y los TIMPs son 2 grupos de moléculas agonistas involucradas en la fisiología de la cicatrización, y que requieren un fino equilibrio temporal y espacial. ^(32, 33) Los niveles de MMP-9 fueron significativamente superiores en los pacientes ulcerados con respecto al resto de los grupos experimentales (tabla 1), lo que indica que la UPD influye sobre el aumento de los niveles sistémicos de MMP-9. Resulta in-

teresante que los valores de TIMP-1 exhibieron un comportamiento similar. En pacientes con UPD, las concentraciones de TIMP-1 pudieron haberse incrementado como respuesta fisiológica compensatoria a los elevados niveles circulantes de MMP-9.

La no detección de diferencias significativas entre los grupos de diabéticos compensados y no compensados para la mayoría de los parámetros estudiados confirma la existencia de un nivel de daño que es independiente del control glucémico. Esto probablemente representa el llamado "círculo vicioso de la memoria metabólica". ⁽³⁴⁾

Respuesta de los pacientes con UPD al tratamiento intralesional con EGF

El efecto de la administración intralesional de EGF en los pacientes con UPD se analizó después de 9-12 infiltraciones. Aunque el objetivo principal de este estudio no fue evaluar la eficacia clínica del EGF, es apropiado mencionar que el tratamiento desencadenó la acumulación de tejido de granulación,

Tabla 1. Caracterización molecular de los pacientes

Marcador	UPD	DM Comp	DM No comp	No DM
Estrés oxidativo				
Capacidad oxidante (μM)	1471 ± 277 ^a	692 ± 349 ^b	824 ± 374 ^b	421 ± 263 ^b
PAOP (μM)	40,5 ± 7,7 ^a	16,7 ± 4,1 ^b	16,9 ± 3,6 ^b	18,6 ± 3,5 ^b
MDA (μM)	6,44 ± 3,55 ^a	5,05 ± 1,69 ^{a,b}	3,87 ± 1,32 ^{b,c}	2,69 ± 0,70 ^c
OPT (μM)	26,61 ± 26,50	8,27 ± 6,40	8,46 ± 7,61	9,05 ± 7,67
Reserva antioxidante				
Capacidad antioxidante (μM)	233 ± 40 ^b	318 ± 41 ^a	313 ± 40 ^a	324 ± 36 ^a
Grupos SH (μg/mL)	91,4 ± 25,4 ^b	175,3 ± 37,8 ^a	166,2 ± 58,9 ^a	179,6 ± 32,2 ^a
SOD (% inhibición)	43,2 ± 13,2 ^b	54,5 ± 8,6 ^{a,b}	56,5 ± 8,0 ^{a,b}	61,5 ± 9,4 ^a
Vía de los AGE				
AGE (μg/mL)	8,67 ± 4,02	18,08 ± 12,54	24,93 ± 19,12	10,95 ± 7,63
RAGE (pg/mL)	388 ± 168	575 ± 456	438 ± 185	553 ± 106
PTD (ng/mL)	2,873 ± 3,424 ^a	0,372 ± 0,074 ^b	0,559 ± 0,482 ^b	0,465 ± 0,118 ^{a,b}
HbA1c (%)	10,37 ± 0,98 ^a	5,96 ± 1,04 ^b	8,15 ± 0,92 ^a	5,67 ± 0,59 ^b
Elementos de la matriz extracelular				
MMP-9 (ng/mL)	1531 ± 933 ^a	563 ± 415 ^b	589 ± 390 ^b	554 ± 484 ^b
TIMP-1 (ng/mL)	1163 ± 328 ^a	642 ± 102 ^b	609 ± 99 ^b	531 ± 88 ^b

UPD: úlcera de pie diabético; DM Comp: diabéticos no ulcerados compensados; DM No comp: diabéticos no ulcerados no compensados; No DM: no diabéticos; PAOP: productos avanzados de oxidación de proteínas; MDA: malonildialdehído; OPT: organoperóxidos totales; SH: sulfhidrilo; SOD: superóxido dismutasa; AGE: productos avanzados de glicación; PTD: pentosidina; HbA1c: hemoglobina glicada; RAGE: receptor de AGE; MMP-9: metaloproteasa de la matriz 9; TIMP-1: inhibidor tisular de MMP 1. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas.

la contracción de los bordes de la herida y la re-epitelización en todos los pacientes.

En el primer estudio, el tratamiento con EGF estuvo asociado a reducciones significativas de los 4 parámetros de estrés oxidativo (figura 1 A-D). En correspondencia, la capacidad antioxidante y los grupos SH exhibieron incrementos significativos después de la terapia (figura 1 E, F). Para cada uno de estos marcadores, al menos el 50 % de los pacientes mostró una respuesta favorable al balance redox. Por tanto, en adición a los beneficios referidos a la estimulación de la granulación y el cierre de la herida,⁽³⁵⁻³⁷⁾ el EGF contribuye a restaurar los niveles circulantes de varios marcadores del estado redox hasta valores cercanos a los de los diabéticos sin úlceras y los individuos no diabéticos.

A pesar del reducido número de pacientes estudiados, este trabajo tiene el mérito de mostrar por primera vez, que los efectos cicatrizantes de la terapia intralesional con EGF son, al menos parcialmente, mediados por un mecanismo

compensatorio antioxidante. En consecuencia, consideramos que el EGF infiltrado es capaz de contrarrestar el desbalance redox, para atenuar la senescencia prematura, la apoptosis y el arresto proliferativo de los fibroblastos locales representativos de las UPD⁽³⁸⁾ y de otras heridas crónicas.^(10,39)

En el segundo estudio, se confirmó el resultado de capacidad oxidante, con una disminución significativa en T1. Además, el tratamiento redujo significativamente la relación nitrito/nitrato (figura 1G), principales productos de oxidación derivados del NO.⁽⁴⁰⁾ Varias evidencias indican que el estrés nitrosilativo está estrechamente relacionado con numerosas complicaciones de la diabetes, disfunción de órganos e incluso, con el desenlace de los pacientes.^(41,42) La cicatrización de heridas cutáneas también está dramáticamente influenciada por el metabolismo del NO,⁽⁴³⁾ donde se requiere de un exquisito ajuste tanto a nivel de organismo como en el ambiente de la herida para una adecuada cicatrización.⁽⁴⁴⁾

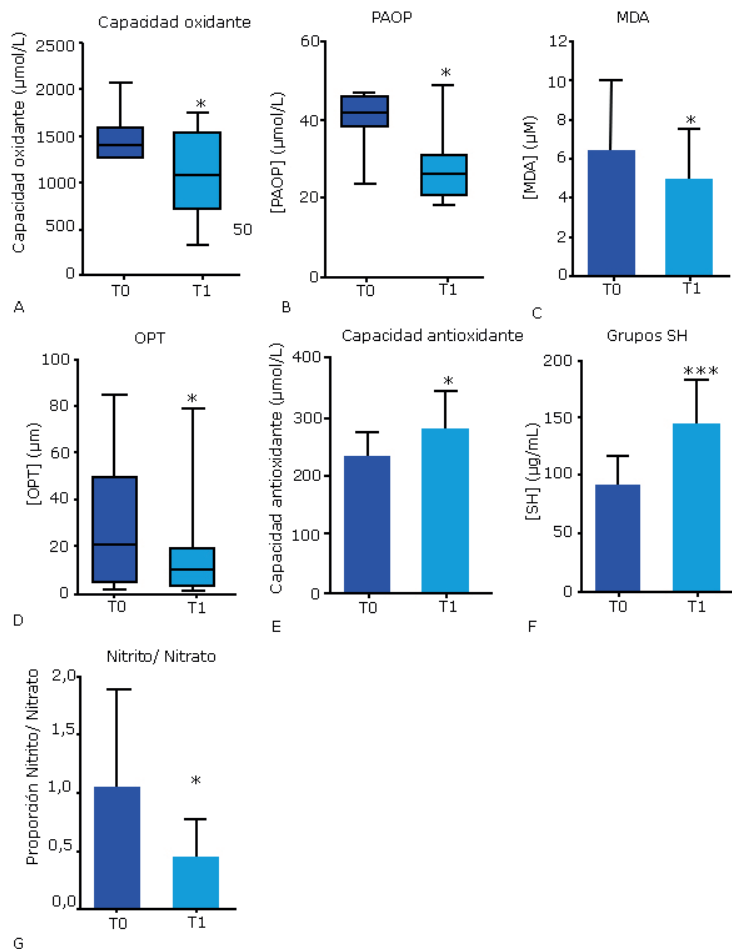


Fig. 1. Niveles circulantes de marcadores de estrés oxidativo y reserva antioxidante en pacientes con UPD antes (T0) y después (T1) del tratamiento intralesional con EGF. A, capacidad oxidante. B, productos avanzados de oxidación de proteínas (PAOP). C, malonildialdehído (MDA). D, organoperóxidos totales (OPT). E, capacidad antioxidante. F, grupos sulfhidriilo (SH). G, relación nitrito/nitrato. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

El EGF posee propiedades citoprotectoras mediadas por la estimulación agonística del eje fosfatidil-inositol 3-quinasa (PI3K)-Akt por la fosforilación del EGFR. ⁽⁴⁵⁾ Variados modelos experimentales han documentado la habilidad del EGF para estimular la supervivencia de células, tejidos y animales después de recibir insultos letales, incluyendo oxidantes citotóxicos ^(46, 47) y episodios de isquemia/ reperfusión. ⁽⁴⁸⁾ Estos estudios sugieren que el reaprovisionamiento de los tejidos por el EGF está mediado por un efecto antioxidante. Además, esta es la primera demostración en un escenario clínico.

Con respecto a la vía de los AGE, en el primer estudio, los niveles circulantes de AGE no presentaron diferencias estadísticas entre T0 y T1 (figura 2A). No obstante, la media disminuyó en un 22 % después de la terapia, lo que pudiera ser biológicamente relevante. Los niveles de pentosidina disminuyeron significativamente después del tratamiento, con una reducción de la mediana del 42 % (figura. 2B). Este efecto pudo haber contribuido a atenuar los daños asociados a la vía de los AGE, que incluyen la inflamación de la herida, el arresto y la apoptosis de los fibroblastos. ⁽⁴⁹⁾ Este resultado se confirmó en el segundo estudio.

Las concentraciones de RAGE no se modificaron significativamente (dato no mostrado). Sin embargo, en el segundo estudio, RAGE exhibió un aumento significativo, con un incremento de la mediana del 16 % (figura 2C). RAGE soluble actúa como un receptor "señuelo" que inhibe la señalización a través del eje AGE/RAGE, de modo que se previene la amplificación de episodios citotóxicos.

Los niveles de MMP-9 no variaron significativamente entre T0 y T1 (figura 3A). Sin embargo, la concentración media en T1 fue un 37 % más baja que en T0. Los valores de TIMP-1 por su parte, disminuyeron significativamente después de la terapia (figura 3B), con una reducción de la media del 31 %.

Los resultados sugieren la recuperación del equilibrio entre las moléculas degradativas y sus inhibidores, que podría conllevar a la restauración del balance entre las fuerzas pro-degradativas y pro-sintéticas de la MEC.

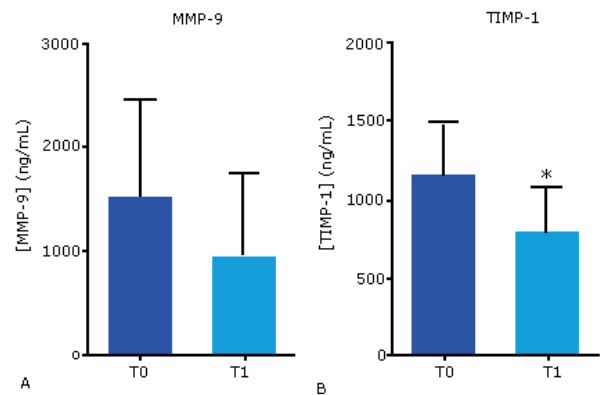


Fig. 3. Niveles circulantes de proteínas relacionadas con la estabilidad de la MEC en pacientes con UPD antes (T0) y después (T1) del tratamiento intralesional con EGF. A, metaloproteasa de la matriz 9 (MMP-9). B, inhibidor tisular de MMP tipo 1 (TIMP-1). *p < 0,05.

En el segundo estudio, se evaluaron los niveles circulantes de un grupo de marcadores que incluyen reactantes de fase aguda y citoquinas pro-inflamatorias. El tratamiento con EGF se asoció a una reducción altamente significativa de la eritrosedimentación (figura 4A), verificada en todos los pacientes. La CRP no evidenció diferencias estadísticas entre T0 y T1 (figura 4B). Sin embargo, la mediana en T1 fue un 45 % más baja que en T0. La interpretación de estos hallazgos clínicos incita a especular que la exposición sistémica al EGF contribuye a atenuar el fenotipo hepato-reactivo. (50) El efecto mo-

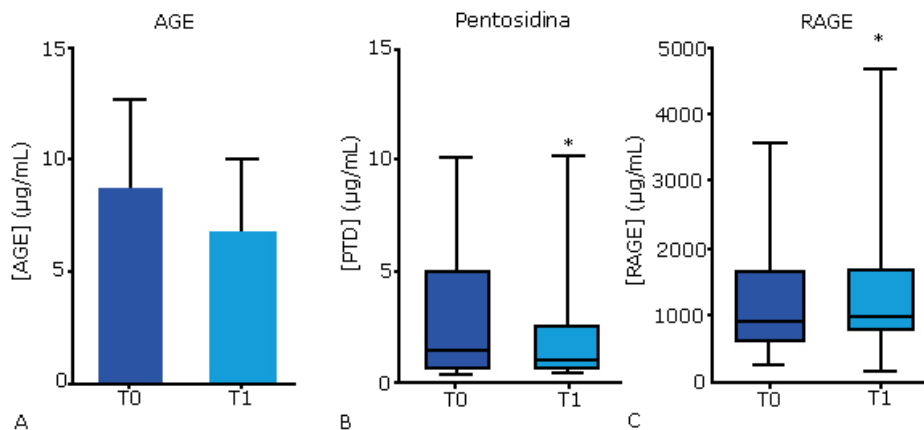


Fig. 2. Niveles circulantes de moléculas de la vía de los AGE en pacientes con UPD antes (T0) y después (T1) del tratamiento intralesional con EGF. A, productos avanzados de glicación (AGE). B, pentosidina. C, receptor de AGE (RAGE). *p < 0,05.

dulador del EGF sobre las proteínas de fase aguda derivadas del hígado está documentado en estudios previos. (51) Otros estudios in vitro ilustran el efecto del EGF sobre la modulación de las proteínas de fase aguda en células hepáticas. (52, 53)

Los niveles de IL-1 β e ICAM-1 no se modificaron significativamente después del tratamiento (datos no mostrados). En contraste, los niveles de IL-6 disminuyeron significativamente en T1, con una reducción de la mediana del 66 % (figura 4C). Adicionalmente, se realizó una evaluación más amplia de marcadores pro-inflamatorios mediante un ensayo con perlas magnéticas, donde se validó la reducción de los niveles circulantes de IL-6, acompañada por la disminución significativa de la proteína inflamatoria de macrófagos 1-alfa (MIP1-a) y FAS soluble (sFAS) (figura 4D).

La IL-6 juega un papel patogénico en la aparición, progresión y complicaciones de la DM tipo II (54) sFAS se ha relacionado con la resistencia a la insulina, la aparición de la DM tipo II, así como la subsiguiente inflamación endovascular, la apoptosis asociada a la diabetes, y las complicaciones multiorgánicas. (55) MIP1-a es una de las citoquinas inflamatorias inducidas por altos niveles de glucosa, (56) y está patogénicamente involucrada en la prediabetes y en la inflamación diabé-

tica crónica. (57) En conjunto, nuestros hallazgos sugieren que el descenso en los niveles circulantes de estos 3 marcadores pudiera contribuir a restaurar la homeostasia metabólica y los programas pro-anabólicos de los tejidos en el curso del proceso de cicatrización en pacientes diabéticos. (58)

La interpretación de estos hallazgos sugiere que detrás de la cicatrización exitosa que se logra mediante la infiltración intralesional de EGF, existe un amplio perfil de efectos farmacodinámicos, determinados por la restauración sistémica de múltiples eventos moleculares que convergen para restablecer una trayectoria fisiológica de cicatrización. El EGF localmente infiltrado, además de contribuir a la recuperación de mediadores solubles descompensados, está dotado con la capacidad de contrarrestar la senescencia prematura asociada a la diabetes. (59)

Conclusiones

Esta investigación aporta las primeras evidencias que confirman el concepto de que la UPD funciona como una entidad superimpuesta a un hospedero metabólicamente descompensado, sobre el que libera reactantes pro-inflamatorios, pro-oxidantes, glicoxidativos y pro-apoptóticos, que

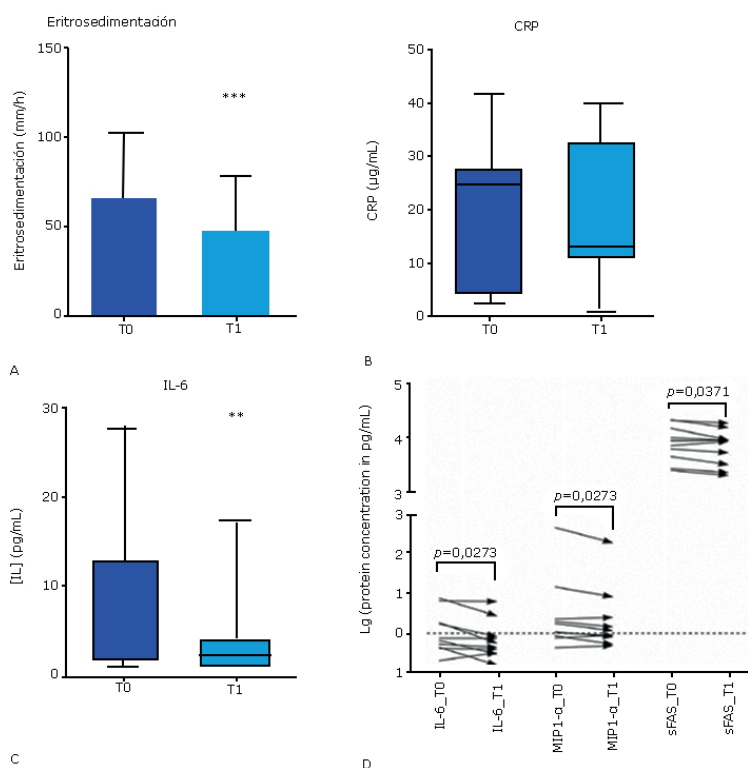


Fig. 4. Niveles circulantes de reactantes de fase aguda y marcadores pro-inflamatorios en pacientes con UPD antes (T0) y después (T1) del tratamiento intralesional con EGF. A, eritrosedimentación. B, proteína C reactiva (CRP). C, interleuquina-6 (IL-6). D, citoquinas pro-inflamatorias que mostraron variaciones significativas según la evaluación basada en Milliplex: IL-6, proteína inflamatoria de macrófagos 1-alfa (MIP1-a) y FAS soluble (sFAS). **p < 0,01; ***p < 0,001.

amplifican la descompensación metabólica y crean un circuito de influencia mutua que entorpece la cicatrización. Asimismo, se documentan por primera vez en un escenario clínico, los efectos sistémicos del tratamiento intralesional con EGF: antioxidante, anti-AGE, anti-degradativo, anti-inflamatorio y anti-apoptótico, con traducción en la corrección del medio interno del organismo diabético.

En conjunto, los resultados indican que esta terapia contribuye a restaurar la homeostasia sistémica del paciente diabético, de modo que el EGF humano recombinante (Heberprot-P) podría ampliar su espectro farmacológico hacia la prevención y control de otras complicaciones de las diabetes consecuentes de los fenómenos pro-inflamatorios y glicoxidativos.

Agradecimientos

Los autores agradecen a David G. Armstrong (*Southern Arizona Limb Salvage Alliance*, EE.UU.) por su revisión crítica del trabajo. Igualmente reconocen la asistencia técnica y el apoyo logístico brindado por especialistas del CIGB: Alicia Molina Kautzman, Angélica Estrada Pacheco, Arlet Hechavarría Balleu, Osvaldo Reyes Acosta; y del INACV: Alejandro Hernández Seara, Mireya Alonso, Manuel Álvarez Prats, Bertha Herrería y Tania Clavijo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kolb H, Martin S. Environmental/lifestyle factors in the pathogenesis and prevention of type 2 diabetes. *BMC Med.* 2017;15(1):131.
2. Fang P, Shi M, Zhu Y, Bo P, Zhang Z. Type 2 diabetes mellitus as a disorder of galanin resistance. *Exp Gerontol.* 2016;73:72-7.
3. Piaggese A, Apelqvist J. *The Diabetic Foot Syndrome.* Piaggese A, Apelqvist J, editors. Pisa, Lund: Karger; 2018.
4. Han G, Ceilley R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Adv Ther.* 2017;34(3):599-610.
5. Yazdanpanah L, Nasiri M, Adarvishi S. Literature review on the management of diabetic foot ulcer. *World J Diabetes.* 2015;6(1):37-53.
6. Thomson SE, McLennan SV, Twigg SM. Growth factors in diabetic complications. *Expert Rev Clin Immunol.* 2006;2(3):403-18.
7. Kasayama S, Ohba Y, Oka T. Epidermal growth factor deficiency associated with diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(19):7644-8.
8. Portero Otin M, Pamplona R, Bellmunt MJ, Ruiz MC, Prat J, Salvayre R, *et al.* Advanced glycation end product precursors impair epidermal growth factor receptor signaling. *Diabetes.* 2002;51(5):1535-42.
9. Buckley A, Davidson JM, Kamerath CD, Wolt TB, Woodward SC. Sustained release of epidermal growth factor accelerates wound repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(21):7340-4.
10. Berlanga-Acosta J. Diabetic lower extremity wounds: the rationale for growth factors-based infiltration treatment. *Int Wound J.* 2011;8(6):612-20.
11. Berlanga Acosta J, Fernández Montequin J, Valdés Pérez C, Savigne Gutiérrez W, Mendoza Mari Y, García Ojalvo A, *et al.* Dia-

betic Foot Ulcers and Epidermal Growth Factor: Revisiting the Local Delivery Route for a Successful Outcome. *Biomed Res Int.* 2017;2017:2923759.

12. López Saura PA, Yera Alos IB, Valenzuela Silva C, González Díaz O, Del Río Martín A, Berlanga Acosta J, *et al.* Medical Practice Confirms Clinical Trial Results of the Use of Intralesional Human Recombinant Epidermal Growth Factor in Advanced Diabetic Foot Ulcers. *Adv Pharmacoeconom Drug Safety.* 2013;2(2):128.
13. Yera Alos IB, Alonso Carbonell L, Valenzuela Silva CM, Tuero Iglesias AD, Moreira Martínez M, Marrero Rodríguez I, *et al.* Active post-marketing surveillance of the intralesional administration of human recombinant epidermal growth factor in diabetic foot ulcers. *BMC Pharmacol Toxicol.* 2013;14:44.
14. García Ojalvo A, Berlanga Acosta J, Figueroa Martínez A, Bequet Romero M, Mendoza Mari Y, Fernández Mayola M, *et al.* Systemic translation of locally infiltrated epidermal growth factor in diabetic lower extremity wounds. *Int Wound J.* 2019;16(6):1294-303.
15. Ojalvo AG, Acosta JB, Mari YM, Mayola MF, Pérez CV, Gutiérrez WS, *et al.* Healing enhancement of diabetic wounds by locally infiltrated epidermal growth factor is associated with systemic oxidative stress reduction. *Int Wound J.* 2017;14(1):214-25.
16. Wagner FW, Jr. The dysvascular foot: a system for diagnosis and treatment. *Foot Ankle.* 1981;2(2):64-122.
17. Reynolds TM, Smellie WS, Twomey PJ. Glycated haemoglobin (HbA1c) monitoring. *BMJ.* 2006;333(7568):586-8.
18. Cinza AM, Quintana M, Lombardero J, Poutou R, Pérez E, Pérez LC, *et al.* A batch process for production of human Epidermal Growth Factor in yeast. Product characterization. *Biología Aplicada.* 1991;8(2):166-73.
19. Berlanga J, Fernández JI, López E, López PA, del Río A, Valenzuela C, *et al.* Heberprot-P: a novel product for treating advanced diabetic foot ulcer. *MEDICC Rev.* 2013;15(1):11-5.
20. López Saura PA, Berlanga Acosta J, Fernández Montequin JI, Valenzuela Silva C, González Díaz O, Savigne Gutiérrez W, *et al.* Intralesional Human Recombinant Epidermal Growth Factor for the Treatment of Advanced Diabetic Foot Ulcer: From Proof of Concept to Confirmation of the Efficacy and Safety of the Procedure. In: Dinh T, editor. *Global Perspective on Diabetic Foot Ulcerations.* Rijeka: InTech; 2011. p. 217-38.
21. Bolajoko EB, Mossanda KS, Adeniyi F, Akinosun O, Fasanmade A, Moropane M. Antioxidant and oxidative stress status in type 2 diabetes and diabetic foot ulcer. *S Afr Med J.* 2008;98(8):614-7.
22. Rattan R, Nayak D. High levels of plasma malondialdehyde, protein carbonyl, and fibrinogen have prognostic potential to predict poor outcomes in patients with diabetic foot wounds: a preliminary communication. *Int J Low Extrem Wounds.* 2008;7(4):198-203.
23. Rains JL, Jain SK. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic Biol Med.* 2011;50(5):567-75.
24. Berlanga Acosta J, Schultz GS, López Mola E, Guillen Nieto G, García Siverio M, Herrera Martínez L. Glucose toxic effects on granulation tissue productive cells: the diabetics' impaired healing. *Biomed Res Int.* 2013;2013:256043.
25. Vicens Zygmunt V, Estany S, Colom A, Montes-Worboys A, Machahua C, Sanabria AJ, *et al.* Fibroblast viability and phenotypic changes within glycated stiffened three-dimensional collagen matrices. *Respir Res.* 2015;16:82.
26. Dhall S, Do DC, García M, Kim J, Mirebrahim SH, Lyubovitsky J, *et al.* Generating and reversing chronic wounds in diabetic

- mice by manipulating wound redox parameters. *J Diabetes Res.* 2014;2014:562625.
27. Prasad K, Tiwari S. Therapeutic Interventions for Advanced Glycation-End Products and its Receptor-Mediated Cardiovascular Disease. *Curr Pharm Des.* 2017;23(6):937-43.
 28. Miyata T, Maeda K, Kurokawa K, van Ypersele de SC. Oxidation conspires with glycation to generate noxious advanced glycation end products in renal failure. *Nephrol Dial Transplant.* 1997;12(2):255-8.
 29. Morales S, Garcia Salcedo JA, Munoz Torres M. [Pentosidine: a new biomarker in diabetes mellitus complications]. *Med Clin (Barc).* 2011;136(7):298-302.
 30. Kerkeni M, Saidi A, Bouzidi H, Letaief A, Ben YS, Hammami M. Pentosidine as a biomarker for microvascular complications in type 2 diabetic patients. *Diab Vasc Dis Res.* 2013;10(3):239-45.
 31. Cai A, Li G, Chen J, Li X, Wei X, Li L, *et al.* Glycated hemoglobin level is significantly associated with the severity of coronary artery disease in non-diabetic adults. *Lipids Health Dis.* 2014;13:181.
 32. Armstrong DG, Jude EB. The role of matrix metalloproteinases in wound healing. *J Am Podiatr Med Assoc.* 2002;92(1):12-8.
 33. Berlanga Acosta J, Valdes Pérez C, Savigne Gutiérrez W, Mendoza Mari Y, Franco Pérez N, Vargas Machiran E, *et al.* Cellular and molecular insights into the wound healing mechanism in diabetes. *Biotechnología Aplicada.* 2010;27(4):255-61.
 34. Ceriello A. Hypothesis: the "metabolic memory", the new challenge of diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2009;86 Suppl 1:S2-S6.
 35. Fernández Montequin JI, Betancourt BY, Leyva González G, Mola EL, Galan Naranjo K, Ramírez Navas M, *et al.* Intralesional administration of epidermal growth factor-based formulation (Heberprot-P) in chronic diabetic foot ulcer: treatment up to complete wound closure. *Int Wound J.* 2009;6(1):67-72.
 36. Fernández Montequin JI, Infante Cristia E, Valenzuela Silva C, Franco Pérez N, Savigne-Gutiérrez W, Artaza Sanz H, *et al.* Intralesional injections of Citoprot-P (recombinant human epidermal growth factor) in advanced diabetic foot ulcers with risk of amputation. *Int Wound J.* 2007;4(4):333-43.
 37. Fernández Montequin JI, Valenzuela Silva CM, Díaz OG, Savigne W, Sancho Soutelo N, Rivero Fernández F, *et al.* Intra-lesional injections of recombinant human epidermal growth factor promote granulation and healing in advanced diabetic foot ulcers: multi-center, randomised, placebo-controlled, double-blind study. *Int Wound J.* 2009;6(6):432-43.
 38. Berlanga Acosta J, Mendoza Mari Y, Martínez MD, Valdes Pérez C, Ojalvo AG, Armstrong DG. Expression of cell proliferation cycle negative regulators in fibroblasts of an ischemic diabetic foot ulcer. A clinical case report. *Int Wound J.* 2013;10(2):232-6.
 39. Berlanga Acosta J, Armstrong DG, Schultz GS, Herrera Martínez L. Chronic wounds with emphasis in diabetic foot ulcers. *Biomed Res Int.* 2014;2014:890352.
 40. Allen JD, Miller EM, Schwark E, Robbins JL, Duscha BD, Annex BH. Plasma nitrite response and arterial reactivity differentiate vascular health and performance. *Nitric Oxide.* 2009;20(4):231-7.
 41. Assmann TS, Brondani LA, Boucas AP, Rheinheimer J, de Souza BM, Canani LH, *et al.* Nitric oxide levels in patients with diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Nitric Oxide.* 2016;61:1-9.
 42. Mishra S, Mishra BB. Study of Lipid Peroxidation, Nitric Oxide End Product, and Trace Element Status in Type 2 Diabetes Mellitus with and without Complications. *Int J Appl Basic Med Res.* 2017;7(2):88-93.
 43. Shi HP, Most D, Efron DT, Witte MB, Barbul A. Supplemental L-arginine enhances wound healing in diabetic rats. *Wound Repair Regen.* 2003;11(3):198-203.
 44. Andre Levigne D, Modarressi A, Pepper MS, Pittet Cuenod B. Reactive Oxygen Species and NOX Enzymes Are Emerging as Key Players in Cutaneous Wound Repair. *Int J Mol Sci.* 2017;18(10).
 45. Berlanga Acosta J, Gavilondo Cowley J, García del Barco Herrera D, Martín Machado J, Guillen Nieto G. Epidermal Growth Factor (EGF) and Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) as Tissue Healing Agents: Clarifying Concerns about their Possible Role in Malignant Transformation and Tumor Progression. *J Carcinog Mutagen.* 2011;2(1):doi: 10.4172/2157-518.1000115.
 46. Berlanga J, Caballero E, Prats P, López SP, Playford RJ. [The role of the epidermal growth factor in cell and tissue protection]. *Med Clin (Barc).* 1999;113(6):222-9.
 47. Qin XQ, Sun XH, Lou ZQ, Guan CX, Zhang CQ. [Cytoprotective effect of epidermal growth factor on cultured rabbit airway epithelial cells exposed to ozone]. *Sheng Li Xue Bao.* 1996;48(2):190-4.
 48. Arda-Pirincci P, Bolkent S. The role of epidermal growth factor in prevention of oxidative injury and apoptosis induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Acta Histochem.* 2014;116(1):167-75.
 49. Acosta JB, del Barco DG, Vera DC, Savigne W, López Saura P, Guillen NG, *et al.* The pro-inflammatory environment in recalcitrant diabetic foot wounds. *Int Wound J.* 2008;5(4):530-9.
 50. Roncero C, Fabregat I, Benito M. Regulation of gene expression by interleukin-6 in fetal rat hepatocyte primary cultures: role of epidermal growth factor and dexamethasone. *Hepatology.* 1995;22(6):1769-75.
 51. Trautwein C, Boker K, Manns MP. Hepatocyte and immune system: acute phase reaction as a contribution to early defence mechanisms. *Gut.* 1994;35(9):1163-6.
 52. Koj A, Rokita H, Kordula T, Kurdowska A, Travis J. Role of cytokines and growth factors in the induced synthesis of proteinase inhibitors belonging to acute phase proteins. *Biomed Biochim Acta.* 1991;50(4-6):421-5.
 53. Mackiewicz A, Speroff T, Ganapathi MK, Kushner I. Effects of cytokine combinations on acute phase protein production in two human hepatoma cell lines. *J Immunol.* 1991;146(9):3032-7.
 54. Pickup JC. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2004;27(3):813-23.
 55. Margaryan S, Witkiewicz A, Arakelyan A, Partyka A, Karabon L, Manukyan G. sFasL-mediated induction of neutrophil activation in patients with type 2 diabetes mellitus. *PLoS One.* 2018;13(7):e0201087.
 56. Li MF, Zhang R, Li TT, Chen MY, Li LX, Lu JX, *et al.* High Glucose Increases the Expression of Inflammatory Cytokine Genes in Macrophages Through H3K9 Methyltransferase Mechanism. *J Interferon Cytokine Res.* 2016;36(1):48-61.
 57. Meshkani R, Vakili S. Tissue resident macrophages: Key players in the pathogenesis of type 2 diabetes and its complications. *Clin Chim Acta.* 2016;462:77-89.

58. Ridker PM. From C-Reactive Protein to Interleukin-6 to Interleukin-1: Moving Upstream To Identify Novel Targets for Atheroprotection. *Circ Res.* 2016;118(1):145-56.
59. Berlanga Acosta J, Mendoza Mari Y, Garcia Ojalvo A, Fernández Mayola M, Guillen Nieto G. Epidermal Growth Factor Therapy Impact on Scar Tissue Resilience of Diabetic Lower Limbs Ulcers-An Enlightening Hypothesis. *J Diabetes Metab.* 2018;9(7):798.

Recibido: 08/06/2021
Aprobado: 24/11/2021

Conflictos de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses en relación con la investigación presentada en opción al Premio Anual de la ACC 2020.

Contribuciones de los autores

- Conceptualización: Ariana García Ojalvo, Jorge Berlanga Acosta
- Curación de datos: Ariana García Ojalvo
- Análisis formal: Ariana García Ojalvo, Mónica Béquet Romero
- Investigación: Ariana García Ojalvo, Jorge Berlanga Acosta, Yssel Mendoza Marí, Maday Fernández Mayola, Mónica Béquet Romero, Calixto Valdés Pérez, William Savigne Gutiérrez, Alain Figueroa Martínez, Ileydis Iglesias Marichal, Eduardo Álvarez Seijas, Amirelia Fabelo Martínez

- Metodología: Ariana García Ojalvo, Jorge Berlanga Acosta, Mónica Béquet Romero
- Administración del proyecto: Jorge Berlanga Acosta
- Recursos: Calixto Valdés Pérez, William Savigne Gutiérrez, Alain Figueroa Martínez, Ileydis Iglesias Marichal, Eduardo Álvarez Seijas, Amirelia Fabelo Martínez
- Supervisión: Jorge Berlanga Acosta, Gerardo Guillén Nieto
- Visualización: Ariana García Ojalvo
- Redacción-borrador original: Ariana García Ojalvo, Jorge Berlanga Acosta, Mónica Béquet Romero
- Redacción-revisión y edición: Ariana García Ojalvo, Jorge Berlanga Acosta, Gerardo Guillén Nieto

Financiación

Esta investigación fue financiada por BioCubaFarma, grupo empresarial de las industrias biotecnológica y farmacéutica.

Cómo citar este artículo

García Ojalvo A, Berlanga Acosta J, Mendoza Marí Y, Fernández Mayola M *et al.*. Efectos sistémicos del tratamiento intralesional con factor de crecimiento epidérmico (Heberprot-P) en pacientes con úlceras de pie diabético. *Anales de la Academia de Ciencias de Cuba* [internet] 2022[citado en día, mes y año];12(1): e1088. Disponible en: <http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/1088>

