

## **Comparación de los niveles séricos de óxido nítrico y malondialdehído en pacientes con pie diabético con y sin infección**

*Comparison of Serum Nitric Oxide and Malondialdehyde Levels in Patients with Infected and Non Infected Diabetic Foot*

**Hernández Arteaga, M.<sup>1,2</sup>; Núñez, R.<sup>2,3</sup>;  
Godoy, N.<sup>4</sup>; Socarras, E.<sup>2</sup>; González, Z.<sup>2,3</sup>;  
Chávez J.<sup>2,3</sup>; Cano, C.<sup>2</sup>; Bermúdez V.<sup>2</sup>; Suárez G.<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Cátedra de Bacteriología y Virología.

<sup>2</sup>Centro de Investigaciones Endocrino-Metabólicas "Dr. Félix Gómez".

<sup>3</sup>Cátedra de Fisiología, Clínica Médica.

<sup>5</sup>Unidad Docente Hospital General del Sur.

Facultad de Medicina, Universidad del Zulia (LUZ).

### **Resumen**

La patogenia de las infecciones del pie diabético involucra la polineuropatía, la enfermedad macro y microvascular y el déficit funcional de los neutrófilos. La vasodilatación dependiente del endotelio, relacionada con el Óxido Nítrico (NO), está comprometida en diabéticos predispuestos a ulceración del pie. El NO, es producido también por neutrófilos y macrófagos estimulados por citoquinas o lipopolisacáridos bacterianos mediante la sintetasa de NO inducible (iNOS), ejerciendo actividad microbicida. La peroxidación lipídica reflejada por la producción de Malondialdehído (MDA), está implicada en el desarrollo de microangiopatía diabética. Para comparar los niveles séricos de NO y MDA en pacientes con pie diabético con y sin infección, se estudiaron 27 individuos diabéticos tipo 2 con edades entre 38 y 65 años divididos en 3 grupos: 8 controles sin afección de los pies (A), 10 con pie diabético sin infección (B) y 9 con pie diabético infectado (C). El NO fue determinado mediante ensayo de diazotización y el MDA mediante la reacción de Ácido Thiobarbitúrico. B y C mostraron niveles de NO menores ( $p = 7.636 \times 10^{-5}$  y  $p = 0,006$ ) que A. El NO fue mayor en el grupo infectado que en el grupo sin infección ( $p = 0,05$ ), sin embargo los valores obtenidos no coinciden con lo esperado teniendo en cuenta las grandes cantidades de NO producido mediante la

iNOS, sugiriendo un defecto más del leucocito del diabético. No hubo diferencia significativa en el MDA entre los grupos, indicando ausencia de stress oxidativo relevante.

**Palabras clave:** Óxido nítrico, malondialdehído, pie diabético, infección.

### Abstract

---

Pathogenesis of diabetic foot infections include polineuropathy, macro and microvascular disease and neutrophil functional deficit. Endothelium dependent vasodilatation related to Nitric Oxide (NO) production is compromised in diabetics predisposed to foot ulceration. NO is also produced when neutrophils and macrophages are stimulated by cytokines or bacterial lipopolysaccharides through the inducible nitric oxide synthase (iNOS), exerting microbicide activity. Lipid peroxidation reflected by Malondialdehyde (MDA) production, is associated with diabetic microangiopathy development. To compare serum NO and MDA levels in patients with infected and non infected diabetic foot, 27 type 2 diabetics, 38 to 65 years old were studied, and divided into three groups: 8 control subjects without foot affection (A), 10 with non infected diabetic foot (B) and 9 with infected diabetic foot (C). NO was determined by diazotization assay and MDA by thiobarbituric acid assay. B and C showed lower NO levels ( $p = 7.636 \times 10^{-5}$  and  $p = 0,006$ ) compared with A group. NO was higher in the infected group than in the non infected ( $p = 0,05$ ), nevertheless, the obtained values do not coincide with the expected values considering the big amount of NO produced through iNOS, it suggests another defect of diabetic's leukocyte. There were no significant differences in MDA between the groups, indicating absence of relevant oxidative stress.

**Key words:** Nitric oxide, malondialdehyde, diabetic foot, infection.

---

### Introducción

La incidencia y severidad de las infecciones en los pies es mayor en personas con diabetes que en la población no diabética (12), constituyendo causa frecuente de hospitalización. El 50% de las amputaciones de la parte inferior de la pierna no relacionadas con traumatismo ocurre en diabéticos (4) y más del 50% de los diabéticos amputados necesita una amputación subsiguiente de la pierna contralateral dentro de los 4 años que siguen a la pérdida de la primera pierna (28). La polineuropatía, complicación común de la Diabetes Mellitus, que afecta un estimado de 50-60% de los pacientes con esta enfermedad (2) en conjunción con la enfermedad macro y microvascular (4), aunado al déficit funcional de los neutrófilos caracterizado por al-

teraciones en la quimiotaxis, en la generación de radical superóxido ( $O_2$ ) (4) y en la destrucción intracelular de los microorganismos fagocitados (4), actúan como elementos fisiopatológicos de las lesiones de los pies en el paciente diabético.

Es probable que la célula endotelial juegue un rol pivotal en el desarrollo de enfermedad macro y microvascular en diabetes (16, 18). La vasodilatación dependiente del endotelio y la vasodilatación independiente del endotelio están comprometidas en pacientes diabéticos predispuestos a ulceración del pie (5, 24, 27). La vasodilatación dependiente del endotelio se relaciona con el óxido nítrico (NO) que es un intermediario reactivo endógeno, un radical libre, generado por la acción de la enzima NO sintetasa (NOS) la cual cataliza la conversión de L-arginina en

L-citrulina y NO (20). Inicialmente identificado en el endotelio vascular, es ahora evidente que otras células incluidas macrófagos, neutrófilos y neuronas sintetizan NO (29). Se han descrito tres clases de NOS: dos están presentes continuamente en células específicas, y son llamadas NOS constitutivas (cNOS). De éstas, una isoforma se encuentra en forma de proteína ligada a las membranas de las células endoteliales. Las cNOS producen pequeñas cantidades de NO, después que ocurre una estimulación por agonistas específicos. Una tercera isoforma de NOS, no está presente en células no estimuladas y produce grandes cantidades de NO siguiendo a la estimulación de células apropiadas por citoquinas o lipopolisacáridos (LPS). Esta isoforma es llamada NOS inducible (iNOS) (19).

El NO es un mediador tanto de procesos fisiológicos como patológicos y produce una gran variedad de efectos biológicos que van desde citoprotección a citotoxicidad (26). Se ha demostrado que el NO ejerce, *in vitro*, actividad microbicida o microbiostática, contra un número rápidamente creciente de helmintos, protozoarios, bacterias y virus. En un pequeño número de casos ha sido demostrado un rol *in vivo* en las respuestas del huésped a la infección, en modelos experimentales. Las bacterias para las cuales existe al menos alguna evidencia experimental de la actividad antimicrobiana del NO incluyen *Clostridium*, *Escherichia* y *Staphylococcus* (7), las cuales con frecuencia producen infecciones en el pie diabético. Los mecanismos específicos responsables de la citostasis o muerte celular causada por NO son actualmente desconocidos. Esta cuestión se complica por las complejas reacciones del NO con el  $O_2^-$ , metales y tioles. La reacción del NO con el  $O_2^-$ , da origen al peroxinitrito ( $OONO^-$ ) (13) una mo-

lécula altamente tóxica y reactiva con el potencial de oxidar una variedad de poblaciones celulares. Esto provee bases bioquímicas para un sinergismo entre el NO y el otro sistema antimicrobiano de células fagocíticas, el estallido respiratorio (7), el cual implica la generación de varios radicales libres derivados del oxígeno entre ellos el  $O_2^-$  una vez ocurrida la fagocitosis. Hibbs y colaboradores descubrieron que los macrófagos activados pueden convertir L-arginina en NO (14) el cual puede mediar la acción bactericida de estas células (15). Los macrófagos parecen ser la principal fuente de nitratos y nitritos inducidos por LPS (20).

Teniendo en cuenta la reacción señalada entre el  $O_2^-$  y el NO, debe señalarse que existe un cuerpo creciente de evidencia de experimentos animales e investigaciones clínicas que indican que una variedad de enfermedades están asociadas con una producción incrementada de  $O_2^-$  comprometiendo las importantes funciones de la producción endotelial de NO, entre ellas la diabetes. En los diabéticos la anormalidad de la vasodilatación dependiente del endotelio se corresponde con una disminución de la producción endotelial y/o biodisponibilidad de NO debido a la inactivación oxidativa por producción excesiva de  $O_2^-$  en la pared vascular (16).

Por otro lado, el stress oxidativo manifestado como peroxidación lipídica está implicado en el desarrollo de microangiopatía diabética (18). El Malondialdehído (MDA) es un producto generado en la oxigenación enzimática del ácido araquidónico y de la degradación oxidativa de lípidos, incluyendo membranas y lipoproteínas (11). Estudios previos han mostrado niveles elevados de MDA en diabéticos con enfermedad vascular y niveles normales en diabéticos sin esta complicación (9).

No está dilucidada, hasta el presente, la efectividad de la respuesta de las células inmunes del diabético en cuanto a producción de NO en condiciones de infección; probablemente está comprometida. Tampoco está claro si la infección incrementa el stress oxidativo asociado a las complicaciones vasculares de la diabetes y por ende la producción de MDA.

Siendo como señalamos al comienzo, el pie diabético, causa importante de hospitalizaciones prolongadas y amputaciones, con repercusión en la esfera emocional del individuo y la familia, e implicaciones laborales y económicas no sólo para el paciente que ve limitado su desempeño y capacidad para el trabajo y debe afrontar junto con su grupo familiar los costos elevados del tratamiento y rehabilitación sino también para las instituciones de salud sobre todo las de carácter público que asumen buena parte de dichos costos, cualquier aporte sobre la fisiopatología de esta condición podría generar en el futuro nuevas estrategias terapéuticas que mejoren la evolución y minimicen el impacto económico de la misma.

El objetivo de esta investigación fue comparar los niveles séricos de NO y MDA en pacientes con pie diabético no infectado y pacientes en los cuales la infección se superpone a las alteraciones neurológicas y/o vasculares del pie diabético.

## Materiales y Métodos

Se realizó estudio experimental, prospectivo, aleatorio, transversal, controlado en el cual se estudiaron 27 individuos de ambos sexos con edades de 38 a 65 años y diagnóstico establecido de Diabetes Mellitus tipo 2 hospitalizados en los Servicios de Medicina Interna del Hospital Universitario de Mara-

caibo, Venezuela o que acuden a consulta externa en el mismo centro. Los pacientes fueron divididos en 3 grupos: el grupo A estuvo conformado por 8 pacientes sin evidencia clínica de neuropatía o enfermedad vascular y sin alteraciones anatómicas compatibles con pie diabético. El grupo B, por 10 pacientes con alteraciones anatómicas compatibles con pie diabético (incluidas úlceras crónicas o amputaciones de segmentos metatarsales o falángicos) pero sin evidencia clínica de infección; en el grupo C se incluyeron 9 paciente con pie diabético infectado (tanto úlceras crónicas sobre infectadas o infecciones secundarias a lesiones traumáticas por punción, roce o contusión). Se consideraron datos clínicos de infección la presencia de inflamación, celulitis o secreción de la lesión, así como también la presencia de fiebre o leucocitosis.

Fueron excluidos del estudio aquellos pacientes con hipertensión severa no controlada, cardiopatía isquémica aguda (IM reciente o angina inestable) o nefropatía (creatinina > 1.5).

A todos los pacientes se les determinó presión arterial (PA, mm Hg) y creatinina sérica, así mismo se practicó cuenta blanca y fórmula a los pacientes de los grupo B y C. A los incluidos en el grupo C se les realizó cultivo de secreción para identificar el agente etiológico de la infección y doppler de miembros inferiores para evaluar la vasculatura.

Para determinar los parámetros objeto del estudio se tomó a cada individuo 6 cc de sangre en un tubo sin anticoagulante la cual fue centrifugada a 3000 rpm y el suero obtenido fue congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. NO fue determinado por medio de su producto de degradación final, nitrito, mediante ensayo de diazotización descrito por Ancher y ba-

sado en la reacción de Greiss la cual es específica para los óxidos nitrogenados que generan NO bajo soluciones ácidas. Los sueros obtenidos se homogeneizaron con ácido clorhídrico 4N luego se centrifugaron (Clinical Centrifuge. International Equipment. Company Neddham Heights. MA. USA), y se tomó el sobrenadante. Una alícuota de éste se incubó (Dunoff Metabolic Shaking Incubator GCA. Precision Scientific. USA) con una solución de HCl 2N y ácido sulfanílico (2 mg/ml) por 10 min, luego se añadió N-1-naftil-etilendiamina (1 mg/ml) y se incubó durante 30 minutos más. A la muestra completa se le midió la absorbancia a 548 nm en un espectrómetro (Beckman model 25 espectrofotometer. USA).

La concentración de nitritos fue calculada comparando el cambio observado en la absorbancia con una curva de calibración standar usando nitrito de sodio ( $\text{NaNO}_2$ ). Los resultados se expresan en  $\mu\text{M}$ . El MDA fue determinado mediante la reacción de ácido thiobarbitúrico (21) y la concentración expresada en  $\mu\text{M}$ .

Los datos obtenidos se expresan como valores absolutos, en porcentajes o como Media  $\pm$  Error Estándar ( $M \pm EE$ ) cuando sea aplicable. Para hacer comparación entre las medias de los grupos de estudio se utilizó la t de Student y se consideró un valor de  $p < 0.05$  como estadísticamente significativo.

## Resultados

Las concentraciones séricas de NO y MDA de los sujetos estudiados se presentan en la Tabla 1.

Los pacientes incluidos en los grupos B y C (conformados ambos por pacientes con pie diabético) mostraron niveles séricos de NO menores ( $p = 7.636 \times 10^{-5}$  y  $p = 0,006$  respectivamente) comparados con los pacientes del grupo A. En el grupo C, que incluyó pacientes con pie diabético infectado, sin embargo, la concentración sérica de NO fue mayor ( $p = 0,050$ ) que en el grupo de pie diabético sin infección (B).

La concentración sérica de MDA fue mayor en el grupo C que en los grupos B y A pero sin significancia estadística ( $p = 0,883$  y  $p = 0,177$  respectivamente). Tampoco se evidenció diferencia estadísticamente significativa entre la concentración de MDA en el suero de los pacientes del grupo B y la concentración sérica de dicho radical en el grupo A ( $p = 0,376$ ).

La Tabla 2 muestra los microorganismos aislados en los cultivos practicados a los pacientes con signos de infección (grupo C). 7 de los pacientes en este grupo (77.7%) presentaron infección mixta. Se obtuvo una media de 2.44 microorganismos por paciente, siendo los gérmenes gramnegativos (Enterobacterias y Bacilos Gramnegativos No Fermentadores), los microorganismos más fre-

**Tabla 1.** Concentraciones séricas de NO y MDA ( $\mu\text{M}$ ) en pacientes diabéticos sin afección de los pies (A), con pie diabético sin infección (B) y con pie diabético infectado (C). Los valores son Media  $\pm$  EE. \*  $p < 0.05$  vs B y A, †  $p < 0.05$  vs A.

Grupo	N	Edad	NO	MDA
A	8	48.5 $\pm$ 8.4	56.13 $\pm$ 2.86	1.36 $\pm$ 0.17
B	10	50.1 $\pm$ 9.48	25.27 $\pm$ 4.45 <sup>†</sup>	2.72 $\pm$ 1.44
C	9	50.67 $\pm$ 13.3	38.60 $\pm$ 3.87*	2.48 $\pm$ 0.63

**Tabla 2.** Microorganismos aislados en los pacientes con infección del pie.

Microorganismos	Aislamientos	%
<i>A. baumannii</i>	5	22.73
<i>S. aureus</i>	4	18.18
<i>E. coli</i>	3	13.64
<i>E. faecalis</i>	2	9.09
<i>P. mirabilis</i>	1	4.55
<i>P. aeruginosa</i>	1	4.55
<i>K. pneumoniae</i>	1	4.55
<i>S. grupo D</i>	1	4.55
<i>S. hemolítico grupo B</i>	1	4.55
<i>M. morgani</i>	1	4.55
<i>C. albicans</i>	1	4.55
<i>Candida sp</i>	1	4.55
Total	22	100.00

**Tabla 3.** Etiología de las infecciones de los pies de pacientes diabéticos.

Microorganismos	%
Gramnegativos	
<i>Enterobacteriaceae</i>	27.27
BGNNF	27.27
Grampositivos	
<i>Micrococacceae</i>	18.18
<i>Streptococacceae</i>	18.18
Hongos	9.09
Total	100

BGNNF: Bacilos Gramnegativos No Fermentadores

cuentemente aislados (54.54%) vs. 36.36% correspondiente a grampositivos (Tabla 3).

## Discusión

Este estudio mostró niveles de NO mayores en los pacientes con pie diabético infectado que en los pacientes con pie diabético sin infección, y se evidenció una menor concentración de MDA en el grupo con infección en el pie que en el no infectado, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

Los pacientes con pie diabético, independientemente de la presencia de infección mostraron niveles menores de NO que los controles diabéticos sin afectación de los pies (grupo A), lo cual podría relacionarse con el mejor control metabólico de los últimos cuya media de Hb A<sub>1c</sub> fue 7.31, lo cual contrasta con el pobre control metabólico de los pacientes de los 2 grupos restantes representado por glicemias en ayunas y post-prandiales muy elevadas. Sin embargo, esto se contrapone a los hallazgos de otros autores quienes han reportado mayores concentraciones plasmáticas de nitritos en pacientes con úlceras diabéticas comparados con pacientes diabéticos sin ulceración del pie, sin correlación entre la concentración de nitritos y los niveles de Hb A<sub>1c</sub> (15).

Por su parte, la mayor concentración de NO en el suero de los pacientes infectados en comparación con los no infectado, aquí reportada, es indicativo de la producción en los primeros de NO por acción de la enzima iNOS, cuya expresión está aumentada en leucocitos polimorfonucleares y macrófagos activados (entre otras células) después de la estimulación de los mismos por citoquinas o lipopolisacáridos; de hecho los más potentes inductores de la expresión de la iNOS en macrófagos son los lipopolisacáridos y el interfe-

ron (17). La inyección de LPS (endotoxina de *E. coli*) en ratas suscita la expresión transitoria de la isoforma iNOS (determinada por inmunoblotting e inmunostaining) y coincide con un incremento significativo en la formación de peroxinitrito (10).

La principal característica de la iNOS es que libera continuamente grandes cantidades de NO: la cantidad secretada por unidad de tiempo desde los macrófagos totalmente inducidos es 1.000 veces superior que la liberada por la cNOS en las células endoteliales. El papel del NO en las células inmunes activadas es el de actuar como una molécula asesina. Secretando cantidades masivas de NO se infringe una lesión oxidativa letal sobre las células víctimas, pudiendo actuar como un sistema de defensa del organismo contra los microorganismos agresores; las células inmunes tienen también la capacidad de aumentar unas 100 veces su superficie para envolver bacterias antes de matarlas con una descarga de NO. Las dianas moleculares en la célula víctima son las Cu - Fe - proteínas que liberan  $\text{Cu}^{++}$  y  $\text{Fe}^{++}$  libre, y generan  $\text{O}_2$  y radicales hidroxilo altamente tóxicos. El efecto neto es el de una lesión oxidativa masiva (1).

En este estudio, al igual que en otros, las bacterias gramnegativas constituyeron los agentes infecciosos más frecuentemente aislados a partir de la secreción de las lesiones de los pies de los pacientes diabéticos, representando en el nuestro el 54.54% de los aislamientos microbianos efectuados. Las bacterias gramnegativas contienen lipopolisacáridos como componentes importantes de su pared celular y éste puede inducir la síntesis de grandes cantidades de NO, mediante la iNOS, lo cual no se corresponde con las concentraciones del mismo aquí determinadas, a pesar de haber resultado la media, significativamente mayor al compararla con el grupo sin infección. Cabría esperar en condiciones

de infección niveles sustancialmente mayores a los encontrados, evidenciando quizás, un defecto más del leucocito o de los macrófagos en este grupo de pacientes. También se ha reportado que dichos pacientes con úlceras en el pie tienen mayor actividad de NOS en el sitio de la ulceración comparado con la piel normal y la piel del diabético atribuyéndose esto, casi exclusivamente a la isoforma inducible de la enzima. Por inmunohistoquímica se demostró que los macrófagos y otras células inflamatorias en la región central de la úlcera constituyen el origen de esta actividad enzimática incrementada (15). A pesar que en dicho estudio fueron excluidos aquellos pacientes con evidencia clínica de infección, los resultados parecieran indicar una producción normal de NO por parte de los macrófagos en el estado diabético, planteándonos entonces, que la respuesta moderada, aunque estadísticamente significativa, de síntesis de NO en presencia de infección de los pacientes con pie diabético obedece más bien a una alteración en la producción leucocitaria de este radical. Los pacientes diabéticos comúnmente fracasan en desarrollar una respuesta neutrófila apropiada ante infecciones serias (12). Deficiencias en la quimiotaxis, fagocitosis, producción de anión superóxido, estallido respiratorio y destrucción intracelular de microorganismos fagocitados han sido descritas en asociación con diabetes (4). A la luz de estos resultados, la producción insuficiente de NO por parte del leucocito de los pacientes diabéticos podría constituir un nuevo elemento fisiopatológico a considerar para explicar la mayor susceptibilidad de esta población a las infecciones en general y a las infecciones asociadas al pie diabético.

En relación al MDA, el nivel mayor de este compuesto producto final de la degradación oxidativa de lípidos, encontrado en el grupo C no fue estadísticamente significativo

al compararlo con los grupos B y A. Estudios previos han reportado niveles normales en pacientes diabéticos no complicados e incremento del mismo en pacientes con enfermedad vascular (diabéticos 4.5  $\mu\text{mol/l}$ , no diabéticos 4.4  $\mu\text{mol/l}$ ) en relación con los controles sanos (3.6  $\mu\text{mol/l}$ ) (9).

La peroxidación lipídica, representada por el MDA, se ha implicado en el desarrollo de complicaciones crónicas de la diabetes (18) y existen evidencias que la oxidación de lipoproteínas es un evento primario importante en la aterogénesis.

Otros estudios han comprobado aumento del MDA en situaciones productoras de un gran estrés oxidativo como durante la fase aguda del infarto del miocardio y en el accidente cerebro vascular trombótico. <sup>3</sup> En consecuencia es necesario una producción elevada de radicales libres de oxígeno que sobrepasen los sistemas antioxidativos defensivos para que la concentración de MDA supere los niveles considerados como normales, la única situación en la cual se ha observado este fenómeno hasta ahora es la isquemia/reperfusión presente en los fenómenos patológicos trombóticos vasculares. Varios de los pacientes incluidos en nuestro estudio presentaron necrosis tisular en el pie y alteraciones macro y microvasculares en la evaluación mediante doppler pero ninguno tuvo fenómenos isquémicos cardíacos o cerebrales agudos. Los valores de MDA determinados en esta serie parecen indicar que las alteraciones tisulares asociadas al pie diabético y a la infección sobreagregada no constituyen un stress oxidativo suficiente para incrementar sustancialmente los niveles séricos del mismo.

Investigaciones concluidas aún sin publicar, han mostrado que la generación de MDA en pacientes diabéticos mal controlados es idéntica a la de los pacientes diabéticos

bien controlados, lo cual aunado a la ausencia de enfermedad isquémica cardíaca o cerebral en esta serie explicaría la falta de significancia estadística en las diferencias encontradas entre los 3 grupos estudiados en lo que se refiere a los niveles basales de este metabolito.

## Conclusiones

Los pacientes con pie diabético infectado presentaron un nivel de NO mayor que los no infectados. Aunque estadísticamente significativa esta diferencia fue menor que lo esperado si se asume que depende de la iNOS.

La producción insuficiente de NO por parte del leucocito del diabético, puede constituir otro elemento fisiopatológico hasta ahora no contemplado, para explicar la mayor susceptibilidad de esta población a las infecciones en general y a la infección de los pies, al limitar la acción microbicida y microbiostática atribuida a este radical.

Las alteraciones tisulares asociadas al pie diabético y la infección sobreagregada del mismo, parecen no constituir un stress oxidativo suficiente para incrementar los niveles séricos de MDA.

## Referencias Bibliográficas

- (1) Ängar E: Óxido Nítrico: Mediador, asesino y medicamento a la vez. *Lancet*. 1994; 25 (4): 242-249.
- (2) Arezzo J: New developments in the diagnosis of diabetic neuropathy. *Am J Med*. 1999; 107: 9-16.
- (3) Bermúdez V, Bracho F, Medina M, Amell A, Cano C, Núñez M: Comportamiento del Malondialdehído y Óxido Nítrico sérico en pacientes con Infarto del Miocardio. *Rev Esp Cardiol*. 2000; 53: 512-516.
- (4) Bridges R, Deitch E: Diabetic foot infections: pathophysiology and treatment. *Surg Clin North Am*. 1994; 74: 357-555.



- (5) Bucala R, Tracey K, Cerami A: Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium - dependent vasodilatation in experimental diabetes. *J Clin Invest.* 1991; 87: 432-438.
- (6) Caputo G, Cavanagh P, Ulbrecht J, Gibbons G, Karchmer A: Current concepts: assessment and management of foot disease in patients with diabetes. *N Engl J Med.* 1994; 331: 854-860.
- (7) De Groote M, Fang F: NO Inhibitions: Antimicrobial Properties of Nitric Oxide. *Clin Infect Dis.* 1995; 21 (2): 162-165.
- (8) Delamaire M, Maugeudre D, Moreno M, Le Goff M, Allannic H, Genetet B: Impaired leucocyte functions in diabetic patients. *Diabet Med.* 1997; 14 (1): 29-34.
- (9) Dyer R, Stewart M, Mitcheson J, George K, Alberti M, Laber M: Malondialdehyde in non-insulin dependent diabetes and peripheral vascular disease. *Clin Chim Acta.* 1997; 260: 1-13.
- (10) El - Dwairi Q, Comtois A, Guo Y, Hussain S: Endotoxin - induced skeletal muscle contractile dysfunction: contribution of nitric oxide synthases. *Am J Physiol.* 1998; 274: 770-779.
- (12) Espinosa-Mansilla A., Salina F., Rubio A: Determination of Malonaldehyde in Human Plasma: Elimination of Spectral Interferences in the 2 - Thiobarbituric Acid Reaction. *Analyst.* 1993; 118: 89-95.
- (13) Gough A, Clapperton M, Rolando N, Foster A, Philpott - Howard J, Edmonds M: Randomised placebo - controlled trial of granulocyte - colony stimulating factor in diabetic foot infection. *Am J Med.* 1997; 350: 855-859.
- (14) Halliwell B, Gutteridge J, Cross C: Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? *J Lab Clin Med.* 1992; 598-620.
- (15) Hibbs J, Taintor R, Vavrin Z: Macrophage cytotoxicity: role of L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science.* 1987; 235: 473-476.
- (16) Jude E, Boulton A, Ferguson M, Appleton I: The role of nitric oxide synthase isoforms and arginase in the pathogenesis of diabetic foot ulcers: possible modulatory effects by transforming growth factor beta 1. *Diabetologia.* 1999; 42 (6): 748-757.
- (17) Kojda G, Harrison D: Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res.* 1999; 43: 562-571.
- (18) Lau A, Ramanathan S, Poussier P: Excessive Production of Nitric Oxide by Macrophages From DP-BB Rats Is Secondary to the T-Lymphopenic State of These Animals. *Diabetes.* 1998; 47: 197-205.
- (19) Lubec B, Hayn M, Kltzmuller E, Vierhapper H, Lubec G: L-arginine reduces lipid peroxidation in patients with diabetes mellitus. *Free Radic Biol Med.* 1997; 22: 355-357.
- (20) Molero M: Aspectos Fisiológicos y Fisiopatológicos del Óxido Nítrico en los Tejidos Mamíferos. *Inves Clin.* 1998; 39 (2): 125-154.
- (21) Moncada S, Palmer R, Higgs E: Nitric oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991; 43: 109-142.
- (22) Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K: Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *J Lipid Res.* 1978; 19: 1053-1057.
- (23) Pieper G, Langenstroer P, Siebeneich W: Diabetic induced endothelial dysfunction in rat aorta: role of hydroxyl radicals. *Cardiovasc Res.* 1997; 34: 145-156.
- (24) Pieper G: Review of alterations in endothelial nitric oxide production in diabetes. Protective role of arginine on endothelial dysfunction. *Hypertension.* 1998; 31: 1047-1060.
- (25) Pitei D, Watkins P, Edmonds M: NO - dependent smooth muscle vasodilatation is reduced in NIDDM patients with peripheral sensory neuropathy. *Diabet Med.* 1997; 14 (4): 284-290.
- (26) Sato N, Kashima K, Tanaka Y, Shimizu H, Mori M: Effect of granulocyte - colony stimulating factor on generation of oxygen - derived free radicals and myeloperoxidase activity in neutrophils from poorly controlled NIDDM patients. *Diabetes.* 1997; 46 (1): 133-137.
- (27) Shaffer M, Tantry U, Efron P, Ahrendt G, Thornton F, Barbul A: Diabetes - impaired

- healing and reduce wound nitric oxide synthesis: A possible pathophysiologic correlation. *Surgery*. 1997; 121: 513-519.
- (28) Tesfamariam B, Cohen R. Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *Am J Physiol*. 1992; 263: 321-326.
- (29) Veves A, Akbary C, Primavera J, Donaghue V, Zacharoulis D, Chrzan J, De Girolami U, LoGerfo F, Freeman R: Endothelial dysfunction and the expression of endothelial nitric oxid synthetase in diabetic neuropathy, vascular disease and foot ulceration. *Diabetes*. 1998; 47 (3): 457-463.
- (30) Wang W, Ballatori N: Endogenous Glutathione Conjugates: Occurrence and Biological Functions. *Pharmacol Rev*. 1998: 335-355.