

Originales

ERYTHROCYTIC AGGREGATION IN THE PHYSIOPATHOGENESIS OF DIABETIC MICROANGIOPATHIC SKIN LESIONS

Introduction: Diabetes can produce significant skin lesions. Some of them are linked to microcirculatory changes (diabetic dermopathy, pigmentary purpura, erythrosis, erysipela-like erythema, facial rubeosis, and perionychial telangiectases). There is increasing evidence that hemorheological abnormalities play a definitive role in diabetes mellitus. Consequently, the present study analyzed red blood cell aggregation in diabetic patients with and without skin lesions.

Patients and method: Eighty-six type 1 and type 2 diabetic patients of both sexes and similar ages, with (28) and without (58) skin lesions and 20 healthy controls underwent clinical, dermatological and hemorheological studies. Red blood cell aggregation was measured using direct microscopic observation and the recorded digitized images were numerically processed through the aggregate shape parameter (ASP). ANOVA, Student's t-test and the chi-square test were employed.

Results: Diabetic patients with skin lesions had longer disease duration than those without and their ASP (0.692 ± 0.066) significantly exceeded that of controls (0.288 ± 0.134) ($p < 10^{-5}$). ASP was also higher in diabetic patients with cutaneous lesions than in those without, although this difference was not significant.

The percentage of diabetic patients with ASP 0.65 was higher in those with cutaneous lesions than in those without (80% versus 45%, $p = 0.006$).

Conclusions: Red blood cell aggregation may participate in the development of diabetic microangiopathy and in the appearance of the above-mentioned dermatologic lesions.

Key words: Erythrocytic aggregation. Diabetes. Skin. Hemorheology.

La agregación eritrocitaria en la fisiopatogenia de las lesiones cutáneas microangiopáticas diabéticas

L.I. CARRERA^a, R. ETCHEPARE^b, P.G. FORESTO^c, M. D'ARRIGO^c, A.E. D'OTTAVIO^{a,d} Y J. VALVERDE^c

^aCátedra de Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario. Rosario. Santa Fe. Argentina. ^bServicio de Oftalmología. Hospital Provincial de Rosario. Rosario. Santa Fe. Argentina.

^cLaboratorio de Inmunoheorreología. Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Rosario. Santa Fe. Argentina.

^dConsejo de Investigaciones. Universidad Nacional de Rosario. Rosario. Santa Fe. Argentina.

Introducción: La diabetes puede producir importantes lesiones cutáneas; algunas microangiopáticas (dermopatía diabética, púrpura pigmentaria, eritrosis, eritema similar erisipela, rubeosis facial y telangiectasias periungueales). Existe creciente evidencia de que las anomalías hemorreológicas desempeñan un papel definido en esta enfermedad. En consecuencia, este trabajo analiza la agregación eritrocitaria en pacientes diabéticos con y sin lesiones cutáneas

Pacientes y método: Se estudió clínica, dermatológica y hemorreológicamente a 86 pacientes con diabetes tipos 1 y 2, de ambos sexos y edades similares, con lesiones cutáneas (28) y sin ellas (58), y 20 controles sanos. La agregación eritrocitaria se midió mediante observación microscópica directa y procesamiento numérico de las imágenes digitalizadas recogidas a través del llamado Parámetro de Forma de los Agregados (ASP). Los datos se analizaron con ANOVA y las pruebas de la t de Student y de la χ^2 .

Resultados: El tiempo de evolución de los pacientes diabéticos con lesiones cutáneas fue más prolongado y su ASP (0.692 ± 0.066) excedió significativamente el de los controles (0.288 ± 0.134) ($p < 10^{-5}$) y se reveló superior al de aquéllos sin lesiones, aunque sin diferencias significativas entre ambos. El porcentaje de pacientes diabéticos con ASP 0.65 fue superior en aquéllos que presentaban lesiones cutáneas (el 80 frente al 45%; $p = 0.006$).

Conclusiones La agregación eritrocitaria puede participar en el desarrollo de la microangiopatía diabética y en la aparición de las citadas lesiones dermatológicas.

Palabras clave: Agregación eritrocitaria. Diabetes. Piel. Hemorreología.

El presente trabajo fue presentado en la Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario, 2004.

Correspondencia: Dr. A.E. D'Ottavio.
Matheu, 371. Rosario. Santa Fe. Argentina.
Correo electrónico: aedottavio@hotmail.com

Manuscrito recibido el 9-6-2005; aceptado para su publicación el 30-1-2006.

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus produce diferentes expresiones clínicas en la piel, que pueden no sólo ser complicación de una diabetes ya conocida sino también, y lo que es más relevante, constituir el primer indicador de una aún no diagnosticada. En este sentido, y dentro del conjunto de manifestaciones cutáneas de la diabetes, el eritema similar a la erisipela, la púrpura pigmentaria, la rubeosis facial, las telangiectasias periungueales y la dermatopatía diabética serían consecuencia del impacto de la microangiopatía diabética, que, además, puede comprometer otros territorios orgánicos, como los nervios, los riñones o la retina¹⁻⁶.

Determinados autores postulan que en la fisiopatogenia de la microangiopatía diabética participarían alteraciones hemorreológicas o del flujo sanguíneo. A tal respecto, resulta pertinente señalar que la viscosidad sanguínea, a determinada velocidad de flujo, es producto de la interacción entre la viscosidad plasmática, el hematocrito, la deformabilidad de los glóbulos rojos y la agregación eritrocitaria y que, a su vez, esta última desempeña un papel preponderante en la determinación de la viscosidad de la sangre a bajas velocidades de flujo, ya que esto último aumenta significativamente a medida que se incrementa la referida agregación⁷⁻⁹.

Partiendo de ello, y teniendo en cuenta, además, que no siempre existe correlación entre la presencia de lesiones en la piel y la existencia de lesiones capilares patognomónicas evidenciables microscópicamente en la microvasculatura dérmica^{2,4,10,11}, el presente trabajo analiza el papel de la agregación eritrocitaria en la fisiopatogenia de las lesiones cutáneas microangiopáticas diabéticas humanas y, además, valora estimativamente el riesgo que los pacientes diabéticos, con y sin ellas, tienen de desarrollarlas cuando dicha agregación se encuentra comprometida.

PACIENTES Y MÉTODO

Se estudió a los 86 de los pacientes diabéticos tipos 1 y 2, de ambos sexos, que concurrieron durante 2004 al Servicio de Oftalmología del Hospital Provincial de Rosario, todos ellos correctamente diagnosticados y derivados por sus médicos tratantes (28 con lesiones cutáneas –eritema similar a la erisipela, dermatopatía diabética, rubeosis facial, telangiectasias periungueales o púrpura pigmentaria– y 58 sin lesiones) que cumplieron con los criterios de inclusión. En consecuencia, se incorporó a pacientes diabéticos, varones y mujeres, con y sin lesiones en la piel, con una edad promedio de $58,75 \pm 9,36$ y $57,68 \pm 10,24$ años, respectivamente, no fumadores, que no se hallaban en tratamiento con fármacos capaces de alterar la reología sanguínea y que no presentaban otra enfermedad intercurrente.

A su vez, el grupo control estuvo formado por 20 voluntarios de ambos sexos (edad promedio = $59,54 \pm 9,10$ años), clínica y bioquímicamente sanos, no fumadores, que

no recibían transitoria ni preventivamente fármacos capaces de alterar la reología sanguínea y que concurrieron durante el mismo período al mismo hospital.

El registro del tiempo de evolución de la enfermedad y de las lesiones cutáneas antedichas se llevó a cabo empleando un protocolo clinicodermatológico, que contenía estas variables junto con los datos de identificación de cada paciente (edad, sexo y tipo de diabetes, entre ellos).

Se trabajó con muestras de sangre obtenidas por punción venosa, anticoaguladas con EDTA y centrifugadas para separar los glóbulos rojos, que se resuspendieron posteriormente en plasma autólogo al 2%. Esta suspensión, colocada en un portaobjetos excavado y en reposo por 2 min, se analizó con un microscopio óptico invertido (Union Optical, Tokio, Japón). El estudio de la morfología de los agregados lo efectuó un observador ciego a la fuente de la muestra a través de análisis de imágenes digitalizadas, captadas por una videocámara (Sony). Dichas imágenes fueron ulteriormente procesadas mediante el programa IPP-PLUS 2,1, y se calculó el grado de redondez, el tamaño, el área y el perímetro de cada agregado. La estimación cuantitativa de la morfología de los agregados eritrocitarios se hizo con la técnica denominada ASP (*aggregate shape parameter* o parámetro de forma de los agregados)^{8,9,12}.

Dicho parámetro se expresa por la siguiente ecuación, en la que A es el área proyectada del agregado y P es su perímetro proyectado:

$$ASP = \frac{4 \cdot \pi \cdot A}{P^2}$$

Los valores de ASP varían de 0 a 1. En estas condiciones, una esfera, cuya imagen proyectada es un círculo, tendrá un valor máximo de $ASP = 1$, mientras que un cilindro, cuya área proyectada es un rectángulo, presentará valores de $ASP < 1$.

Los valores de ASP registrados resultaron del promedio correspondiente a los agregados observados en 5 campos diferentes.

El trabajo respetó las normas éticas que rigen la investigación en seres humanos, tanto para los casos como para los controles, y fue aprobado oportunamente por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario (Argentina).

Desde el punto de vista estadístico, el comportamiento no alejado de la normalidad de la variable en estudio, así como la homogeneidad de la varianza, evidenciada por el test de Levene ($p = 0,255$), permitió la aplicación del análisis de la varianza de un factor (ANOVA de un factor) y del test de t de Student¹³. Asimismo, mediante el test de la χ^2 se compararon los porcentajes¹³.

Los datos se procesaron mediante el programa estadístico SPSS, versión 10.0, del Departamento de Matemática de la Facultad de Bioquímica de la Universidad Nacional del Litoral¹⁴.

RESULTADOS

El tiempo de evolución promedio de la metabolopatía fue superior en los 28 diabéticos con lesión cutánea ($16,11 \pm 6,02$ años) que en los 58 sin ella ($9,29 \pm 4,85$ años) ($p = 0,0017$).

La variable ASP no difirió significativamente entre diabéticos tipos 1 y 2 (estos últimos representaron el 86% de la muestra) ni entre sexos (los valores promedios estuvieron en su totalidad comprendidos entre $0,738 \pm 0,071$ y $0,554 \pm 0,170$; $p > 0,05$), por lo que estos datos fueron unificados al igual que los de los controles que, por su parte, no registraron notorias diferencias intersexuales (varones, $0,260 \pm 0,128$; mujeres, $0,296 \pm 0,140$; $p > 0,05$).

Las diferencias entre los valores promedio de ASP en diabéticos con lesiones cutáneas ($0,692 \pm 0,066$) y los de los controles ($0,288 \pm 0,134$) resultaron altamente significativos ($p < 10^{-5}$).

Si bien la comparación de los valores promedios de ASP entre los pacientes diabéticos con y sin lesiones en la piel no arrojó diferencias significativas ($0,692 \pm 0,066$ y $0,623 \pm 0,145$, respectivamente; $p > 0,05$), estos valores fueron mayores en el grupo con lesiones cutáneas, que presentó un número elevado de casos con valores de ASP superiores al máximo y a la mediana del grupo sin lesiones. En ese sentido, en la figura 1 se aprecia que el 50% de los valores de ASP en los pacientes con lesiones en la piel se corresponde con el 25% superior (cuarto cuartil) de los enfermos que carecen de ellas.

Por su parte, el valor de $ASP = 0,65$ correspondió al percentil 20 de la distribución de los enfermos con lesiones cutáneas y al percentil 55 de la correspondiente a los enfermos sin ellas, lo que representa un punto de corte.

Tomando como referencia estimativa dicho punto de corte, susceptible de confirmación en estudios ulteriores, se detectaron, en particular, diferencias estadísticamente significativas, con $ASP \geq 0,65$, entre los porcentajes de pacientes diabéticos, con y sin lesiones cutáneas (el 80 frente al 45%; $p = 0,006$) (tabla 1).

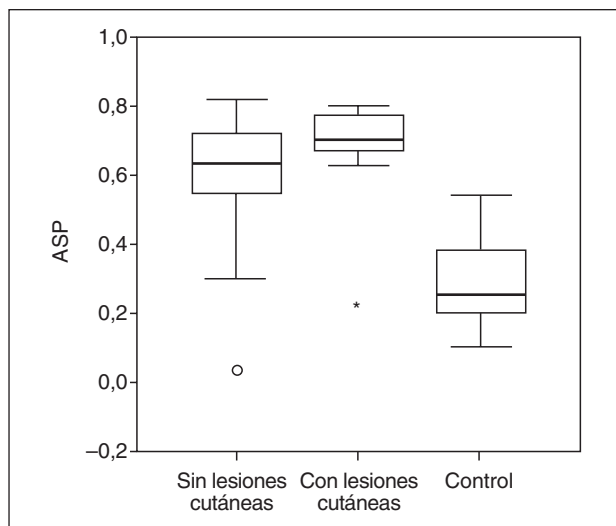


Fig. 1. Gráfico de cajas que representa valores de aggregate shape parameter (ASP) en los 3 grupos analizados. Límites de caja: mediana señalada dentro de la caja; percentiles 25 y 75. Se destaca la presencia de un outlier en los pacientes diabéticos sin lesiones cutáneas.

DISCUSIÓN

Cabe destacar, inicialmente, que las edades y los tiempos de evolución fueron compatibles con el elevado porcentaje de pacientes diabéticos tipo 2 que integraron la muestra unificada; que el mayor tiempo de evolución en los pacientes diabéticos con lesiones en piel corroboró lo sostenido por otros autores en territorios orgánicos como la retina⁵, y que la ausencia de comportamientos diferenciales en el ASP entre los pacientes diabéticos de tipo 1 y tipo 2 coincidió con lo indagado en la bibliografía especializada^{1-4,10,11}.

En lo que atañe específicamente a los valores de ASP, los resultados hallados abonan una llamativa asociación entre agregación eritrocitaria y lesiones cutáneas microangiopáticas diabéticas.

En este sentido, corresponde señalar que el ASP permite una aproximación a los fenómenos que ocurren habitualmente en la microcirculación, donde los eritrocitos colisionan y forman pilas de moneda (*rouleaux*)^{7,12}.

Estos agregados eritrocitarios pueden tornarse irregulares cuando se reduce la deformabilidad de los hematíes o se ve afectada la interacción célula-célula por cambios en las cargas eléctricas de membrana y/o por aumentos en determinadas proteínas plasmáticas, que promoverían la formación de puentes reversibles entre los glóbulos rojos^{7,12,15-17}. Lo referido se describió ya en un trabajo previo en el que corroboramos, en los diabéticos y mediante el ASP, la formación de agregados anómalos (*clusters*)⁹.

Plante et al¹⁷ subrayan que el ácido siálico, molécula ubicada en la superficie externa de la membrana del eritrocito, le aporta cargas negativas y genera fuerzas electrostáticas de repulsión entre los hematíes. Los mismos autores ponen de relieve que la desialización de dichas membranas que tendría lugar en los pacientes diabéticos podría generar aumentos en la agregación de los glóbulos rojos por cambios en sus cargas eléctricas y la consiguiente atracción entre ellos. Asimismo, la interacción eritrocitos-endotelio, reconocida como relevante elemento fisiológico en la microcirculación, podría hallarse incrementada en

TABLA 1. Sujetos control y pacientes diabéticos, con y sin lesiones cutáneas con un *aggregat shape parameter* (ASP) $0,65$ y $< 0,65$

	Pacientes diabéticos con lesiones cutáneas	Pacientes diabéticos sin lesiones cutáneas	Controles
$ASP \geq 0,6522$ (80%)	26 (45%)	0	
$ASP < 0,656$ (20%)	32 (55%)	20	
	28 (100%)	58 (100%)	20 (100%)

De las asociaciones significativas halladas entre el ASP y las distintas categorías de pacientes (diabéticos con y sin lesiones cutáneas y controles) ($p < 0,01$), resultó particularmente destacable la resultante de comparar, con $ASP \geq 0,65$, a los pacientes diabéticos con y sin lesiones en la piel (el 80 frente al 45%; $p = 0,006$).

áreas de baja turbulencia o de endotelios dañados a causa de cambios endoteliales inducidos por isquemia y propagar la lesión isquémica mediante la obstrucción de la microvasculatura.

A nuestro entender, la forma de los agregados no sólo contribuiría a dificultar el flujo sanguíneo sino también a lesionar el endotelio capilar, lo que podría contribuir al inicio de las alteraciones parietales y la disfunción misma de las células endoteliales detectadas en los diabéticos¹⁸.

En resumen, el presente estudio revela:

1. Los pacientes diabéticos con lesiones cutáneas presentan valores promedio de ASP significativamente superiores a los de los controles.

2. En sintonía con ello, el 80% de los pacientes diabéticos con lesiones en la piel y el 45% de quienes no las presentan superan un ASP $\geq 0,65$, con diferencias conspicuas a favor de los primeros. A su vez, el 100% de los controles se halla notoriamente por debajo de dicho punto de corte.

En conclusión, se pone de relieve que la agregación eritrocitaria experimenta alteraciones en pacientes diabéticos, primordialmente en los que presentan lesiones cutáneas.

Desde una perspectiva fisiopatogénica, esto apoya la hipótesis de que parámetros hemorreológicos podrían interactuar con otros mecanismos de lesión vascular parietal en el desarrollo de la microangiopatía diabética y en la aparición de las lesiones cutáneas.

De lo antes citado, y en coincidencia con otras referencias bibliográficas^{18,19}, podría inferirse que el compromiso de la agregación eritrocitaria precedería a la aparición de las lesiones cutáneas y, por consiguiente, a suponer que con el seguimiento y el control de este parámetro, a través del ASP, resultaría posible prevenir las complicaciones microcirculatorias cutáneas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores testimonian su profundo agradecimiento a las integrantes del Grupo de Biometría del Departamento de Matemática de la Facultad de Bioquímica de la Universidad Nacional del Litoral, que dirige la *Magister Scientiarum* en Biometría Elena Carrera, por sus valiosos asesoramientos y aportes que posibilitaron la concreción de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cabo H. Manifestaciones cutáneas de la diabetes mellitus. *Piel*. 1997;11:32-8.
2. Cabo H. Manifestaciones cutáneas de diabetes mellitus. 1.^a ed. Buenos Aires: Ediciones Héctor Macchi; 1996.
3. Huntley AC. Diabetes and the skin. Photoessay and Review *Dermatology On Line Journal*. 1995;1:4.
4. Pérez M, Kohn SR. Cutaneous manifestation of diabetes mellitus. *J Am Acad Dermatol*. 1994;30:519-31.
5. Fong, D, Aiello L, Gardner T, King G, Blankenship G, Cavallerano J, et al. Diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 2004;27:84-7.
6. Ngo BT, Hayes KD, DiMiao DJ, Srinivasan SK, Huerter CJ, Rendell MS. Manifestations of cutaneous diabetic microangiopathy. *Am J Clin Dermatol*. 2005;6:225-37.
7. Salama Benarroch I, Rubinstein de Salama A, Bregni C. Diabetes, hemorreología y microcirculación. Buenos Aires: Akadia;1996.
8. Carrera LI, Etchepare Cuezco R, Foresto P, D'Arrigo M, Valverde J, Rasia R. Hemorreología y diabetes: algunos aportes para la práctica médica. *Revista Médica de Rosario*. 2002;68:45-9.
9. Foresto P, D'Arrigo M, Carrera LI, Etchepare Cuezco R, Valverde J, Rasia R. Evaluation of red cells aggregation by computerized image analysis in diabetes. *Medicina (Buenos Aires)*. 2000;60:570-2.
10. De la Hoz J. Diabetes y complicaciones vasculares de los miembros inferiores, 1999. Disponible en: www.encombolombia.com/cirugia14399diabetes
11. Paron NG, Lambert PW. Cutaneous manifestations of diabetes mellitus. *Primary Care*. 2000;27:371-83.
12. Chien S, Gavisch B, Zhang S, Mahler Y, Yedgar S. Monitoring of erythrocyte aggregate morphology under flow by computerized image analysis. *Biorheology*. 1995;32:487-96.
13. Altman D. Practical statistics for medical research. 8th ed. London: Chapman & Hall; 1997.
14. Ferrán Aranaz M. SPSS para Windows: análisis estadístico. 1.^a ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 2001.
15. Babu N, Singh M. Influence of hyperglycemia on aggregation, deformability and shape parameters of erythrocytes. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2004;31:273-80.
16. Le Devehat C, Vimeux M, Khodabandehlou T. Blood rheology in patients with diabetes mellitus. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2004;30:297-300.
17. Plante GE, Alfred J, Chakir M. The blood vessel, linchpin of diabetic lesions. *Metabolism*. 1999;48:406-9.
18. Tooke JE, Morris SJ, Shore AC. Microvascular functional abnormalities in diabetes: the role of endothelium. *Diabetes Res Clin Pract*. 1996;31:S127-32.
19. Calles-Escandon J, Cipolla M. Diabetes and endothelial dysfunction a clinical perspective. *Endocr Rev*. 2001;22:36-52.