

2. Neuropatía diabética: Estudio morfológico e inmunohistoquímico de las glándulas sudoríparas de la piel glabra

DIABETIC NEUROPATHY: MORPHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF GLABROUS SKIN SWEAT GLANDS

Aitana Melián Virgós

Graduada en Enfermería por la Universidad de Oviedo.

Sara Lueje Alonso

Graduada en Enfermería por la Universidad de Oviedo.

Estela García Suárez

Graduada en Enfermería por la Universidad de Oviedo.

RESUMEN

La neuropatía diabética aparece en el 50% de los pacientes que padecen diabetes tipo II. La literatura apunta a que los individuos con neuropatía pueden sufrir hipohidrosis en la piel de los pies, hecho que condiciona en parte la aparición del pie diabético. Para la realización de este trabajo se han procesado muestras de piel glabra digital de individuos control y otros con neuropatía dolorosa y no dolorosa mediante anticuerpos específicos (S100, α -SMA, EMA, CD34 y TRPV1) con el objetivo de estudiar el número, morfología y patrón proteico básico de las glándulas sudoríparas para profundizar en el conocimiento de esta afección. Los resultados demuestran disminución en el número y desestructuración de las glándulas, que presentan un estrechamiento de la luz de los conductos y alteraciones en la capa muscular; además de detritus, afectando en mayor medida a los pacientes con neuropatía diabética dolorosa. Además, el canal TRPV1, relacionado con la estimulación de la secreción, se expresa menos en los individuos con neuropatía, especialmente la dolorosa.

Palabras clave: Neuropatía diabética, Glándulas sudoríparas, Sistema Nervioso Autónomo.

ABSTRACT

Diabetic neuropathy occurs in 50% of patients with type II diabetes. Literature suggests that individuals with neuropathy may suffer from hypohidrosis in the skin of the feet, a fact that partly conditions the appearance of diabetic foot. For this study, samples of digital glabrous skin from control individuals and others with painful and non-painful neuropathy were processed using specific antibodies (S100, α -SMA, EMA, CD34 and TRPV1) with the aim of studying the number, morphology and basic protein pattern of the sweat glands in order to gain a deeper understanding of this condition. The results show a decrease in the number and deconstruction of the glands, which show a narrowing of the lumen of the ducts and alterations in the muscular layer, as well as detritus, affecting patients with painful diabetic neuropathy to a greater extent. In addition, the TRPV1 channel, which is involved in stimulating secretion, is less expressed in individuals with neuropathy, especially painful neuropathy.

Key words: Diabetic neuropathy, Sweat glands, Autonomic Nervous System.

1. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es un trastorno metabólico que constituye una de las enfermedades crónicas más comunes en todo el mundo. ⁽¹⁾ Además de las muchas consecuencias derivadas del incremento de los niveles de glucosa en sangre, a menudo los pacientes desarrollan complicaciones más graves, entre ellas la neuropatía. ⁽²⁾ Las personas con neuropatía diabética (DPN) presentan una afectación del sistema nervioso periférico, con reducción en la velocidad de la conducción nerviosa, pérdida de las fibras distales y reducción en el diámetro axonal. ⁽³⁾ Los pacientes que sufren neuropatía de fibra fina desarrollan síntomas somáticos y autónomos. Dentro de los síntomas somáticos se incluye entumecimiento, parestesia, hipo o hiperalgesia, alodinia y dolor neuropático; mientras que los autónomos están ligados a la sequedad de ojos y boca, alteración de la movilidad gastrointestinal, variabilidad de la frecuencia cardíaca y sudoración anormal. ⁽⁴⁾

Los trastornos neuropáticos se presentan asociados a la gravedad de la enfermedad y aparecen con mayor preponderancia en los pacientes con más años de evolución. ⁽⁵⁾ A efectos prácticos, en relación con la extremidad inferior y concretamente con el pie y los dedos, se traduce en pérdida de la sensibilidad, dolor o sequedad en la piel. Estudios recientes han demostrado que en la neuropatía diabética la función sudomotora es uno de los marcadores más sensibles que identifican la afectación del sistema nervioso autónomo. ⁽⁶⁾ La hipohidrosis juega un papel importante en el desarrollo del pie diabético ya que, la disminución de la sudoración conlleva un aumento de la temperatura corporal, se produce mayor sequedad en la piel y, por tanto, hay mayor susceptibilidad a las infecciones, aumentando así el riesgo de ulceraciones y necesidad de amputación en las extremidades inferiores. ⁽¹⁾

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, se entiende la importancia de la realización de un estudio en profundidad de las glándulas sudoríparas en los individuos que sufren de neuropatía diabética. Nuestro propósito con este trabajo es estudiar la morfología y patrón proteico básico en las glándulas sudoríparas en la piel de los individuos aquejados de diabetes tipo II con polineuropatía simétrica distal a través del uso de anticuerpos específicos. Además, se investigará si existen variaciones de las glándulas a nivel superficial y profundo en la piel ya que, la afectación nerviosa en la neuropatía va de distal a proximal.

Cabe destacar que se estudiaron 2 grupos de pacientes, con DPN dolorosa y no dolorosa, ya que datos previos de nuestro grupo demostraron que la afectación nerviosa sensitiva somática es mayor en individuos con dolor que sin él y se plantea si la gravedad de la afectación del sistema nervioso somático va pareja a la afectación del sistema autónomo.

La investigación continuada sobre la neuropatía diabética a lo largo de la última década ha descubierto el funcionamiento de muchas de las complejidades relacionadas con esta patología, sin embargo, quedan numerosas incógnitas relacionadas con esta enfermedad tan prevalente en la sociedad actual. Así, este estudio se propone ahondar un poco más en el conocimiento de las alteraciones que padecen los pacientes con neuropatía diabética, en nuestro caso en lo que atañe a la morfología y patrón proteico de las glándulas sudoríparas.

A día de hoy, cada vez más expertos se centran en desarrollar dispositivos no invasivos que utilizan reacciones electroquímicas de la piel para realizar una evaluación objetiva del funcionamiento de las glándulas sudoríparas y utilizar estos resultados como un método de diagnóstico precoz de la neuropatía diabética,⁽⁷⁾ ya que en la actualidad sigue habiendo un retraso en el diagnóstico de esta afección, produciendo en muchos casos el agravamiento de su sintomatología.⁽⁸⁾

2. ESTADO ACTUAL

2.1. Diabetes mellitus: neuropatía diabética

La diabetes mellitus es un trastorno metabólico heterogéneo que se caracteriza, principalmente, por un aumento de glucosa en sangre debido al deterioro de la secreción de insulina, la acción defectuosa de la insulina secretada, la resistencia de los tejidos a la acción de la insulina, o de una combinación de los factores anteriores.⁽⁹⁾ A lo largo de las tres últimas décadas, el número de personas con diabetes mellitus se ha cuadruplicado a nivel mundial alcanzando cifras epidémicas y se prevé que en el año 2045 habrá 629 millones de afectados.⁽¹⁰⁾ La creciente prevalencia de la diabetes mellitus, especialmente la de tipo 2, está fuertemente ligada al aumento de la obesidad, tanto en los países desarrollados como en los que se encuentran en vías de desarrollo. Por otro lado, un estilo de vida sedentario es uno de los puntos clave que pueden explicar el aumento de esta afección que constituye, en la actualidad, la novena causa de muerte en el mundo.⁽¹¹⁾

La neuropatía diabética es una de las complicaciones crónicas más frecuentes en pacientes que padecen diabetes mellitus y se caracteriza por una pérdida de la función sensorial que comienza distalmente de manera gradual o insidiosa (a menudo en las extremidades inferiores) y progresa en sentido proximal produciendo un dolor neuropático incapacitante que se describe como quemante, lacerante y con frecuentes exacerbaciones durante el reposo. Se estima que, con el tiempo, al menos el 50% de las personas con diabetes acaban desarrollando una neuropatía diabética.⁽⁸⁾ Asimismo, es una de las principales causas de amputación de los miembros inferiores, hecho que tiene un efecto muy negativo sobre la calidad de vida de la persona y se asocia con una expectativa de vida bastante baja (en promedio, solo 2 años desde la amputación).⁽¹²⁾

Esta patología presenta un amplio rango de manifestaciones clínicas y de estadios de gravedad, que se pueden clasificar en función del tipo de nervio afectado (sensitivo, motor o autónomo), el lugar de la lesión nerviosa (focal, multifocal o generalizada) y el curso temporal de la enfermedad (aguda o crónica).⁽¹³⁾ La manifestación neuropática más común es la polineuropatía simétrica distal que puede provocar alteraciones sensoriales, entre las cuales se encuentra la disminución de la capacidad de detección de frío y calor y de la sensibilidad táctil, de forma que los pacientes son propensos a sufrir lesiones en los pies. La afectación del sistema nervioso comienza con las fibras finas (nociceptivas y del sistema autónomo) y después se extiende a las fibras gruesas. A nivel axonal se caracteriza por la reducción de la velocidad de conducción de los estímulos, pérdida de fibras distales y reducción de diámetro axonal.⁽³⁾

La disfunción autónoma presenta signos y síntomas relacionados con las distintas funciones controladas por el sistema nervioso autónomo tales como la contractibilidad del corazón y los vasos sanguíneos, la motilidad intestinal, el correcto funcionamiento de la vejiga o la función pupilar, eréctil y sudomotora.^(14, 15)

Para su diagnóstico se encuentran disponibles varias técnicas que pueden complementar la evaluación clínica; pero, aun así, la neuropatía sensoriomotora crónica suele tener un diagnóstico tardío, cuando ya se ha producido una lesión nerviosa irreparable. Además, los tratamientos para esta afección son limitados: solo el control estricto de la glucosa en la diabetes tipo 1 tiene evidencia sólida de reducir el riesgo de desarrollar neuropatía diabética. Sin embargo, ni el control de la glucosa ni los tratamientos patogénicos son efectivos en la neuropatía diabética periférica dolorosa, y los tratamientos sintomáticos no suelen ser adecuados.⁽¹⁶⁾

2.2. Glándulas sudoríparas

Los seres humanos tenemos 4 millones de glándulas sudoríparas exocrinas, que a su vez se pueden clasificar en glándulas ecrinas y glándulas apocrinas.⁽¹⁷⁾ En general se pueden clasificar las glándulas sudoríparas como:

- Glándulas apocrinas, son de gran tamaño y se activan, normalmente, después de la pubertad ya que se encuentran principalmente en las axilas, el monte de Venus, la región externa del meato auditivo, las areolas y la zona perianal. Las glándulas apocrinas secretan sudor con proteínas y sustancias químicas lipofílicas, como las feromonas y los esteroides. Es por esto por lo que la excitación sexual y el estrés emocional ya sea ansiedad, dolor o miedo desencadenan la secreción de este tipo de glándulas que están mediadas por el sistema límbico. En la piel, se encuentran en la grasa subcutánea profunda de la capa dérmica y están compuestas exclusivamente de células mioepiteliales que forman un glomérulo de túbulos secretores y un conducto excretor que desemboca en el folículo piloso.⁽¹⁷⁾
- Glándulas ecrinas, componen alrededor del 90% de las glándulas sudoríparas corporales y tienen una amplia distribución, encontrándose sobre todo en las palmas de las manos y las plantas de los pies, y son, por tanto, el objeto de estudio de este trabajo fin de grado. Este tipo de glándulas están involucradas en la termorregulación. Las glándulas ecrinas están formadas por un conducto excretor que llega a la superficie de la piel y un glomérulo secretor en la dermis.⁽¹⁷⁾
 - El ducto está formado por: células basales (externas) y células luminales (internas).⁽¹⁸⁾
 - El glomérulo secretor está formado por tres tipos de células: claras, oscuras y mioepiteliales.⁽¹⁹⁾ Las células claras poseen una intrincada membrana basal, entre ellas se forman canalículos que se abren al lumen, tienen gran cantidad de mitocondrias y villi, y son las células secretoras principales. Las células oscuras se caracterizan por tener muchos gránulos electro- densos y ayudan a las células claras en su labor secretora.⁽²⁰⁾ Las célu-

las mioepiteliales se sitúan sobre la membrana basal y proporcionan apoyo a la pared del glomérulo contra la presión hidrostática luminal, que se incrementa durante la sudoración.⁽²⁰⁾

El Sistema Nervioso Central y el Sistema Nervioso Autónomo regulan la secreción del sudor a través de la liberación de neurotransmisores como la acetilcolina y la noradrenalina. Así, las glándulas sudoríparas ecrinas están inervadas por fibras nerviosas colinérgicas y adrenérgicas amielínicas sudomotoras.⁽²¹⁾

La función de las glándulas sudoríparas es generar el sudor. La producción de sudor y la evaporación de éste juegan un papel fundamental en la termorregulación corporal. Esto es aún más evidente cuando la capacidad de sudar se ve comprometida durante periodos de trabajo físico fatigante y/o exposición a ambientes especialmente calurosos, ya que el estrés por calor puede llegar a producir un golpe de calor si no se proporcionan medios alternativos de enfriamiento corporal.⁽²¹⁾ Además, a través de la eliminación del sudor, las glándulas sudoríparas median en funciones fisiológicas tales como la liberación de productos de desecho metabólicos, la eliminación de exceso de micronutrientes y sustancias tóxicas del cuerpo y actuar como mecanismo de respuesta ante el estrés emocional.⁽²²⁾

2.3. Neuropatía diabética: relación con las glándulas sudoríparas

La hiperglucemia a largo plazo aumenta el riesgo de padecer neuropatía. Los pacientes que sufren neuropatía de fibras finas pueden cursar con afectación del sistema nervioso somático y del autónomo. La neuropatía diabética que afecta al sistema nervioso autónomo conlleva una disfunción de las terminaciones nerviosas autónomas inhibiendo la liberación de neurotransmisores a las glándu-

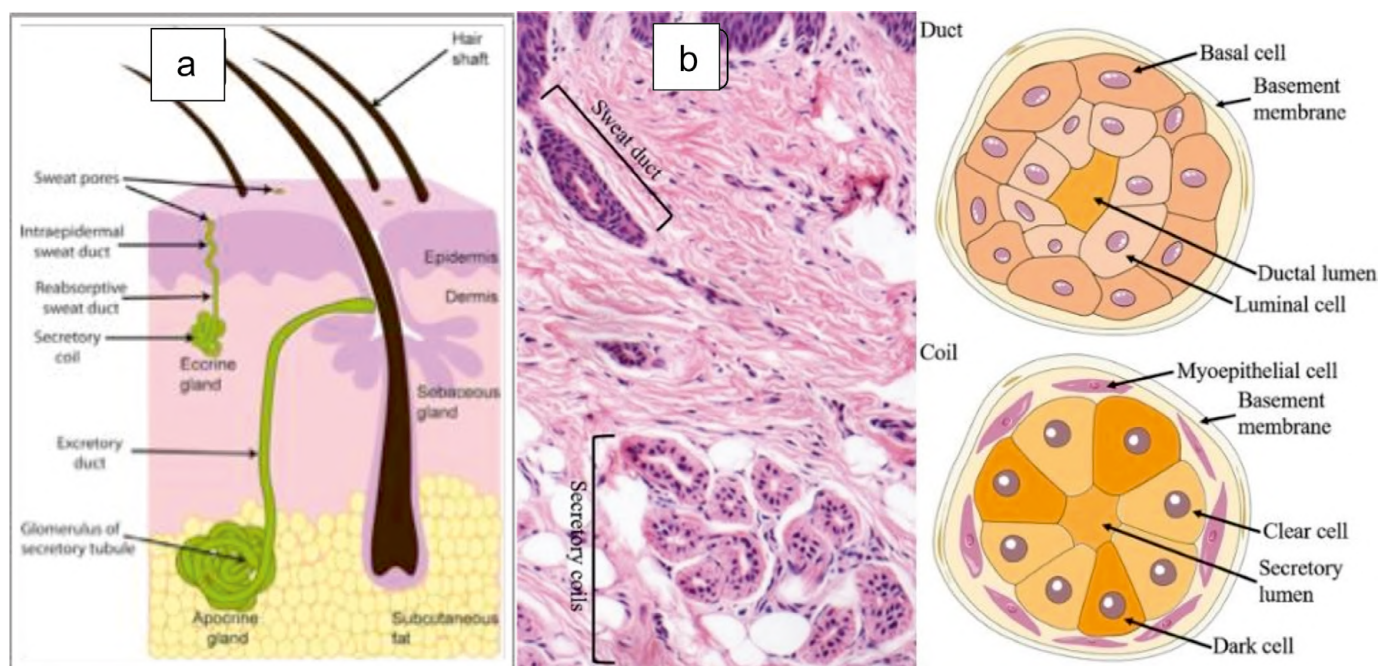


Figura 1. a. Morfología básica de las glándulas sudoríparas. (Fuente: Hu, Y., Converse, C., Lyons, M. C., & Hsu, W. H. Neural control of sweat secretion: a review. *The British journal of dermatology*. 2018; 178(6): 1246–1256. <https://doi.org/10.1111/bjd.15808>).⁽⁷⁾ b. Estructura y tipos celulares de las glándulas sudoríparas ecrinas (Fuente: Lin, Y., Chen, L., Zhang, M., Xie, S., Du, L., Zhang, X., & Li, H. Eccrine Sweat Gland and Its Regeneration: Current Status and Future Directions. *Front Cell Dev Biol*. 2021; 9: 667765. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.667765>).⁽¹⁸⁾

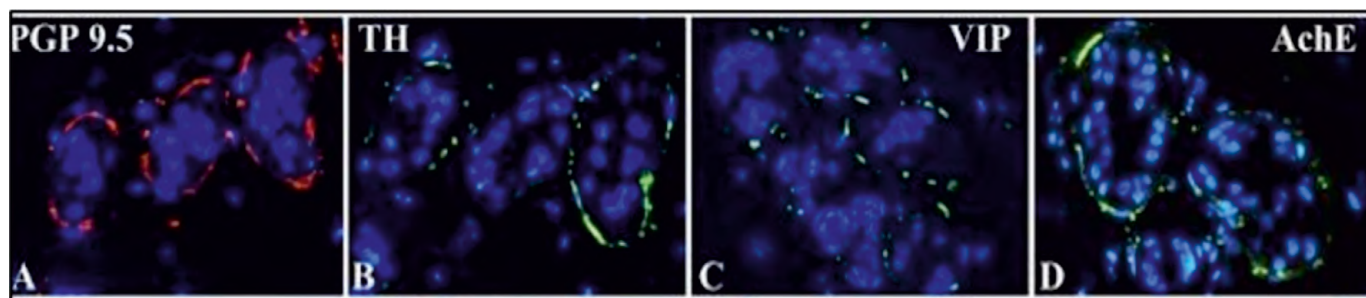


Figura 2. Inervación simpática en glándulas sudoríparas ecrinas nativas en la piel. Imágenes representativas de la tinción inmunofluorescente para el marcador general de fibras nerviosas PGP 9.5 (a), el marcador de fibras nerviosas adrenérgicas TH (b) y los marcadores colinérgicos de fibras nerviosas VIP (c) y AChE (d) (Fuente: Zhang, M., Li, H., Chen, L., Fang, S., Xie, S., & Lin, C. Three-dimensional reconstructed eccrine sweat glands with vascularization and cholinergic and adrenergic innervation. *Journal of molecular histology*. 2018; 49(4): 339–345. <https://doi.org/10.1007/s10735-018-9773-4>).⁽²¹⁾

las sudoríparas. (23) Esta es una de las principales causas de sudoración anormal, ya sea generando hipohidrosis o hiperhidrosis. (12) En el caso de los pies, la disfunción sudomotora está asociada a la sequedad en la piel, hecho que se relaciona con un aumento en el riesgo de padecer ulceraciones y con una cicatrización deficiente de las heridas en estos individuos. (24)

Estudios previos realizados en humanos demostraron una disminución de la inervación en las glándulas sudoríparas de pacientes afectados por neuropatía que cursaban con anhidrosis y una pérdida de volumen de las glándulas sudoríparas tras un año o más de evolución. (25) Mediante la técnica de microscopía confocal se demostró la disminución de la inervación en las glándulas sudoríparas en los individuos con neuropatía periférica relacionada con el alcohol. (26)

Respecto a la neuropatía diabética, con posterioridad, en modelos murinos se comprobó que la inervación autonómica de las glándulas sudoríparas en las almohadillas plantares se reduce significativamente en los ratones diabéticos y que estos animales formaban menos gotas de sudor.⁽²⁷⁾ Desde el 2019 se ha demostrado en humanos que la diabetes mellitus se asocia con una reducción significativa de la sudoración que, puede afectar gravemente a la capacidad de disipar el calor en momentos de cargas térmicas altas llegando incluso a producir intolerancia al calor.⁽²²⁾

La hipohidrosis es una afección en la que se produce una disminución de la sudoración en respuesta a estímulos apropiados, de manera que puede dar lugar a hipertermia, agotamiento por calor, golpe de calor o, incluso, muerte. Su manifestación más extrema se denomina anhidrosis, que es la ausencia total de sudoración, con

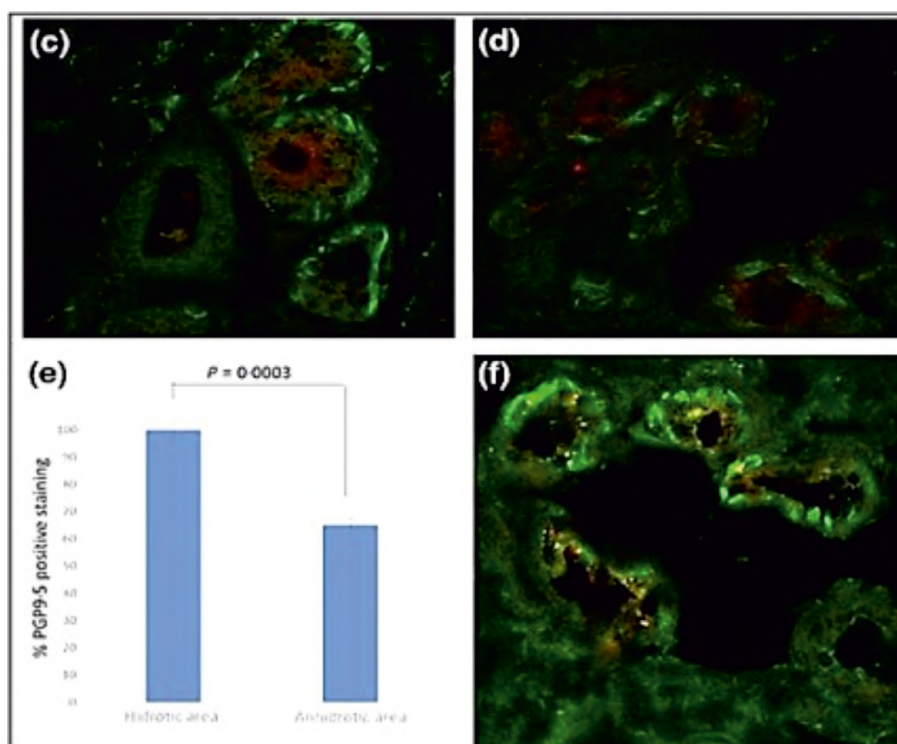


Figura 3. Cuantificación de las fibras nerviosas presentes en las glándulas sudoríparas ecrinas mediante microscopía confocal de un paciente con neuropatía periférica (Fuente: Nakamura, M., Namiki, T., Munetsugu, T., Hashimoto, T., Fujimoto, T., & Yokozeki, H. Image Gallery: Acquired anhidrosis associated with alcohol-related peripheral neuropathy, a potential cause of anhidrosis due to reduced innervation of eccrine glands. *The British journal of dermatology*. 2019; 180(2): 35. <https://doi.org/10.1111/bjd.17247>).⁽²⁶⁾

Tabla 1. Condiciones y medicamentos que alteran la función de las glándulas sudoríparas. (Fuente: Baker. L.B. Physiology of sweat gland function: The roles of sweating and sweat composition in human health. Temperature. 2019; 6(3): 211-259. <https://doi.org/10.1080/23328940.2019.1632145>) (22).

Condiciones y medicamentos	Momento	Efecto sobre la tasa de sudoración y/o composición del sudor
Diabetes Mellitus	Crónico	Sudoración reducida con T1DM y T2DM; mecanismos potenciales relacionados con la neuropatía autonómica y la reducción de la termosensibilidad, reducción de la tasa de sudoración máxima y/o menor número de glándulas sudoríparas activas; deterioro de la capacidad para disipar el calor, especialmente durante cargas térmicas más altas y en personas con un nivel de condición física más bajo.

la consecuente sequedad de la piel. Recientes estudios realizados mediante biopsias de la piel de pacientes diabéticos con síndrome anhidrótico muestran que las fibras nerviosas presentan un engrosamiento en forma de huso y fragmentación en la zona adyacente a las glándulas sudoríparas. Esta anomalía morfológica produce una pérdida de sensibilidad a la temperatura debida a la disfunción de las terminaciones nerviosas, que son incapaces de liberar los neurotransmisores adecuados para estimular a las glándulas sudoríparas. ⁽¹²⁾

Más recientemente, la diabetes se ha relacionado con alteraciones en la regulación de la temperatura durante la exposición al estrés térmico. Aunque sigue siendo un nuevo campo de investigación, el tema de la diabetes y la exposición al calor ha cobrado especial interés a raíz del cambio climático y la creciente prevalencia de las olas de calor. De hecho, se ha constatado que las personas con diabetes de tipo 1 y 2 son especialmente vulnerables durante los epi-

sodios de calor extremo, incrementando con creces el número de hospitalizaciones y defunciones durante estos periodos de tiempo. Las recomendaciones de actividad física publicadas más recientemente para las personas con diabetes destacan su susceptibilidad a los episodios adversos relacionados con el calor y advierten contra el esfuerzo físico en caso de altas temperaturas. ⁽²⁸⁾

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

La literatura apunta a que los individuos con neuropatía diabética pueden sufrir hipohidrosis en la piel de los pies. Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, cabría esperar que las glándulas sudoríparas de estos enfermos presenten cambios profundos en su morfología, número o patrón de expresión proteico. Sin embargo, no abundan

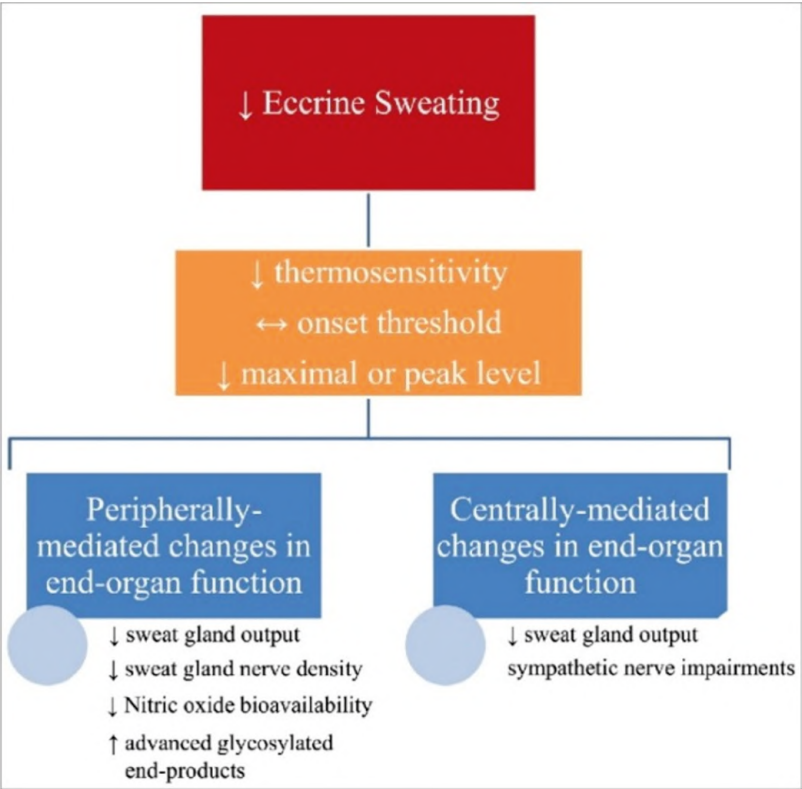


Figura 4. La Diabetes Mellitus tipo 1 y tipo 2 se asocian con alteraciones en la sudoración ecrina que conducen a una marcada reducción en la capacidad de disipar el calor. Esto se explica principalmente por una termosensibilidad reducida y un nivel máximo o meseta más bajo de sudoración sin cambios en el umbral de inicio. Los mecanismos aún no se han entendido por completo; sin embargo, hay evidencia de cambios mediados central y periféricamente en el funcionamiento de las glándulas sudoríparas. (Fuente: Glen P. Kenny, Ronald J. Sigal & Ryan McGinn. Body temperature regulation in diabetes. Temperature 2016; 3(1): 119-145, <https://doi.org/10.1080/23328940.2015.1131506>). ⁽²⁹⁾

los datos sobre los cambios que sufren las glándulas sudoríparas en estos pacientes más allá del conocimiento sobre la pérdida de inervación vegetativa en las mismas.

Por tanto, en el presente estudio se han planteado los siguientes objetivos generales y específicos:

3.2. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es profundizar en el conocimiento de la neuropatía diabética estudiando el número, morfología y patrón de inmunomarcaje para los anticuerpos seleccionados (EMA, CD34, S100P, α -SMA y TRPV1), en las glándulas sudoríparas de la piel glabra de los pies de los individuos con neuropatía diabética. Así, como aportar datos sobre las diferencias entre la neuropatía no-dolorosa y dolorosa; y su posible relación con la severidad de la enfermedad.

3.3. Objetivos específicos

1. Estudiar la morfología e histología de las glándulas sudoríparas en los individuos control y con neuropatía diabética dolorosa y no dolorosa con la tinción de HE y la inmunotinción de CD34 que identifica la membrana basal.
2. Estudiar el patrón de inmunomarcaje de los anticuerpos EMA (Antígeno epitelial de membrana), α -SMA (α -actina de músculo liso), S100P (proteína S100) y TRPV1 (receptor de potencial transitorio V1) en las glándulas sudoríparas de la piel glabra del dedo del pie de los diferentes grupos a estudio: control, neuropatía diabética dolorosa y no dolorosa.
3. Cuantificación del número de ductos (S100P positivos) y el número de glomérulos (α -SMA positivos) en los individuos control y los grupos con DPN dolorosa y no dolorosa.

4. MATERIAL Y TÉCNICAS

4.1. Material

Para la realización del presente estudio se han utilizado muestras de piel glabra digital humana de la cara palmar de la falange distal del primer dedo del pie de sujetos no dia-

béticos (n=10) obtenidas mediante autopsias rutinarias; y de sujetos con neuropatía diabética extraídas mediante amputación. Ambos grupos a estudio presentaban una edad comprendida entre 40 y 80 años. (Tabla 2)

Este material fue obtenido del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Central de Asturias (Oviedo) y del Servicio de Cirugía Vascular del Hospital de Jove (Gijón), de acuerdo con el cumplimiento de la legislación española (RD 1301/2006; Ley 14/2007; RD 1716/2011; Orden ECC/1404/2013), firmado previo consentimiento en el que se incluye la posibilidad de abandono del estudio y conforme a las directrices de la declaración de Helsinki II.

En el caso del grupo de los sujetos enfermos, antes de la amputación del miembro se llevaron a cabo una serie de pruebas:

- Test de monofilamento para valorar la sensibilidad del paciente.
- Test de capacidad de discriminación de dos puntos con el objetivo de conocer la capacidad discriminativa tanto en los dedos como en la planta del pie y así poder compararlos con los individuos de control. De esta manera somos capaces de explicar la existencia o no de diferencias en los vasos, nervios y el patrón de expresión de los anticuerpos a estudio.
- En los individuos con dolor neuropático se realizó el test DN4, el cual permite conocer la tipología de este, así como su distribución.

Por último, cabe destacar que todas las muestras se fijaron en una solución de formaldehído al 10% en PBS 1M (pH 7,6) durante 24-72 horas, orientadas de forma perpendiculares a la superficie cutánea, deshidratadas y procesadas para inclusión rutinaria en parafina. Además de esto, los bloques se cortaron en secciones de 10 micras de espesor y se montaron en portaobjetos gelatinizados.

4.2. Técnicas

a. Técnicas morfológicas

Todas las muestras fueron desparafinadas mediante dos pases de Xilol (20 minutos cada uno) y por una batería de

Tabla 2. Muestra de individuos con Diabetes Mellitus incluidos a estudio.

EDAD	SEXO	TIPO NEUROPATÍA	TEST MONOFILAMENTO	CAPACIDAD DISCRIMINATORIA 2 PUNTOS	DN4 PARA DOLOR NEUROPÁTICO
58	varón	diabética/isquémica	positivo (1 punto dedo 5 insensible)	a 7cm en planta	descargas eléctricas, hormigueo, no dolor al roce
55	varón	diabética/isquémica	positivo (1 punto dedo 1 insensible)	a 4cm en planta	no dolor
76	varón	diabética/isquémica	positivo (2 ptos insensibles; dedos 2 y 3)	a 4cm en planta	no dolor
62	varón	diabética/isquémica	positivo (4 puntos insensibles)	no discrimina	descargas eléctricas, no dolor al roce
84	varón	diabética/isquémica	negativo	a 5cm en planta	no dolor
48	varón	diabética	negativo	a 1cm en planta	descargas eléctricas
75	varón	diabética	positivo (1 punto insensible 5 dedo)	a 3 cm en planta	picação; dolor causado/incrementado por ROCE
70	varón	isquémico	-	-	-
63	varón	diabética/isquémica	negativo	a 4 cm en planta	no dolor
81	mujer	diabética	negativo	a menos de 1cm en planta	no dolor
64	varón	diabética	positivo (4 puntos insensibles)	no discrimina	no dolor

etanoles de gradación decrecientes (10 minutos cada uno) hasta agua corriente (20 minutos).

Hematoxilina-Eosina

Las secciones rehidratadas se introdujeron en Hematoxilina de Harris durante 10 minutos. A continuación, se lavaron con agua corriente y se pasaron 5 segundos por agua ácida (con ácido acético glacial) y, posteriormente, en una solución de Eosina durante 30 segundos.

Por último, las secciones se volvieron a lavar con agua corriente, se deshidrataron en una batería de alcoholes etílicos de concentraciones crecientes, se diafanizaron en Xilol y se montaron con Entellan®.

b. Inmunohistoquímica simple mediante método indirecto de PAP

Las secciones desparafinadas y rehidratadas se trataron con H₂O₂ al 3% durante 10 minutos para bloquear la actividad peroxidasa endógena, seguido de un lavado en tampón PBS (Phosphate Buffered Saline) 1M a pH 7.6 con Tween-20 al 0.5% (PBS-T). A continuación, se realizó el bloqueo de las uniones inespecíficas incubando las secciones durante 30 minutos con suero bovino fetal (BSA) al 20%.

Posteriormente, las secciones fueron incubadas toda la noche a 4°C en una cámara húmeda con los anticuerpos primarios que se incluyen en la Tabla 3.

Tabla 3. Anticuerpos primarios usados, dilución y proveedor.

Anticuerpo	Origen	Dilución	Proveedor
TRPV1	Mouse	1:200	Alomone
S100	Mouse	1:1500	Dako
Alfa-actina	Mouse	Prediluido	Leica
EMA	Mouse	Prediluido	Leica
CD34	Mouse	Prediluido	Leica

Los diferentes componentes celulares de las glándulas sudoríparas se identifican con:

- EMA: identifica el lumen de las glándulas. (30)
- S100P: positiva para los ductos de las glándulas sudoríparas. (31)
- α-SMA: marca las células mioepiteliales de los glomérulos.
- TRPV1: anticuerpo positivo para las glándulas relacionado con estimulación de secreción. (32)
- CD34: anticuerpo positivo para las membranas basales de las glándulas.

Tras ser incubados con los anticuerpos primarios, se lavaron las muestras en PBS-T durante 20 minutos y, después, se dejaron incubando 90 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (EnVision® labelled polymer-HR anti-conejo IgG en el caso de la S100 o de IgG anti-ratón para

la Enolasa). Por último, tras un lavado en PBS-T, se reveló la inmunorreacción con una solución 3-3' diaminobencina (DAB, kit de revelado Dako).

Las secciones se lavaron con agua, se deshidrataron en una batería de alcoholes etílicos en concentraciones crecientes, se diafanizaron en Xilol y se montaron con Entellan®. Las preparaciones se fotografiaron en un microscopio óptico Nikon Eclipse 80i acoplado a una cámara Nokia DS-5M.

Los controles de la especificidad de la inmunorreacción se realizaron por exclusión del anticuerpo primario o por incubación con suero de conejo no inmune en lugar del anticuerpo primario. En ambos casos el inmunomarcaje fue completamente abolido.

c. Doble inmunohistoquímica con microscopia confocal

Las muestras se desparafinaron y se rehidrataron. A continuación, se trataron con una solución de BSA al 1% en PBS durante 30 minutos y lavadas 20 minutos en PBS-T. Seguidamente, fueron incubadas con una mezcla 1:1 de los dos anticuerpos primarios seleccionados CD34 y TRPV1 (para la detección simultánea de dos antígenos, inmunohistoquímica doble) durante toda la noche, a 4° C en cámara húmeda. Tras lavar las preparaciones con PBS-T durante 30 minutos, los cortes se incubaron con los anticuerpos secundarios durante 90 minutos: primero con Alexa Flúor 488 (Invitrogen, Paisley, Reino Unido), después con IgG de cabra anti- conejo a una dilución 1:200 en PBS; y a continuación con Cy3, IgG de asno anti-ratón (Jackson Immunoresearch Laboratories, Pensilvania, USA), diluido 1:50 en PBS. Para realizar el método simple se omitió este último paso. La incubación con los anticuerpos secundarios se llevó a cabo en cámara oscura húmeda a temperatura ambiente.

Entre las dos incubaciones y a posteriori, se realizó un lavado en PBS-T. Las preparaciones fueron montadas con Fluoromount-G (Southern-Biotech, Alabama, USA). La inmunofluorescencia fue detectada usando un microscopio automático de fluorescencia Leica DMR-XA acoplado a un software de Captación de Fluorescencia Leica Qfluoro (Servicio de Proceso de Imágenes, Universidad de Oviedo). Los controles de la especificidad de la reacción consistieron en omitir el anticuerpo primario, el secundario y ambos. Además, se llevaron a cabo controles adicionales con el fin de confirmar la ausencia de procesos de autofluorescencia del tejido o producidos por el proceso de fijación.

d. Análisis cuantitativo

En secciones completas de piel glabra de individuos de cada grupo a estudio (control, neuropatía mixta dolorosa y neuropatía mixta no dolorosa) procesadas para la detección de S100P, positiva para los ductos de las glándulas sudoríparas, y α-SMA, que marca las células mioepiteliales de los glomérulos.

La cuantificación se realizó sobre tres campos al azar de microscopía óptica a 10x aumentos tanto en la dermis superficial (desde la capa basal de la epidermis hasta la base

de las papilas dérmicas) como en la dermis profunda (capas más profundas de la dermis e hipodermis).

5. RESULTADOS

5.1. Análisis morfológico de las glándulas con la tinción Hematoxilina-eosina y expresión de CD34 en los tres grupos a estudio

La tinción de Hematoxilina-eosina permitió observar la morfología de las glándulas del grupo control, así como de los pacientes con DPN dolorosa y no dolorosa. Asimismo, el anticuerpo CD34 permite marcar las membranas basales de las glándulas con el fin de identificarlas mejor (ver Figura 5). El grupo control presenta unos glomérulos bien definidos, con una luz delimitada en su interior (Figura 5, a,d). La lámina basal que rodea tanto los glomérulos como los ductos es positiva para el anticuerpo CD34. La inmunorreacción fue de gran intensidad en la propia lámina, y con una continuidad visible alrededor de las glándulas (ver Figura 5, d), así como en los vasos sanguíneos que se encuentran alrededor de las mismas. Los individuos con neuropatía presentan cambios similares en ambos grupos, los glomérulos presentan una morfología más aberrante (ver Figura 5, b,c), un aspecto edematoso en los pacientes con dolor (ver Figura 5, c) y, en ambos casos, es llamativa la presencia de detritus (señalados con las flechas en naranja) en la luz de los glomérulos (Figura 5, b,c), en algunos casos llegando a quedar totalmente obturados (flechas en Figura 5, e y f). Respecto al inmunorreacción para CD34 evidencia una membrana basal más discontinua y peor conservada (Figura 5, e,f).

5.2. Expresión de EMA, alfa-actina y S100 en las glándulas sudoríparas de la piel glabra del dedo del pie de los diferentes grupos a estudio: control, neuropatía diabética dolorosa y no dolorosa

Los anticuerpos utilizados son específicos para diferentes componentes celulares de las glándulas, de manera que nos permiten diferenciar ductos y glomérulos.

1. EMA se expresa en la luz de los glomérulos de las glándulas sudoríparas. Además, la presencia de esta proteína está relacionada con el estado secretor de la glándula.
2. S100P se utiliza en este estudio como marcador de los ductos de las glándulas sudoríparas.
3. α -SMA aparece en las células mioepiteliales de los glomérulos.

En primer lugar, la inmunorreacción para el anticuerpo EMA fue muy específica en el grupo control, permitiendo observar el epitelio de membrana que da a la luz de los glomérulos (Figura 6, a). Esta reacción es un poco más difusa en los pacientes con neuropatía diabética no dolorosa, con una desaparición del inmunomarcaje en algunas zonas del epitelio (Figura 6, b). Respecto al grupo de DPN dolorosa, presenta una reacción inespecífica y difusa del anticuerpo EMA (Figura 6, b), se observan gran cantidad de acumulaciones de detritus en la luz de los glomérulos y ductos (Figura 6, c), llegando en algún caso a producir una obstrucción total (Flecha figura 6, c).

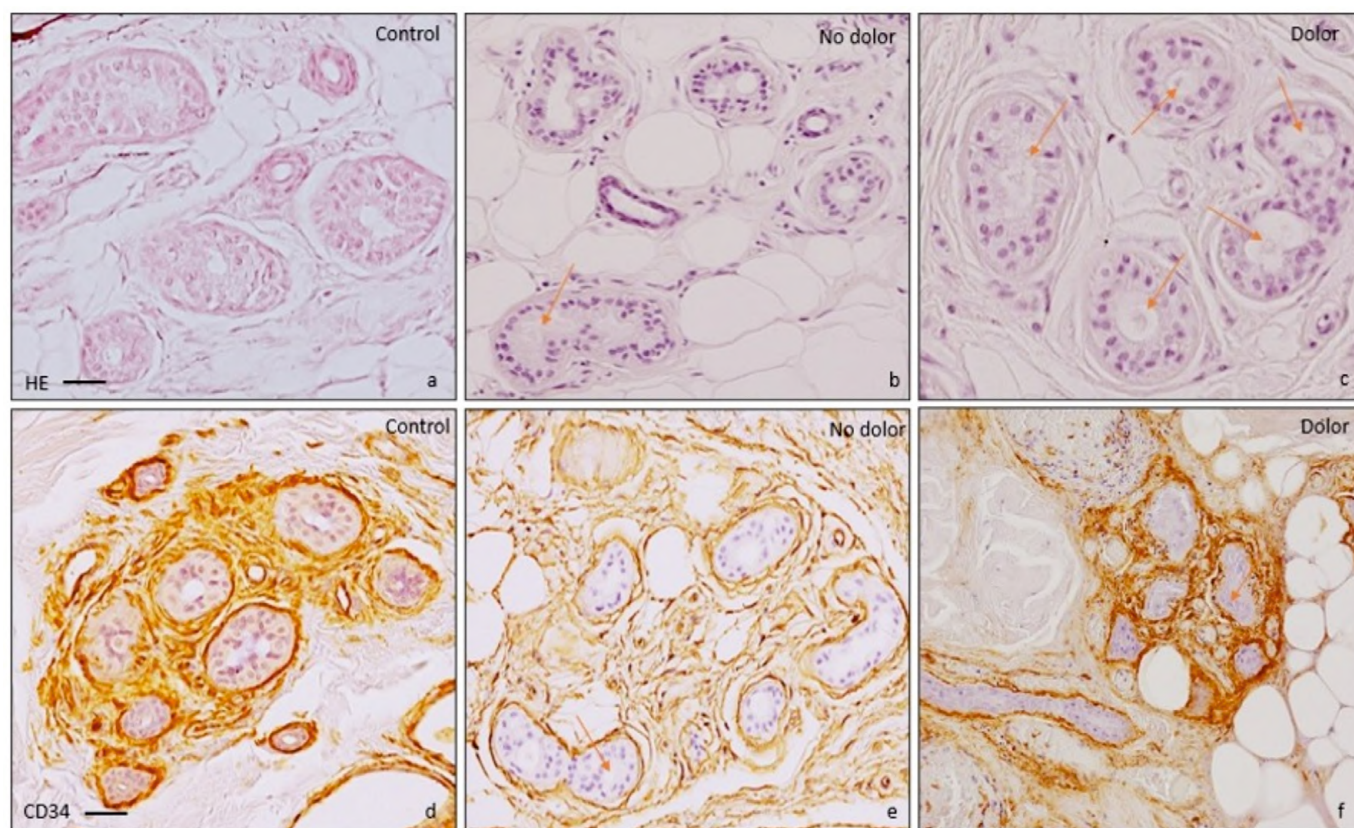


Figura 5. Glándulas sudoríparas la tinción HE (a-c) y la inmunotinción con CD34 para membranas basales (d-f) en la piel glabra del dedo del pie de adultos control y con DPN dolorosa y no dolorosa. Se observa una alteración de la morfología de los glomérulos en los pacientes con DPN y una acumulación de detritus en la luz (flechas en b,c) y obturación de los mismos (flechas en e,f). Aumento: 20 $\times$. Barra de escala: 20 μ m.

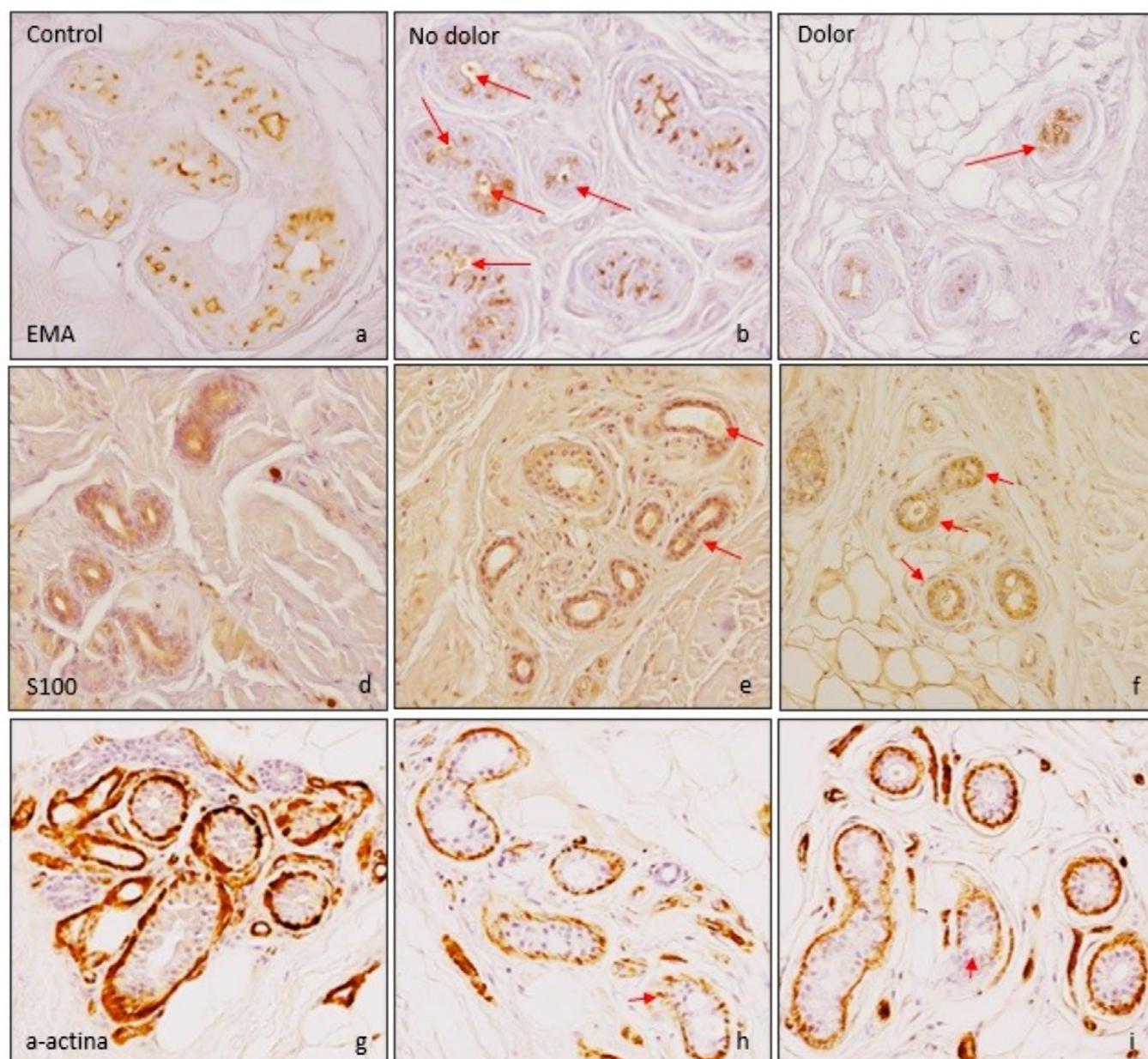


Figura 6. Estudio inmunohistoquímico para la proteína EMA (a-c), S100 (d-f) y α -SMA (g-i) de las glándulas sudoríparas en la piel de adultos control y con DPN dolorosa y no dolorosa. La mayoría de los glomérulos y ductos de los pacientes con neuropatía mostraron acúmulos de detritus en la luz (flechas rojas b,c,e y f). Disrupción de la inmunorreacción con α -SMA en los individuos con neuropatía diabética (flechas h,e,i). Aumento: 20 $\times$. Barra de escala: 20 μ m.

El anticuerpo S100 permite observar los ductos o porción excretora de las glándulas sudoríparas, que conducen los productos de secreción hacia la superficie. Los tres grupos a estudio presentan un marcaje positivo para esta proteína (Figura 6, d-f), aunque existe una disminución de la intensidad de inmunorreacción en los ductos de los pacientes con neuropatía dolorosa; además, las células S100 positivas tienen una apariencia edematosa. Asimismo, de nuevo se observan grandes acumulaciones de detritus que llegan a ocupar casi la totalidad de la luz de los ductos, por lo que parece razonable pensar que existe una obstrucción casi completa de los mismos (Flechas figura 6, e,f).

Por último, la inmunorreacción α -SMA fue mucho más intensa en el grupo control, presentando una capa gruesa de células mioepiteliales que rodean las glándulas (Figura 6, g), mientras que en los pacientes con neuropatía la intensidad es menor y en algunos casos, no existe una continuidad de

células mioepiteliales en la parte externa (Flechas Figura 6, h,e,i).

5.3. Cuantificación del número de glomérulos α -SMA positivos y del número de ductos S100P positivos en la dermis en los individuos control y los grupos con DPN dolorosa y no dolorosa

Se realizó un análisis cuantitativo diferenciando entre los glomérulos (α -SMA positiva) y los ductos (S100 positivos). Como se puede observar en el gráfico de barras, existe una diferencia significativa en el número de ductos (S100 positivos) y glomérulos (α -SMA positiva) entre los individuos con neuropatía y los individuos controles. En lo referente a los ductos desaparecen prácticamente el 75% de ellos, sin existir diferencias entre el grupo de la neuropatía dolorosa y no dolorosa. Los glomérulos están más afec-

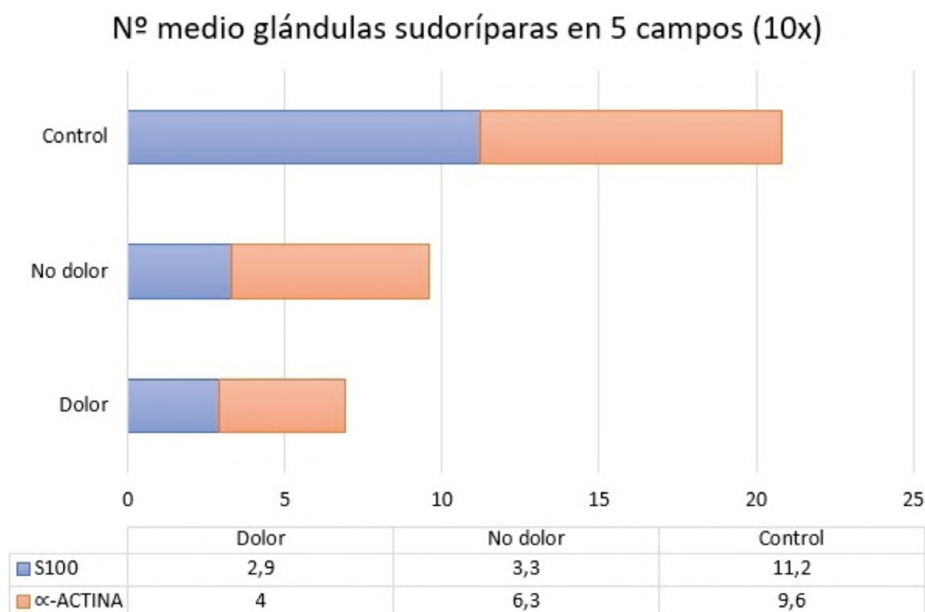


Figura 7. Estudio cuantitativo de los glomérulos y los ductos de glándulas sudoríparas de pacientes con neuropatía diabética y controles. La gráfica de barras muestra que se produce un descenso significativo en el número de ductos (S100, barras azules) y glomérulos (α -SMA, barras naranjas).

tados en la neuropatía dolorosa, con una disminución de aproximadamente el 58% frente al 35% de la no dolorosa (Figura 7).

5.4. Expresión del canal iónico TRPV1 mediante inmunohistoquímica simple y doble inmunofluorescencia con microscopía confocal en el grupo control y en los pacientes con DPN dolorosa y no dolorosa

El TRPV1, es un canal iónico mecanosensible incluido en la familia de los TRP (Transient Potential Receptor).⁽³³⁾ Su dis-

tribución tisular es amplia y aparece en las glándulas salivares relacionándolo con la estimulación de la secreción salivar.⁽³²⁾ En este trabajo se utilizó el TRPV1 para comprobar si existe un cambio de expresión asociado a la neuropatía ya que los mecanismos de secreción de las glándulas salivares son similares a las glándulas sudoríparas.⁽³⁴⁾

La inmunohistoquímica simple muestra un marcaje intenso para TRPV1 en las glándulas y los ductos de los individuos sanos (Figura 8, a), mientras que en los individuos con neuropatía se produce una disminución de la inmu-

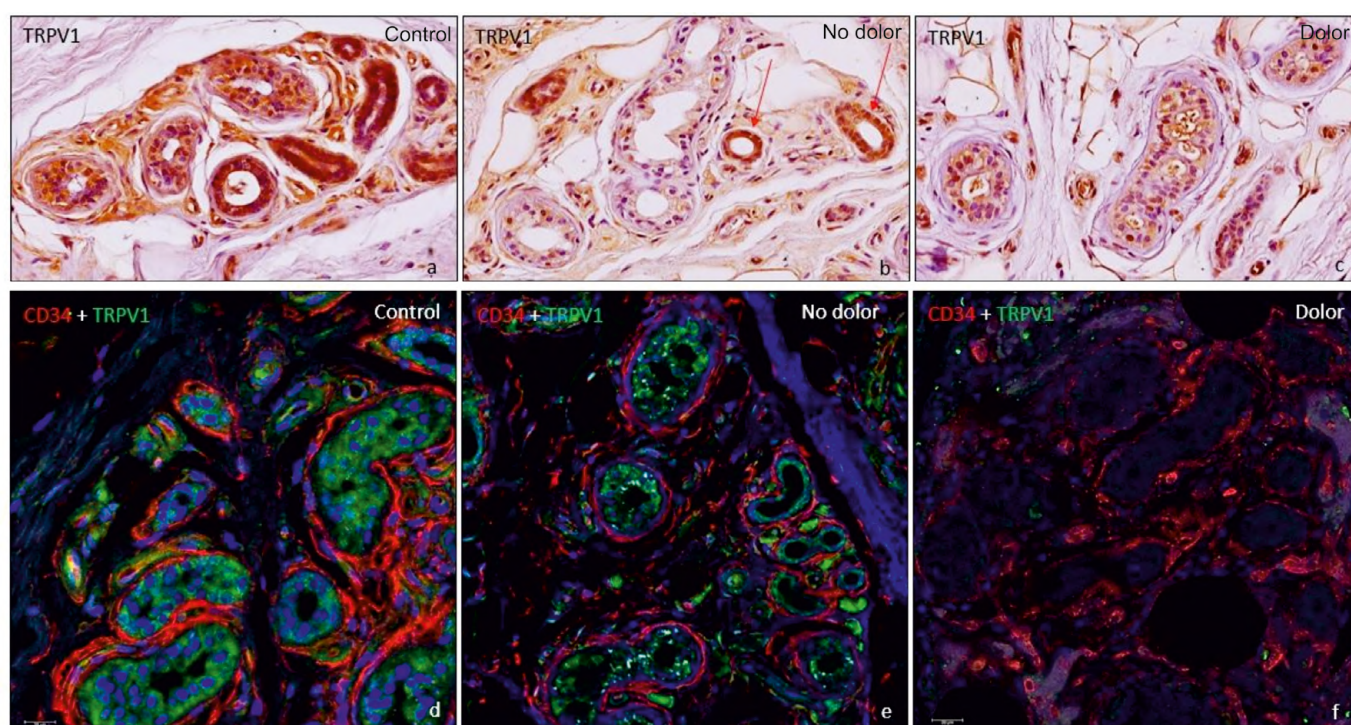


Figura 8. Inmunohistoquímica simple y doble inmunofluorescencia de las glándulas sudoríparas con el canal iónico TRPV1 en la piel de adultos control y con DPN dolorosa y no dolorosa. Disminución de la inmunorreacción para TRPV1 en los pacientes con neuropatía diabética (b,c, e,f), los ductos conservan su marcaje en los individuos con neuropatía no dolorosa (flechas en b), mientras que el marcaje llega a desaparecer en algunos casos en los pacientes con DPN dolorosa (f). Aumento: 20 $\times$. Barra de escala: 20 μ m.

norreacción para este anticuerpo (Figura 8, b,c). En los pacientes con neuropatía no dolorosa el marcaje se conserva todavía intenso en los ductos (Flechas en figura 8, b); mientras que para la neuropatía dolorosa el inmunomarcaje es débil tanto en ductos como glándulas (Figura 8, c). Estos datos se corroboraron mediante doble inmunofluorescencia con microscopia confocal, con el antígeno epitelial de membrana (CD34, rojo), que se usó con el fin de localizar las glándulas sudoríparas, y el canal iónico TRPV1 (verde). Se observa un marcaje intenso en los individuos sanos (Figura 8, d), una disminución en la inmunoexpresión de TRPV1 en los pacientes con DPN no dolorosa (Figura 8, e) y una ausencia total de reacción para TRPV1 en las glándulas sudoríparas del grupo con DPN dolorosa (Figura 8, f).

6. DISCUSIÓN

La DPN se define como “una polineuropatía sensoriomotora simétrica atribuible a alteraciones metabólicas y de microcirculación como resultado de una hiperglucemia crónica”.⁽¹⁴⁾ Esta patología incluye la afectación de la sudoración como una de sus complicaciones. Este hecho provoca en los pacientes una discapacidad para disipar el calor, llegando incluso a producirse una intolerancia al calor.⁽²²⁾

En cuanto al pie diabético, la hipohidrosis juega un papel importante ya que, la disminución de la sudoración conlleva un aumento de la temperatura corporal, se produce mayor sequedad en la piel y, por tanto, hay mayor susceptibilidad a las infecciones, aumentando así el riesgo de ulceraciones y la necesidad de amputación en las extremidades inferiores.⁽¹⁾

Partiendo de estas premisas, en el presente trabajo fin de grado se propuso estudiar tanto la morfología, como el perfil inmunohistoquímico y los cambios cuantitativos presentes en las glándulas sudoríparas de los pies de pacientes con neuropatía diabética, estableciendo por primera vez dos grupos bien diferenciados: DPN dolorosa y no dolorosa, frente a individuos control.

Estudios previos indicaban la existencia de cambios en las glándulas sudoríparas de pacientes con neuropatía diabética, recalando especialmente una disminución del tamaño de las glándulas sudoríparas y un estrechamiento de los ductos^(25,28). Nuestro estudio confirma la existencia de alteraciones en las glándulas y, además, demuestra estrechamientos de la luz, presencia de detritus, aspecto “edematoso” y disrupción de la lámina basal que las rodea.

Desde nuestro conocimiento, este trabajo fin de grado es el primer estudio inmunohistoquímico de las glándulas sudoríparas de los dedos del pie de pacientes con neuropatía diabética dolorosa y no-dolorosa.

Nuestro trabajo permitió demostrar que tanto la capa epitelial que rodea la luz de las glándulas (EMA positiva), como la capa mioepitelial que se encuentra en la parte externa de los glomérulos (α -SMA -positiva) presentan alteraciones en los pacientes con DPN dolorosa y no dolorosa, mostrando un inmunomarcaje más débil y difuso en la mayor parte de los casos, así como una pérdida de la continuidad de la inmunorreacción. Nuestro resultado estaría respaldado por

datos previos que afirman que la ausencia de EMA en las glándulas sudoríparas se relaciona con el estado no secretor de las mismas⁽³⁴⁾, lo cual podría justificar en parte la alteración de la sudoración en los pacientes con neuropatía. Además, los cambios en expresión α -SMA de las células mioepiteliales de los glomérulos, se podría relacionar con una disfunción del carácter mecánico de las mismas, lo que explicaría la presencia de detritus ya que el contenido de deshecho no es movilizad al exterior provocando la obstrucción de la luz de los glomérulos.

El estudio cuantitativo de las glándulas sudoríparas confirma estudios previos, que afirmaban que existía una disminución significativa de las mismas en individuos con neuropatía diabética.^(25,28) Además, en nuestro estudio se cuantificaron los ductos (S100P) y los glomérulos (α -SMA -positiva) de forma independiente. Los ductos que desembocan en la epidermis disminuyen hasta en 4 veces en los individuos enfermos no habiendo diferencias entre los grupos con patología; mientras que la pérdida de glomérulos es más acentuada en los individuos con neuropatía diabética dolorosa, llegando a un 58%. Esta diferencia podría achacarse a una mayor disminución de la inervación nerviosa autónoma en los individuos con neuropatía dolorosa, de hecho en estudios previos de nuestro grupo, se comprobó que presentaban una mayor pérdida de fibras sensitivas.

Para finalizar, se abordó el estudio de expresión del canal mecanosensible TRPV1 ya que, recientemente, se ha comprobado la presencia de este canal en las glándulas salivares relacionándolo con la estimulación de la secreción salivar.⁽³¹⁾ Este trabajo ha demostrado la presencia de este canal en las glándulas sudoríparas de la piel glabra, y además evidencia un descenso significativo de la intensidad de inmunorreacción en los pacientes con neuropatía diabética frente al grupo control, llegando incluso a desaparecer por completo en aquellos con DPN dolorosa. Este hallazgo permite hipotetizar la existencia de una disfunción de las glándulas sudoríparas de los pacientes con neuropatía diabética un poco más extrema en los pacientes con DPN-dolorosa, lo cual podría, en condiciones de calor extremo, provocar una intolerancia.

Hasta el momento este estudio es el primero que muestra los cambios que tienen lugar en la expresión de TRPV1, CD34, EMA, α -SMA y S100 en las glándulas sudoríparas de los individuos con DPN tanto dolorosa como no dolorosa. En conclusión, este trabajo proporciona por primera vez una posible relación entre la disminución del número de glándulas, los cambios en la expresión de estos anticuerpos en las glándulas sudoríparas de la piel glabra del dedo del pie y una pérdida de funcionalidad de las glándulas sudoríparas de los pacientes con neuropatía diabética, que implican el desarrollo de patologías relacionadas con la sudoración, como la hipohidrosis o anhidrosis. Además, nuestros resultados están en consonancia con el hecho de que estos pacientes presentan un aumento en el riesgo de padecer ulceraciones y una cicatrización deficiente de las heridas.⁽²⁴⁾ Nuestros datos apuntan a que la neuropatía dolorosa presenta una mayor severidad en las alteraciones que sufren las glándulas sudoríparas que la no dolorosa.

Dado que estudios previos han demostrado que la función sudomotora es uno de los marcadores pre-diabéticos más fiables hasta el momento, ⁽⁶⁾ podría ser una forma eficaz de diagnóstico temprano y seguimiento de estos pacientes, así como una futura diana terapéutica mediante moléculas que favorezcan la formación de nuevas glándulas o la activación de estas.

7. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos de la experimentación y tras la discusión de los mismos con los datos existentes en la literatura, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1. Se confirma la disminución en el número de glándulas sudoríparas mediante el anticuerpo α -SMA (Marcador de células mioepiteliales presentes glomérulos) y S100P (Marcador de ductos). La pérdida de glomérulos es mayor en los individuos con DPN-dolorosa.
2. Se observa la desestructuración de las glándulas sudoríparas en los pacientes con neuropatía diabética con la tinción Hematoxilina-eosina, las glándulas tienen apariencia edematosa, presencia de detritus y disminución de la luz de conducto sobremanera en la neuropatía dolorosa.
3. Se demuestra la desestructuración de elementos celulares que conforman las glándulas sudoríparas en los pacientes con neuropatía diabética. Falta de continuidad o alteraciones, tanto en la capa muscular (inmunorreacción para α -SMA) en la luz del conducto (inmunorreacción EMA) y en la membrana basal (inmunorreacción CD34).
4. La inmunorreacción para el canal iónico Piezo1 aparece en las glándulas sudoríparas, existe una disminución en la inmunorreacción en las glándulas de los pacientes con DPN- no dolorosa llegando incluso a la desaparición en la DPN-dolorosa.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Boulton, A.J.M. The diabetic foot: grand overview, epidemiology and pathogenesis. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2008; 24: S3-S6. <https://doi.org/10.1002/dmrr.833>
2. Tesfaye, S., Boulton, A. J., Dyck, P. J., Freeman, R., Horowitz, M., Kempler, P et al. Diabetic neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. *Diabetes care.* 2010; 33(10): 2285-93. <https://doi.org/10.2337/dc10-1303>
3. Kazamel, M., Stino, A. M., & Smith, A. G. Metabolic syndrome and peripheral neuropathy. *Muscle & nerve.* 2021; 63(3): 285-293. <https://doi.org/10.1002/mus.27086>
4. Krieger, SM., Reimann, M., Haase, R., Henkel, E., Hanefeld, M., & Ziemssen, T. Sudomotor Testing of Diabetes Polyneuropathy. *Front. Neurol.* 2018; 9: 803. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00803>
5. Gibbons, C. H., Illigens, B. M., Wang, N., & Freeman, R. Quantification of sweat gland innervation: a clinical-pathologic correlation. *Neurology.* 2009; 72(17): 1479-1486. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181a2e8b8>
6. Ziemssen, T., & Siepman, T. The Investigation of the Cardiovascular and Sudomotor Autonomic Nervous System-A Review. *Front. Neurol.* 2019; 10: 53. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00053>
7. Hu, Y., Converse, C., Lyons, M. C., & Hsu, W. H. Neural control of sweat secretion: a review. *The British journal of dermatology.* 2018; 178(6): 1246-1256. <https://doi.org/10.1111/bjd.15808>
8. Haanpää, M., Attal, N., Backonja, M., Baron, R., Bennett, M., Bouhassira, D., et al. NeuPSIG guidelines on neuropathic pain assessment. *Pain.* 2011; 152(1): 14-27. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.07.031>
9. Harreiter, J., & Roden, M. Diabetes mellitus – Definition, Classification, Diagnosis, Screening und Prevention (Update 2019). *Wien Klin Wochenschr.* 2019; 131(1): 6-15. <https://doi.org/10.1007/s00508-019-1450-4>
10. Ogurtsova, K., da Rocha Fernandes, J. D., Huang, Y., Linnenkamp, U., Guariguata, L., Cho, N. H., et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes research and clinical practice.* 2017; 128: 40-50. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2017.03.024>
11. Amanat, S., Ghahri, S., Dianatinasab, A., Fararouei, M., & Dianatinasab, M. Exercise and Type 2 Diabetes. *Advances in experimental medicine and biology.* 2020; 1228: 91-105. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1792-1_6
12. Selvarajah, D., Kar, D., Khunti, K., Davies, M. J., Scott, A. R., Walker, J., et al. Diabetic peripheral neuropathy: advances in diagnosis and strategies for screening and early intervention. *The lancet. Diabetes & endocrinology.* 2019; 7(12): 938-948. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(19\)30081-6](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(19)30081-6)
13. Gilron, I., Baron, R. & Jensen, T. Neuropathic pain: principles of diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc.* 2015; 90(4): 532-45. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2015.01.018>
14. Spallone V. Update on the Impact, Diagnosis and Management of Cardiovascular Autonomic Neuropathy in Diabetes: What Is Defined, What Is New, and What Is Unmet. *Diabetes Metab J.* 2019; 43(1): 3-30. <https://doi.org/10.4093/dmj.2018.0259>
15. Bodman, M. A., & Varacallo, M. Peripheral Diabetic Neuropathy. [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [cited 2023 Febr 13]. 41 p. Retrieved from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK442009/>
16. Zakin, E., Abrams, R., & Simpson, D. M. Diabetic Neuropathy. *Seminars in neurology.* 2019; 39(5): 560-569. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1688978>

17. Yang, H., Sloan, G., Ye, Y., Wang, S., Duan, B., Tesfaye, S., et al. New Perspective in Diabetic Neuropathy: From the Periphery to the Brain, a Call for Early Detection, and Precision Medicine. *Front. Endocrinol.* 2020; 10: 929. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00929>
18. Lin, Y., Chen, L., Zhang, M., Xie, S., Du, L., Zhang, X., & Li, H. Eccrine Sweat Gland and Its Regeneration: Current Status and Future Directions. *Front Cell Dev Biol.* 2021; 9: 667765. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.667765>
19. Sato, F., Owen, M., Matthes, R., Sato, K., & Gisolfi, C. V. Functional and morphological changes in the eccrine sweat gland with heat acclimation. *Journal of applied physiology* 1990; 69(1): 232–236. <https://doi.org/10.1152/jappl.1990.69.1.232>
20. Cui, C.-Y. & Schlessinger, D. Eccrine sweat gland development and sweat secretion. *Exp Dermatol.* 2015; 24: 644–650. <https://doi.org/10.1111/exd.12773>
21. Zhang, M., Li, H., Chen, L., Fang, S., Xie, S., & Lin, C. Three-dimensional reconstructed eccrine sweat glands with vascularization and cholinergic and adrenergic innervation. *Journal of molecular histology.* 2018; 49(4): 339–345. <https://doi.org/10.1007/s10735-018-9773-4>
22. Baker, L.B. Physiology of sweat gland function: The roles of sweating and sweat composition in human health. *Temperature.* 2019; 6(3): 211–259. <https://doi.org/10.1080/23328940.2019.1632145>
23. Edwards, J. L., Vincent, A. M., Cheng, H. T., & Feldman, E. L. Diabetic neuropathy: mechanisms to management. *Pharmacology & therapeutics.* 2008; 120(1): 1–34. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.05.005>
24. Gandecka, A., Araszkiewicz, A., Piłaciński, S., Wierusz-Wysocka, B., & Zozulińska-Ziółkiewicz, D. The relationship between sudomotor function and skin microvascular reactivity in individuals with type 1 diabetes of long duration. *Microvasc Res.* 2018; 120: 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2018>
25. Loavenbruck, A., Wendelschaefer-Crabbe, G., Sandroni, P. & Kennedy, W.R. Quantification of sweat gland volume and innervation in neuropathy: Correlation with thermoregulatory sweat testing. *Muscle & Nerve.* 2014; 50: 528–534. <https://doi.org/10.1002/mus.24185>
26. Nakamura, M., Namiki, T., Munetsugu, T., Hashimoto, T., Fujimoto, T., & Yokozeki, H. Image Gallery: Acquired anhidrosis associated with alcohol-related peripheral neuropathy, a potential cause of anhidrosis due to reduced innervation of eccrine glands. *The British journal of dermatology.* 2019; 180(2): 35. <https://doi.org/10.1111/bjd.17247>
27. Liu, Y., Sebastián, B., Liu, B., Zhang, Y., Fissel, J.A., Pan, B. et al. Sensory and autonomic function and structure in footpads of a diabetic mouse model. *Sci Rep.* 2017; 7: 41401 <https://doi.org/10.1038/srep41401>
28. Rittié, L., Sachs, D. L., Orringer, J. S., Voorhees, J. J., & Fisher, G. J. Eccrine sweat glands are major contributors to reepithelialization of human wounds. *The American journal of pathology.* 2013; 182(1): 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.09.019>
29. Glen P. Kenny, Ronald J. Sigal & Ryan McGinn. Body temperature regulation in diabetes. *Temperature.* 2016; 3(1): 119–145 <https://doi.org/10.1080/23328940.2015.1131506>
30. Cao, L., Chen, L., Li, H., Wei, Z., Xie, S., Zhang, et al. Differential antigen expression between human eccrine sweat glands and hair follicles/pilosebaceous units. *Journal of molecular histology.* 2019; 50(4) 335–342. <https://doi.org/10.1007/s10735-019-09830-2>
31. Li, H., Zhang, M., Chen, L., Zhang, B., & Zhang, C. Expression of S100A2 and S100P in human eccrine sweat glands and their application in differentiating secretory coil-like from duct-like structures in the 3D reconstituted eccrine sweat spheroids. *J Mol Hist.* 2017; 48: 219–223. <https://doi.org/10.1007/s10735-017-9721-8>
32. Houghton, J.W., Carpenter, G., Hans, J., Pesaro, M., Lynham, S., & Proctor, G. Agonists of Orally Expressed TRP Channels Stimulate Salivary Secretion and Modify the Salivary Proteome. *Molecular & Cellular Proteomics.* 2020; 19(10): 1664–1676. <https://doi.org/10.1074/mcp.ra120.002174>
33. Tominaga, M., Caterina, M. J., Malmberg, A. B., Rosen, T. A., Gilbert, H., Skinner, K., et al. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron.* 1998; 21(3): 531–543. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80564-4](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80564-4)
34. Catalán, M. A., Nakamoto, T., & Melvin, J. E. The salivary gland fluid secretion mechanism. *J Med Invest.* 2009; 56: 192–196. <https://doi.org/10.2152/jmi.56.192>
35. Metze, D., & Luger, T. A. Ultrastructural localization of carcinoembryonic antigen (CEA) glycoproteins and epithelial membrane antigen (EMA) in normal and neoplastic sweat glands. *Journal of cutaneous pathology.* 1996; 23(6): 518–529. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0560.1996.tb01444.x>