

Clinical Study

La administración tópica de pirfenidona Aumenta la curación de úlceras Crónicas del pie diabético : Un Estudio aleatorizado Cruzado

**Marcela Janka-Zires,¹ Paloma Almeda-Valdes,¹
Ana Cecilia Uribe-Wiechers,¹ Sonia Citlali Juárez-Comboni,² Joel López-Gutiérrez,¹
Jarod Jazek Escobar-Jiménez,³ and Francisco J. Gómez-Pérez¹**

¹*Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutricion Salvador Zubiran, Endocrinology and Metabolism Department,
Vasco de Quiroga 15, Colonia Belisario Domínguez Sección XVI, Tlalpan, 14080 Mexico City, CDMX, Mexico*

²*Grupo Ángeles, Camino a Santa Teresa 1055, Colonia Héroes de Padierna, Magdalena Contreras, 10700 Mexico City, CDMX, Mexico*

³*Cell Pharma, Calzada de Las Bombas 128, 04980 Mexico City, CDMX, Mexico*

Correspondence should be addressed to Paloma Almeda-Valdes; paloma.almedav@incmnsz.mx

Received 10 February 2016; Accepted 31 May 2016

Academic Editor: Nikolaos Papanas

Copyright © 2016 Marcela Janka-Zires et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Sólo el 30 por ciento de las úlceras crónicas del pie diabético sanan después de 20 semanas de tratamiento estándar. La pirfenidona es un fármaco con efectos biológicos, antiinflamatorios, antifibróticos. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la pirfenidona tópica añadida al tratamiento convencional de las úlceras crónicas del pie diabético no infectadas. Este fue un estudio aleatorizado y cruzado. El grupo 1 recibió pirfenidona tópica más el tratamiento convencional durante 8 semanas; después de este período, fueron cambiados para recibir solo el tratamiento convencional por 8 semanas más. En el grupo 2, el orden de los tratamientos fue contrario. Los criterios de valoración fueron la cicatrización completa de la úlcera y la reducción de tamaño. Al final los datos se obtuvieron de 35 úlceras en 24 pacientes. 52% de las úlceras tratadas con pirfenidona sanaron antes de las 8 semanas frente al 14,3% de los tratados solamente con el tratamiento convencional ($P = 0.025$). Entre 8 y 16 semanas, el 30,8% las úlceras que recibieron pirfenidona sanaron frente al 0% con el tratamiento convencional ($P = 0.081$). Para la semana 8, la reducción de tamaño de la úlcera fue 100% [73-100] con pirfenidona frente al 57,5% con el tratamiento convencional [28,9-74] ($P = 0.011$). Para la semana 16, la reducción fue del 93% [42,7 a 100] con pirfenidona y 21,8% [8-77,5] con el tratamiento convencional ($P = 0.050$). La adición de pirfenidona tópica al tratamiento convencional mejora significativamente la curación de las úlceras del pie diabético crónicas no infectadas.

1. Introducción

La diabetes tipo 2 (T2D) es una enfermedad crónica con una creciente incidencia en el mundo. La mayoría de los costos de la T2D se derivan de sus complicaciones. El pie diabético es una de las más comunes y devastadoras complicaciones de la diabetes. Y es la principal causa de amputación no traumática de las extremidades inferiores [1,2]. La incidencia anual de úlceras del pie diabético varía entre 1,9 % y 2,2 %, con una prevalencia de 7,5 % a 12 % [3]. El riesgo de amputación está asociada a la presencia de neuropatía periférica sensitiva, enfermedad vascular periférica, articulación de Charcot, ulceración y la presencia de infecciones [4]. El 56% de las

úlceras del pie diabético van a desarrollar infección y el 20 % de ellas terminarán en amputación de las extremidades inferiores [5].

Un numero de mediadores químicos están involucrados en el proceso de reparación del tejido, tales como citoquinas y factores de crecimiento. Dentro de este proceso complejo, el Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF- β) desempeña un papel clave en la regulación del desarrollo, la diferenciación, el crecimiento y la apoptosis de la mayoría de las células [6]. Como la inflamación favorece estos procesos, hay un aumento en la producción de TGF- β por células inflamatorias. El TGF- β a su vez, activa a los monocitos, mediante el aumento de la expresión de genes de citoquinas proinflamatorias tales como la interleucina 1 (IL-1) y al Factor

Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α). Las metaloproteinasas (MMPs) también son importantes en el proceso de reparación de los tejidos dañados. Los sustratos naturales de las MMPs incluyen las principales proteínas de la matriz extracelular (ECM) tales como colágeno, elastina y proteoglicanos [7]. Han habido avances en el manejo de las úlceras diabéticas. Terapias que incluyen factores de crecimiento, bioingeniería en piel, injertos de tejido, oxígeno hiperbárico, la presión negativa como terapia de heridas y otros enfoques novedosos para estimular la cicatrización de heridas han demostrado tasas de curación de alrededor 40% en las úlceras del pie diabético no infectados [8].

1-fenil-5-metil-2-[1H]-piridona (pirfenidona) es una molécula química sintética que actúa como una citoquina selectiva reguladora, proporcionando acción por su efecto anti inflamatorio y sus propiedades antifibróticas. La pirfenidona actúa como un modulador de TNF- α , TGF- β , Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), y el Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular (VEGF), que son citoquinas implicadas en el proceso inflamatorio-fibrótico.

Esto resulta en una reducción en la expresión de TGF- β por una inhibición directa de la furina, una proproteína convertasa. Estas acciones equilibran la producción de MMPs [9]. Estos efectos están asociados con una mejora en la reepitelización, la inflamación y fibrosis.

La pirfenidona ha demostrado ser útil en el tratamiento de los pacientes con heridas, quemaduras y cicatrices, sin acontecimientos adversos graves [10]. La pirfenidona tópica puede mejorar la curación de las úlceras del pie diabético y podría ser una opción como terapia adyuvante.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio es evaluar el efecto de pirfenidona añadido al tratamiento convencional para úlceras del pie diabético no infectado determinando el porcentaje de cierre de la herida completa y el cambio en el tamaño de la úlcera. Además, de evaluar la seguridad de la pirfenidona.

2. Material y Métodos

2.1. Diseño del ensayo. Este fue un estudio aleatorizado, prospectivo, controlado y cruzado. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición. Todos los sujetos aceptaron participar y dieron su consentimiento informado antes de iniciar el estudio. El estudio se registró con el número NCT02222376 ensayos clínicos.

2.2. Participantes. Los sujetos que participaron en la Clínica de pie diabético en el Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición Salvador Zubirán en la ciudad de México donde fueron reclutados. Se utilizó el sistema Wagner para la clasificación de las úlceras para su inclusión.

Grado 0 es un paciente en situación de riesgo o con pie diabético postulcerado sin úlcera. Grado 1 es una úlcera de espesor total sin involucrar al tendón, cápsula, o hueso. Grado 2 es una úlcera que implica tendón o cápsula, sin absceso u

osteomielitis. Grado 3 es una úlcera profunda con absceso u osteomielitis. Grado 4 es una úlcera con gangrena en una porción de la parte delantera del pie. Grado 5 es una úlcera con gangrena extensa [12].

Los criterios de inclusión fueron los siguientes: hombres y mujeres con diabetes tipo 2, mayores de 18 años de edad, con una úlcera de pie diabético grado 1 o 2, en la clasificación de Wagner, con un tamaño de la úlcera $\geq 1 \text{ cm}^2$, y una duración de al menos 8 semanas de evolución. Los criterios de exclusión incluyeron las úlceras infectadas, la presencia de índice tobillo-brazo (ITB) $<0,4$, úlceras debido a diferentes causas como la insuficiencia venosa, la imposibilidad de asistir a las evaluaciones semanales, el uso de tratamientos sistémicos o tópicos para úlceras de pie diabético, tratamiento inmunosupresor, enfermedades del tejido conjuntivo, embarazo y lactancia. Ninguno de los pacientes recibió tratamiento con antibióticos previamente o durante el estudio. Los criterios de eliminación fueron una asistencia $<75\%$ de las evaluaciones, alergia a la pirfenidona, el desarrollo de infección de la úlcera y la aparición de otras enfermedades graves que requirieran hospitalización.

2.3. Intervenciones. El tratamiento convencional consistió en la limpieza semanal de la úlcera con solución salina, utilizando una cuchilla de quirúrgica de desbridamiento, el mantenimiento de un ambiente húmedo y cubrir con gasas estériles. Además, los pacientes eran instruidos para llevar a cabo la limpieza diaria con humectación con solución salina, gasas y la descarga de la extremidad afectada. El tratamiento con pirfenidona tópica consistió en la aplicación de la pirfenidona sobre la úlcera dos veces al día.

Todos los pacientes completaron una fase de pre tratamiento de 7 días recibiendo tratamiento convencional. Después de esta semana, los participantes fueron asignados aleatoriamente a uno de los dos grupos. El grupo 1 recibió tratamiento convencional en combinación con pirfenidona tópica para las primeras ocho semanas y al final de este periodo fueron cambiados al tratamiento convencional durante las 8 semanas restantes. El grupo 2 recibió sólo tratamiento convencional durante las primeras 8 semanas y al final de este período fueron cambiados al tratamiento convencional en combinación con pirfenidona tópica durante otras 8 semanas. Los pacientes fueron evaluados semanalmente durante las 17 semanas en la clínica de pie diabético.

El peso, altura, y la presión arterial se midieron utilizando técnicas estandarizadas. Se calculó el índice de masa corporal con el peso en kilogramos dividido por la altura en metros al cuadrados. Además, todas las úlceras se clasificaron utilizando la clasificación del Grupo Internacional de Trabajo de el Pie Diabético (IWGDF), abreviado con el acrónimo PEDIS, grados de perfusión, la extensión (tamaño), la profundidad (pérdida de tejido), la infección y la sensibilidad (neuropatía) [13]. Para evaluar la presencia de enfermedad vascular en las extremidades inferiores, la ABI se calculó y se clasificaron de la siguiente manera: normal desde 0,9 a 1,3, enfermedad arterial periférica (PAD) $\leq 0,9$, y severa PAD $<0,4$. Cuando el ABI fue $> 1,3$, se consideró como un vaso no compresible [11]. Tras el desbridamiento, la duración y la anchura de la úlcera se midió con una regla estándar, el tamaño maximo se calculó en cm^2 , y se tomaron fotografías.

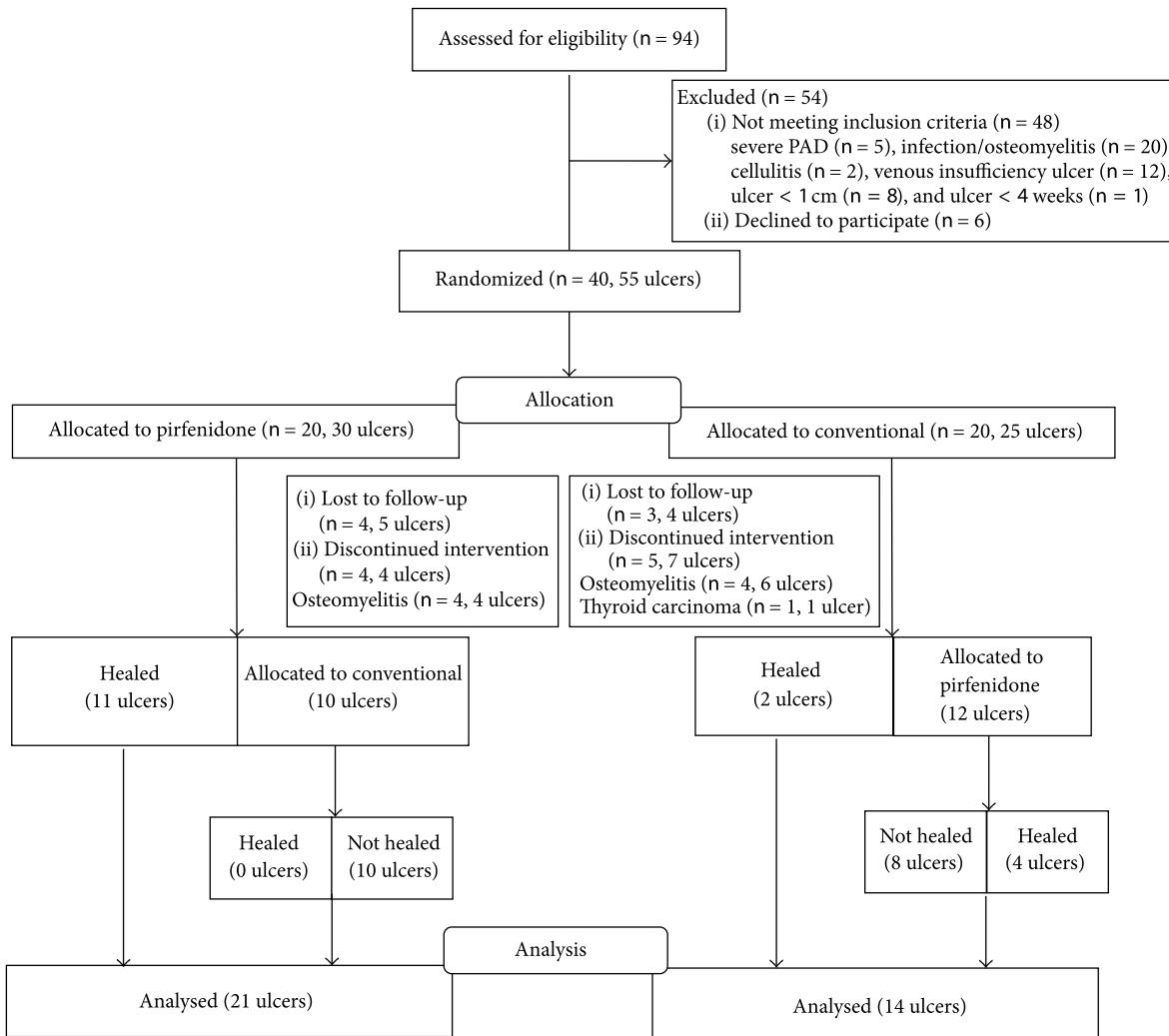


FIGURE 1: Flow diagram of patients during the study.

Los parámetros bioquímicos incluyeron conteo completo de células sanguíneas, velocidad de sedimentación globular, proteína C reactiva, glucosa, creatinina, ácido úrico, colesterol total, lipoproteína de alta densidad (HDL), lipoproteína de baja densidad (LDL), triglicéridos, hemoglobina glicosilada, aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa, y albuminuria de 24 h.

La evaluación del control metabólico y el ajuste de tratamiento se realizó según lo necesario. Los pacientes fueron reforzados sobre la descarga de sus extremidades afectadas, la adhesión al tratamiento se evaluó mediante la solicitud de los tubos vacíos. Por último, los posibles daños incluyendo ardor, enrojecimiento, picazón, e hipergranulación se controló mediante un examen físico e interrogatorio. Los eventos adversos inesperados, también fueron descritos. La atribución al tratamiento se decidió por un investigador no cegado.

2.4. Resultados. El cierre completo de la herida se definió como la epitelización completa de la úlcera con ausencia de drenaje. El porcentaje de cierre se estimó mediante el cálculo

del tamaño de la úlcera en cm^2 en la visita 1 y en la visita 8. El tamaño al final de cada período se restó del tamaño de la úlcera inicial (semana 1 y la semana 8) y el cambio se calculó y se expresó como un porcentaje.

2.5. Tamaño de la muestra. Se calculó un tamaño de muestra de 50 úlceras estimando un cambio del 25% en el tamaño de la úlcera con tratamiento con pirfenidona, con un error alfa del 5% ($Z_{\alpha}=1,96$) y un error beta de 10% (potencia del 90%).

2.6. Aleatorización. Los participantes fueron asignados al azar en bloques a uno de los dos grupos con el uso de sobres sellados utilizando un generador de números de secuencia aleatoria.

2.7. Análisis estadístico. La distribución de las variables cuantitativas se analizó con la prueba de Shapiro-Wilk. Las variables de distribución normal fueron descritas como medias y desviación estándar. En el caso de variables de distribución anormales, se utilizan la mediana y rango intercuartílico. Las variables categóricas se describieron como los porcentajes y

TABLE 1: Baseline characteristics of the studied population.

Variable	Group 1 (n = 20)	Group 2 (n = 20)	P
Male, number (%)	13 (65)	15 (75)	0.366
Age (years)	55.9 ± 14.2	54.7 ± 11.2	0.769
BMI, kg/m ²	25.3 [23.3–30.7]	29.0 [25.8–33.4]	0.048
Systolic blood pressure, mmHg	130 [115–140]	130 [120–140]	0.859
Diastolic blood pressure, mmHg	70 [70–80]	70 [70–85]	0.318
Time from DM diagnosis, years	18.3 [14.3–28.0]	15.3 [9.6–21.0]	0.107
Glucose, mg/dL	148 [110–196]	136 [108–191]	0.988
Creatinine, mg/dL	1.2 [.99–2]	0.95 [.86–1.3]	0.059
Albuminuria, mg/24 h	277.4 [27.4–758]	87.4 [11–739.6]	0.241
A1c, %	8.2 [7.2–8.4]	8.6 [7.1–9.5]	0.184
Triglycerides, mg/dL	135.5 [109–192]	133.5 [97.5–251]	0.930
Total cholesterol, mg/dL	172 [137–178]	159 [137–183]	0.988
HDL cholesterol, mg/dL	44.2 ± 13.5	41.8 ± 8.8	0.503
LDL cholesterol, mg/dL	93.9 ± 33.2	90 ± 34.1	0.733
ALT, U/L	17 [13–23]	18 [13–30]	0.837
AST, U/L	18 [17–24]	19.5 [14–22]	0.937
Uric acid, mg/dL	6.9 ± 1.5	6.5 ± 1.7	0.480
Hemoglobin, g/dL	12.7 [11.7–13.5]	13.5 [12.2–15.4]	0.349
Hematocrit, %	38 [36–41.5]	39.9 [36.7–45.9]	0.388
Platelets, K/μL	229.2 ± 54	239.2 ± 61.9	0.608
White blood cells, ×10 ³	7 ± 1.3	7.1 ± 1.2	0.868
ESR, mm/h	14 [5–34.5]	12 [6–32]	0.987
C-reactive protein, mg/dL	.28 [.18–.94]	.35 [.18–.93]	0.690

Data is expressed as mean ± SD or median [interquartile range]. BMI: body mass index calculated as weight in kilograms divided by the square of height in meters; DM: diabetes mellitus; A1c: glycated hemoglobin; HDL: high density lipoprotein; LDL: low density lipoprotein; ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; ESR: erythrocyte sedimentation rate.

proporciones. Las diferencias entre los grupos fueron evaluados con pruebas Student *t* independientes o exámenes *U* Mann-Whitney, según correspondía. Para las variables categóricas, se utilizó la chi cuadrada. La significancia estadística se consideró con un valor *P* de dos caras <0,05. Se utilizó el programa estadístico SPSS versión 20 para realizar el análisis.

3. Resultados

3.1. Flujo de los participantes. Cuarenta pacientes con úlceras fueron aleatorizados a la pirfenidona (*n* = 20) o tratamiento convencional (*n* = 20). Se muestra el diagrama de flujo de los pacientes en la Figura 1.

3.2. Datos de referencia. Las características de los participantes no fueron diferente entre los grupos, excepto para el índice de masa corporal, el cual fue ligeramente superior en el grupo asignado para recibir primero tratamiento convencional (29 vs 25,3 kg / m², *P* = 0,048). No consideramos que esta ligera diferencia en el índice de masa corporal pudiera haber afectado. Los datos que se presentan en la Tabla 1.

El tamaño de la úlcera y la profundidad en la línea basal no fue diferentes entre los grupos. Sin embargo, según la clasificación de ABI, en el grupo 1 hubo más pacientes con enfermedad arterial periférica y en grupo 2 hubo más pacientes con arterias no compresibles. Se excluyeron los pacientes con PAD severo y no consideramos que estas diferencias hayan afectado los resultados. La Tabla 2 muestra las características de la línea basal de la úlcera.

3.3. Resultados. En las primeras ocho semanas, el 52,4% de las úlceras asignadas al grupo 1 sanaron en comparación con el 14,3% del grupo 2 (*P* = 0,025). Después fue el cruce, las 22 úlceras restante cambiaron de tratamiento y el 30,8% de las úlceras que recibieron pirfenidona (Durante 8 a 16 semanas) sanaron en comparación con ninguna úlcera del grupo convencional (*P*= 0,081). Estas cifras se presentan en la Tabla 3.

A las 8 semanas, la mediana de porcentaje de reducción en el tamaño de la úlcera fue 100% [73-100] en el grupo 1 en comparación con un 57,5% [28,9-74] en el grupo 2, *P* = 0,011 Figura 2 (a). A las 16 semanas, la mediana de porcentaje de reducción fue del 93% [42,7 a 100] en el grupo de pirfenidona comparado con una reducción del tamaño del 21,8% [16-77,5] en el grupo convencional, *P* = 0,050 Figura 2(b).

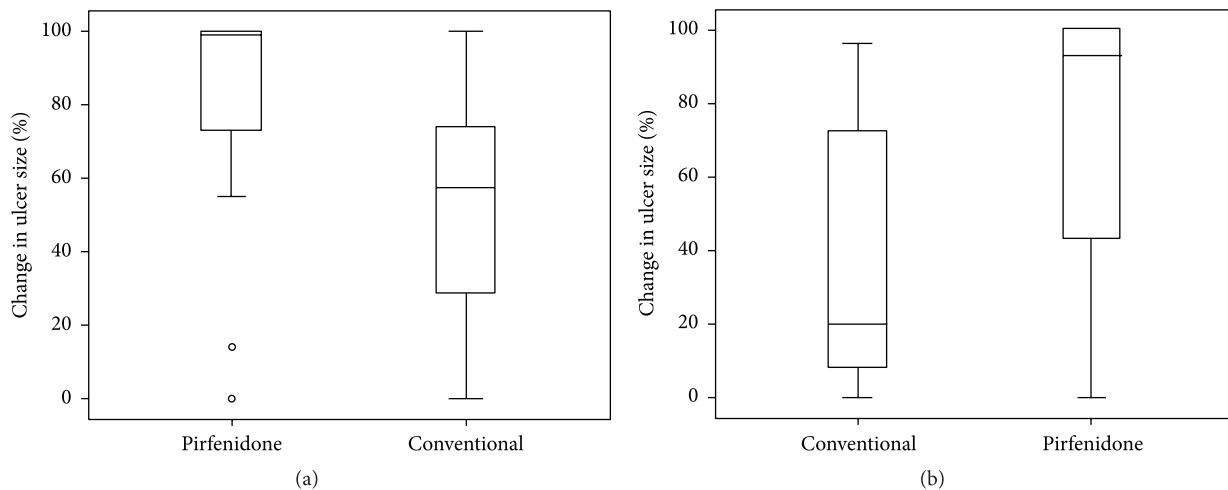


FIGURE 2: (a) Change in ulcer size expressed as percentage from baseline to 8 weeks. (b) Change in ulcer size expressed as percentage from 8 weeks to 16 weeks.



FIGURE 3: (a) Ulcer assigned to pirfenidone plus conventional treatment group during the first 8 weeks, that healed before crossover. (b) Ulcer assigned to conventional treatment only during the first 8 weeks, and crossover to pirfenidone plus conventional treatment.

TABLE 2: Baseline ulcer characteristics.

Characteristics	Total (n = 35)	Group 1 (n = 21)	Group 2 (n = 14)	P
Size, cm ²	1.32 [0.49–6.55]	0.75 [0.40–7.56]	1.40 [1.08–3.41]	0.630
Depth				0.955
Superficial	15 (42.9)	9 (42.9)	6 (42.9)	
Dermis, muscle, tendon	18 (51.4)	11 (52.4)	7 (50.0)	
All layers	2 (5.7)	1 (4.8)	1 (7.1)	
ABI right				0.406
Normal	7 (20)	5 (23.8)	2 (14.3)	
Noncompressible	28 (80)	16 (76.2)	12 (85.7)	
ABI left ^a				0.003
Normal	11 (32.4)	10 (50)	1 (7.1)	
PAD	3 (8.8)	3 (15)	0	
Noncompressible	20 (58.8)	8 (35)	13 (92.9)	
Depth				0.970
Superficial	15 (41.6)	9 (40.9)	6 (42.9)	
Dermis, muscle, tendon	18 (50)	11 (50)	7 (50)	
All layers	3 (8.3)	2 (9.1)	1 (7.1)	

Data expressed in median [interquartile range] or number (percentage).

ABI: ankle brachial index; PAD: peripheral arterial disease.

ABI was classified as follows: normal from >0.9–1.3, ≤0.9 PAD, <0.4 severe PAD, and >1.3 noncompressible vessel [11].

^aIn one patient left ABI could not be estimated due to history of amputation.

TABLE 3: Complete healing in the treatment groups.

	All ulcers N (%)	Pirfenidone N (%)	Conventional N (%)	P
Ulcer healing < 8 weeks (35 ulcers at the beginning)	13 (37.1)	11 (52.4)	2 (14.3)	0.025
Ulcer healing 8–16 weeks (22 ulcers at the beginning)	4 (17.4)	4 (30.8)	0	0.081

La Figura 3(a) muestra una úlcera asignada al grupo 1 y la Figura 3(b), una úlcera asignada al grupo 2.

3.4. Seguridad y tolerabilidad. No fueron observados eventos adversos graves durante el curso del estudio en cualquier grupo de tratamiento. Un paciente en el grupo 2 desarrolló hipergranulación durante el tratamiento con pirfenidona y este se resolvió espontáneamente. En el grupo 2, un paciente fue diagnosticado de carcinoma de tiroides durante el tratamiento convencional y fue eliminado del estudio (Figura 1 y Tabla 4).

Durante las primeras 8 semanas, 10 úlceras (8 pacientes) desarrollaron osteomielitis. Cuatro úlceras (4 pacientes) estaban en el grupo 1 y 6 úlceras (4 pacientes) en el grupo 2; uno de ellos tenía una amputación supracondilea. Estos pacientes fueron eliminados del estudio (Tabla 4).

4. Discusión

Este estudio demuestra que la pirfenidona junto al tratamiento convencional es superior al tratamiento convencional solo. El

tratamiento con pirfenidona redujo el tamaño y el aumento de la tasa de curación completa de las úlceras crónicas del pie diabético no infectado.

Un mayor número de úlceras logró completar el cierre de la herida cuando recibió tratamiento con pirfenidona. La pirfenidona mejora la curación exitosa además de el cuidado de las úlceras estándar. Un componente clave de la intervención fue el desbridamiento de úlceras semanal y la descarga del pie afectado. El desbridamiento permite la eliminación del tejido muerto y necrótico y promueve el proceso de la curación [14]. La adición de pirfenidona aceleró el proceso de cicatrización.

Las úlceras crónicas del pie diabético representan un desafío terapéutico y su tratamiento consiste en el desbridamiento, evaluación frecuente, identificación y tratamiento de la infección, la revascularización si está indicado, y una satisfactoria descarga de los pies [15].

El análisis de la evidencia sobre la eficacia de las intervenciones para mejorar la curación de úlceras crónicas de pie diabético es difícil. Hay pocos estudios controlados y la mayoría tiene problemas en la metodología. Esa no es una evidencia fuerte para escoger un medicamento tópico en preferencia a otro. Productos

TABLE 4: Adverse events.

	Group 1		Group 2	
	Weeks 0 to 7 Pirfenidone	Weeks 8 to 16 Conventional treatment	Weeks 0 to 7 Conventional treatment	Weeks 8 to 16 Pirfenidone
Osteomyelitis	4 (eliminated)	0	6 (eliminated)	0
Hypergranulation	0	0	0	1
Thyroid carcinoma	0	0	1 (eliminated)	0
Total AE	4	0	7	1

diseñados para mejorar la bioquímica de las heridas y la biología celular para promover la curación de heridas demuestran una tasa de curación de la úlcera entre 40% y 80%. Sin embargo, aún se necesitan más ensayos ciegos diseñados rigurosamente [8].

Los resultados de este estudio no son generalizables debido a los estrictos criterios de selección. Excluimos y eliminamos aquellos pacientes que presentaban insuficiencia arterial crítica e infección, para evitar factores de confusión. Además, de que estas condiciones requieren tratamiento individualizado y específico [16,17]. Un diseño cruzado se escogió porque de otra manera, no hubiera sido posible controlar las variantes que pudieran interferir significativamente en el proceso de curación tales como tamaño de la úlcera, profundidad de la úlcera, control de hiperglicemia, actividad física y peso.

5. Conclusión

En resumen, este estudio demuestra que la adición de pirfenidona tópica al tratamiento convencional mejora significativamente la curación de las úlceras crónicas del pie diabético no infectadas

Conflictos de intereses

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses

Agradecimientos

Los autores agradecen al grupo Medifarma por su apoyo y a los participantes por su adherencia y entusiasmo.

References

- [1] W. H. Van Houtum and L. A. Lavery, "Outcomes associated with diabetes-related amputations in the Netherlands and in the state of California, USA," *Journal of Internal Medicine*, vol. 240, no. 4, pp. 227–231, 1996.
- [2] W. H. van Houtum, L. A. Lavery, and L. B. Harkless, "The impact of diabetes-related lower-extremity amputations in the Netherlands," *Journal of Diabetes and Its Complications*, vol. 10, no. 6, pp. 325–330, 1996.
- [3] L. A. Lavery, D. G. Armstrong, R. P. Wunderlich, J. Tredwell, and A. J. M. Boulton, "Diabetic foot syndrome: evaluating the prevalence and incidence of foot pathology in Mexican Americans and non-Hispanic whites from a diabetes disease management cohort," *Diabetes Care*, vol. 26, no. 5, pp. 1435–1438, 2003.
- [4] A. J. Boulton, "Lawrence lecture. The diabetic foot: neuropathic in aetiology?" *Diabetic Medicine*, vol. 7, no. 10, pp. 852–858, 1990.
- [5] S. C. Wu, V. R. Driver, J. S. Wrobel, and D. G. Armstrong, "Foot ulcers in the diabetic patient, prevention and treatment," *Vascular Health and Risk Management*, vol. 3, no. 1, pp. 65–76, 2007.
- [6] P. Teller and T. K. White, "The physiology of wound healing: injury through maturation," *Surgical Clinics of North America*, vol. 89, no. 3, pp. 599–610, 2009.
- [7] S. M. Wahl, "Transforming growth factor beta (TGF- β) in inflammation: a cause and a cure," *Journal of Clinical Immunology*, vol. 12, no. 2, pp. 61–74, 1992.
- [8] F. L. Game, J. Apelqvist, C. Attinger et al., "Effectiveness of interventions to enhance healing of chronic ulcers of the foot in diabetes: a systematic review," *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, vol. 32, supplement 1, pp. 154–168, 2016.
- [9] C. J. Schaefer, D. W. Ruhrmund, L. Pan, S. D. Seiwert, and K. Kossen, "Antifibrotic activities of pirfenidone in animal models," *European Respiratory Review*, vol. 20, no. 120, pp. 85–97, 2011.
- [10] J. Macias-Barragan, A. Sandoval-Rodriguez, J. Navarro-Partida, and J. Armendariz-Borunda, "The multifaceted role of pirfenidone and its novel targets," *Fibrogenesis Tissue Repair*, vol. 3, article 16, 2010.
- [11] J. W. Olin, J. A. Kaufman, D. A. Bluemke et al., "Atherosclerotic vascular disease conference: writing group IV: imaging," *Circulation*, vol. 109, no. 21, pp. 2626–2633, 2004.
- [12] F. W. Wagner Jr., "The diabetic foot," *Orthopedics*, vol. 10, no. 1, pp. 163–172, 1987.
- [13] N. C. Schaper, "Diabetic foot ulcer classification system for research purposes: a progress report on criteria for including patients in research studies," *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, vol. 20, no. 1, pp. S90–S95, 2004.
- [14] V. Saxena, C.-W. Hwang, S. Huang, Q. Eichbaum, D. Ingber, and D. P. Orgill, "Vacuum-assisted closure: microdeformations of wounds and cell proliferation," *Plastic and Reconstructive Surgery*, vol. 114, no. 5, pp. 1086–1098, 2004.
- [15] H. W. Hopf, L. M. Humphrey, N. Puzziferri, J. M. West, C. E. Attinger, and T. K. Hunt, "Adjuncts to preparing wounds for closure: hyperbaric oxygen, growth factors, skin substitutes, negative pressure wound therapy (vacuum-assisted closure)," *Foot and Ankle Clinics*, vol. 6, no. 4, pp. 661–682, 2001.
- [16] B. A. Lipsky, A. R. Berendt, P. B. Cornia et al., "2012 infectious diseases society of America clinical practice guideline for the diagnosis and treatment of diabetic foot infections," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 54, no. 12, pp. e132–e173, 2012.
- [17] J. I. Weitz, J. Byrne, G. P. Clagett et al., "Diagnosis and treatment of chronic arterial insufficiency of the lower extremities: a critical review," *Circulation*, vol. 94, no. 11, pp. 3026–3049, 1996.

