



Asociación de citocinas inflamatorias con marcadores de recambio óseo en diabetes tipo 1

Mario Molina-Ayala,^a
Ruth Carmina Cruz-Soto,^a
Guadalupe Vargas-Ortega,^a
Baldomero González-Virla,^a
Aldo Ferreira-Hermosillo,^a
Julián Mac Gregor-Gooch,^b
Victoria Mendoza-Zubieta^a

Association of inflammatory cytokines with bone turnover markers in type 1 diabetes

Background: Diabetes mellitus (DM) adversely affects the skeleton and the physiological mechanisms implicated have not been explained sufficiently. Thus, the objective was to identify inflammatory cytokines (IL-1, IL-6 and TNF-alpha) in patients with T1DM and their association with markers of bone formation (sPINP) and markers of bone resorption (sCTX).

Methods: We studied 62 patients of 18 years of age or more with T1DM. We determined the values of HbA1c, vitamin D, inflammatory cytokines, as well as those of markers of bone formation and of markers of bone resorption.

Results: 49 patients were female with a mean age of 33.5 years. We found values of HbA1c > 7.5 in 83 %, vitamin D of 16 ng/mL. In patients with HbA1c > 7.5 we found a positive correlation between TNF-alpha and sCTX ($r = 0.43, p = 0.05$), IL-6 and sCTX ($r = 0.48, p = 0.037$). With a model of simple linear regression between IL-6 and sCTX, it was found a beta coefficient of 23.8 with a $p = 0.030$ (95 % CI = 2-45.6), ie.: for every unit increase in IL-6 there is a sCTX increase of 23.8 pg/mL.

Conclusions: We found a positive association between TNF-alpha and IL-6 with the marker of bone resorption (sCTX) in the group of patients with HbA1c > 7.5. The loss of metabolic control was associated with TNF-alpha and IL-6.

Introducción: la diabetes mellitus afecta de una manera adversa al esqueleto y esos mecanismos fisiopatológicos continúan sin entenderse completamente. Por lo tanto, el objetivo de este estudio es identificar citocinas inflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF α) en pacientes con DM1 y su asociación con marcadores de formación (sPINP) y resorción (sCTX) óseas.

Métodos: Se estudiaron 62 pacientes con DM1, mayores de 18 años. Se determinaron los valores de la HbA1c, la vitamina D, las citocinas inflamatorias, así como los de los marcadores de formación y resorción óseas.

Resultados: 49 pacientes fueron del sexo femenino con una edad media de 33.5 años, HbA1c > 7.5 en 83%, vitamina D 16 ng/mL. En los pacientes con HbA1c > 7.5 hubo correlación positiva entre el TNF α y sCTX ($r = 0.43, p = 0.05$), IL-6 y sCTX ($r = 0.48, p = 0.037$). Posterior a un modelo de regresión lineal simple entre el sCTX y la IL-6 se encontró un coeficiente beta de 23.8, $p = 0.030$ (IC 2-45.6), es decir, por cada unidad de elevación de IL-6 hay un incremento de sCTX de 23.8 pg/mL.

Conclusiones: encontramos una asociación positiva entre TNF-alfa e IL-6 con el marcador de resorción ósea (sCTX) en pacientes con HbA1c > 7.5 %. El descontrol metabólico se asoció con la elevación de citocinas inflamatorias TNF-alfa e IL-6.

Keywords

Type 1 diabetes mellitus
Bone density
Cytokines
Interleukins
Tumor necrosis factor-alpha

Palabras clave

Diabetes mellitus tipo 1
Densidad mineral ósea
Citocinas
Interleucinas
Factor de necrosis tumoral alfa

^aServicio de Endocrinología

^bDivisión de Medicina

Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México

Comunicación con: Victoria Mendoza Zubieta

Teléfono: (55) 5627 6900, extensión 21551

Correo electrónico: vmendozazu@yahoo.com

La diabetes tipo 1 (DM1) es una enfermedad autoinmune caracterizada por la destrucción de las células beta del páncreas.¹ Su incidencia se ha incrementado en forma global en aproximadamente 3 % por año en niños menores de cinco años y representa el 10 % de todos los casos de diabetes.² En México la incidencia de la DM1 en menores de 19 años se ha incrementado de 3.6 a 6.2 por cada 100 000 derechohabientes.³

Con el advenimiento de la insulina en 1921-1922, la reducción de la mortalidad debido a las complicaciones agudas como la cetoacidosis diabética se ha reducido de una forma dramática. Además con el avance en los nuevos análogos de insulina, en las tecnologías de monitoreo de la glucosa y en las bombas de infusión de insulina, más pacientes con DM1 son capaces de lograr las metas de hemoglobina glucosilada (HbA1c). Esto ha permitido reducir de una manera significativa las complicaciones microvasculares y se ha incrementado notablemente la esperanza de vida.^{4,5} Actualmente, existe la necesidad de detectar otras complicaciones relacionadas con la edad, incluidos los trastornos cardiovasculares, la osteoporosis y la disfunción cognitiva.

En los últimos años, una serie de estudios epidemiológicos mostraron que hay un incremento en la incidencia de osteopenia, osteoporosis e incremento del riesgo de fractura en pacientes con DM1.⁶ La diabetes mellitus afecta de una manera adversa al esqueleto y los mecanismos fisiopatológicos continúan sin entenderse completamente. La DM1 está asociada con una reducción de la densidad mineral ósea (DMO), mientras que la DM2 tiene incremento en la DMO; sin embargo, ambas presentan un mayor riesgo de fractura. Los pacientes con DM1 tienen de uno a dos veces mayor riesgo de fractura en cualquier sitio del esqueleto y hasta en 6.9 veces el riesgo de fractura de cadera.⁷ Los pacientes diabéticos presentan menor calidad ósea con respecto a los no diabéticos.⁶

El proceso de remodelación ósea depende de un equilibrio preciso entre la formación llevada a cabo por los osteoblastos y la resorción causada por los osteoclastos. Este equilibrio está regulado mediante diversas vías de señalización molecular, con la participación de factores sistémicos y locales; la interrupción en cualquiera de estas vías altera el recambio óseo y la calidad del hueso.^{6,7}

En la DM1, se han descrito diversos mecanismos que afectan la diferenciación y la actividad de los osteoblastos, favorecen la diferenciación de los osteoclastos, modifican la calidad del hueso, inciden en una mayor pérdida ósea y en el incremento del riesgo de fractura. Esos mecanismos incluyen la falta de insulina, el depósito de productos finales de la glucosilación avanzada (AGES) en la colágena, la reducción de los niveles séricos de la IGF-1 (factor de crecimiento insulinoide tipo

1), la hipercaliuria, deficiencia de vitamina D, la afección renal, la microangiopatía y el estado inflamatorio mediado por las interleucinas inflamatorias IL-1, IL-6, y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa).^{8,9}

Otras enfermedades autoinmunes que pueden coexistir con la DM1, como el hipo o hipertiroidismo, el hipogonadismo, la enfermedad celiaca y la misma deficiencia de la insulina, evitan que los pacientes con DM1 logren una masa ósea máxima en la edad adulta.^{8,9,10}

Los marcadores de resorción y formación ósea nos permiten valorar el proceso de remodelación ósea. La IOF (International Osteoporosis Fundation) y la IFCC (International Federación of Clinical Chemistry and Laboratory of Medicine) recomiendan el propéptido N-terminal del colágeno tipo I en suero (sPINP), como marcador de formación, y el telopeptido C-terminal del colágeno tipo I en suero (sCTX), como marcadores de resorción; según ambas instituciones, ambos son los marcadores de recambio óseo más sensibles aplicables a la clínica.¹¹

El objetivo de este estudio es identificar el tipo y la concentración de las citocinas inflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF-alfa) en pacientes con DM1 y su asociación con los marcadores de recambio óseo sPINP y sCTX.

Métodos

El hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI cuenta en su Clínica de Diabetes Mellitus tipo 1 con aproximadamente 350 pacientes, los cuales tienen un seguimiento con evaluaciones clínicas y bioquímicas en forma periódica. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de este hospital. Se incluyeron en este estudio 62 pacientes con diagnóstico de DM1 mayores de 18 años con seguimiento regular (por lo menos tres visitas por año) en la Clínica de Diabetes Mellitus tipo 1 de este centro. Los pacientes firmaron previamente su carta de consentimiento informado. Se excluyeron del estudio pacientes con insuficiencia renal (KDQI 3), enfermedades inflamatorias como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (LES), tratamiento con glucocorticoides, hipertiroidismo, menopausia y pacientes con evaluaciones clínicas incompletas.

En relación con las determinaciones bioquímicas, los estudios de laboratorio fueron obtenidos mediante una muestra de 6 mL mediante BD vacutainer (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) y se centrifugó a 3150 x g durante 15 minutos, y el suero se dividió en dos aliquotas. Analizamos, glucosa, colesterol total, c-HDL y triglicéridos con un kit disponible en forma comercial (COBAS 2010 Roche Diagnostics, Indianápolis, USA) utilizando fotocolorimetría con espectrofotó-

metro Roche Modular P800 (2010 Roche Diagnostics, Indianápolis, USA). Las muestras de C-HDL fueron tratadas con enzimas modificadas con polietilenglicol y sulfato de dextran y se analizaron con la misma técnica fotocolorimétrica. La hemoglobina glucosilada (HbA1c) fue evaluada por inmunoanálisis turbidimétrico (COBAS 2010 Roche Diagnostics, Indianápolis, USA). El colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (C-LDL) se calculó si los triglicéridos fueron < 400 mg/dL,¹¹ con la fórmula de Friedewald:

$$\text{C-LDL (mg/dL)} = \text{CT mg/dL} - (\text{C-HDL mg/dL} + \text{triglicéridos mg/dL}/5)$$

En cuanto a la determinación de citocinas, la interleucina-1 (IL-1), la interleucina-6 (IL-6), la interleucina-10 (IL-10) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) fueron analizados mediante BD cytometric Bead Array (CBA) usando un kit de inflamación por citometría de flujo (BD FACSaria, BD Biosciences, USA). El coeficiente de variación (CV) de la IL-1 fue de 4-7 %, el de la IL-6 fue de 8-10 %, el de la IL-10 fue de 8-11 % y el del TNF-alfa fue de 8-15 %. El límite de detección para cada ensayo fue de 1.7 pg/mL para la IL-1, 1.5 pg/mL para la IL-6, 2.3 pg/mL para la IL-10 y de 2.7 pg/mL para el TNF-alfa.

En relación con los marcadores de recambio óseo, el marcador de formación ósea propéptido N-terminal del colágeno tipo I (sPINP) y el marcador de resorción ósea telopeptido C-terminal del colágeno tipo I

(sCTX) se analizaron en suero mediante la técnica de ELISA, con el kit IDS-iSYS intac PINP (IDS, USA), con un límite de detección < 1 ng/mL, CV 2.6-3 %, y el Human C-telopeptiden of type collagen, ICTP ELISA kit (MyBiosource, USA), con límite de detección de 0.033 ng/mL, CV 2.1-4.9 %.

A propósito del análisis estadístico, los datos fueron analizados con STATA, versión 11. Para establecer la normalidad en la distribución de las variables cuantitativas se utilizó la prueba de Shapiro Wilks. Para hacer las asociaciones entre variables se utilizó para las variables cuantitativas la prueba de chi cuadrada, *U* de Mann Whitney o prueba de *t*. Los resultados se expresaron en media y desviación estándar o mediana y rango intercuartílico (RI). Para establecer las correlaciones entre las variables se utilizó la prueba de Pearson o la de Spearman. Para evaluar los factores asociados con los marcadores de resorción ósea se utilizó un modelo de regresión logística. Una *p* < 0.05 se consideró estadísticamente significativa.

Resultados

Se incluyeron 62 pacientes, con una mediana de edad de 33.5 años (24-46 años); 49 pacientes fueron del sexo femenino. La HbA1c fue de 8.5 % (7.7-10 %) en 83 % de los pacientes con HbA1c > 7.5 %. La depuración de creatinina fue de 69.5 mL/min (61.2-89.5). La totalidad de los pacientes mostraron rangos de deficiencia

Cuadro I Características basales de los 62 pacientes con diabetes mellitus 1

Parámetro	Resultado	
	<i>n</i>	%
Mujeres	49	79
Hombres	13	21
	Mediana	RI
Edad (en años)	33.5	24-46
HbA1c (en %)*	8.5	7.2-10
Depuración de creatinina (en mL/min)	69.5	61.2-89.5
Calcio (en mg/dL)	9.4	9-9.7
Fósforo (en mg/dL)	3.8	3.5-4.3
Vitamina D (en ng/mL)	16	12.5-21.2
ALP (en U/L)	82	69.5-98.5
Colesterol total (en mg/dL)	188.5	159-223.5
C-HDL (en mg/dL)	53	43.2-65.5
C-LDL (en mg/dL)	104	85.5-136
Triglicéridos en (mg/dL)	106	74.5-172.2

RI = rango intercuartílico; HbA1c = hemoglobina glucosilada A1c; ALP = fosfatasa alcalina; C-HDL = colesterol asociado a proteínas de alta densidad; C-LDL = colesterol asociado a proteínas de baja densidad

* Un 17 % tuvo valores de HbA1c < 7.5 % y el restante 83 %, valores > 7.5

Cuadro II Marcadores de recambio óseo e interleucinas de los 62 pacientes con DM1

Parámetro	Mediana	RI
IL-1 (en pg/mL)	7.4	6.2-17.5
IL-6 (en pg/mL)	5.65	2.8-9.4*
IL-10 (en pg/mL)	5.20	2.3-8.5
TNF-alfa (en pg/mL)	5.50	2.7-11.4*
PINP (en ng/mL)	963.5	680.3-1990.4
CTX (en pg/mL)	401.72	296.7-709.4*

RI = rango intercuartílico; IL = interleucina; TNF = factor de necrosis tumoral; PINP = propéptido N-terminal del colágeno tipo I en suero; CTX = telopeptido C-terminal del colágeno tipo I en suero

* Los pacientes con HbA1c > 7.5 mostraron una correlación positiva de TNF-alfa frente a CTX, $r = 0.43$, $p = 0.05$, así como IL-6 frente a CTX: $r = 0.48$, $p = 0.037$

(< 20 ng/mL) o insuficiencia (de 20 a 29.9 ng/mL) de vitamina D, con una mediana de 16 ng/mL (12.5-21.2). Ningún paciente mostró datos de suficiencia de vitamina D (≥ 30 ng/mL).¹² La fosfatasa alcalina fue de 82 U/L (69.5-98.5), el calcio de 9.4 mg/dL (9-9.7) y el fósforo de 3.8 mg/dL (3.5-4.3). Las concentraciones de colesterol se muestran en el cuadro I. Se encontró correlación positiva entre el TNF-alfa y el sCTX en el grupo de pacientes con un HbA1c > 7.5 ($r = 0.43$, $p = 0.05$); también se encontró correlación positiva entre la IL-6 y el sCTX ($r = 0.48$, $p = 0.037$) (cuadro II). Después de aplicar un modelo de regresión lineal simple entre el sCTX y la IL-6 se encontró un coeficiente beta de 23.8, con una $p = 0.030$ (intervalo de confianza [IC] al 95 % 2-45.6), lo que significa que por cada unidad de elevación de la IL-6 hay un incremento del CTX en aproximadamente 23.8 pg/mL, que debe ser un incremento en la resorción ósea.

Discusión

Tanto en DM1 como en DM2 se ha encontrado un riesgo incrementado de fractura, con una repercusión más severa en los pacientes con DM1. La prevalencia de la DM1 se ha incrementado en todo el mundo y se asocia con un aumento del riesgo de fractura de columna y cadera, esta última en un intervalo que va de 6.4 a 6.9 veces en comparación con individuos sin diabetes.^{7,13} Con el incremento de la esperanza de vida de los pacientes con DM1, se espera en el futuro un incremento adicional del número de fracturas.¹⁴

La fisiopatología continúa en la actualidad sin aclararse. La remodelación ósea es un proceso dinámico en el que participan las células formadoras de hueso, los osteoblastos y las células que resorben hueso: los osteoclastos. Múltiples vías de señalización mantie-

nen un equilibrio preciso de este proceso con la participación de factores humorales sistémicos y locales.

En la DM1, mediante estudios en animales y en humanos, se ha encontrado un severo deterioro de la formación ósea con una reducción de la diferenciación y función de los osteoblastos, principalmente en pacientes con descontrol metabólico.⁹

Factores no bien especificados en la DM1 producen una reducción de las vías de señalización osteoblastogénica Runx-2 y un incremento en la secreción de la esclerostina (por los osteocitos). La esclerostina es un regulador negativo de la vía osteoblastogénica *Wnt* y su incremento produce un mayor deterioro de la formación ósea.⁹

Además de tener un efecto directo sobre las células involucradas en la remodelación ósea, la DM1 también afecta la matriz ósea, alterando de esta manera la calidad del hueso. Estos efectos son mediados por la formación de los productos finales de la glucosilación avanzada (AGE), los cuales se producen debido a la glucosilación no enzimática de proteínas o lípidos y están implicados en múltiples complicaciones de la diabetes, incluida la fragilidad ósea.¹⁵

Algunas comorbilidades que incrementan el riesgo de osteoporosis son más frecuentes en pacientes con DM1 (por ejemplo, el hipogonadismo, ciertos trastornos de mala absorción intestinal, como la enfermedad celiaca, y el hipertiroidismo). Esas comorbilidades se deben detectar y tratar en forma temprana para evitar un mayor deterioro de la microarquitectura ósea.^{7,8}

La vitamina D tiene un amplio papel en la salud: su efecto en el metabolismo óseo es fundamental; también actúa en el sistema cardiovascular, en la inmunomodulación, en el desarrollo neurológico y en la proliferación celular. La deficiencia de vitamina D produce raquitismo en el niño y osteomalacia en el adulto. También disminuye la función de los osteoblastos, induce la osteoclastogénesis mediada por el RANKL y genera un incremento en la pérdida ósea; clásicamente la hipovitaminosis D impide la mineralización normal del osteoide. En nuestro estudio la totalidad de los pacientes mostraron concentraciones deficientes e insuficientes de vitamina D.¹²

La DM1 se asocia con un incremento de las enfermedades cardiovasculares, independientemente del control glucémico. El estado inflamatorio podría estar involucrado tanto en la enfermedad cardiovascular como en las alteraciones del metabolismo óseo. La IL-6 y el TNF-alfa promueven la expresión del RANKL, la osteoclastogénesis y la mayor resorción ósea. Nuestros resultados muestran una asociación positiva de los marcadores de resorción ósea con las concentraciones de IL-6 y TNF-alfa en pacientes descontrolados con DM1 (HbA1c > 7.5).

Conclusiones

En nuestro trabajo encontramos una asociación positiva entre las citosinas proinflamatorias TNF-alfa e IL-6 con el marcador de resorción ósea en el grupo de pacientes con una HbA1c > 7.5. El descontrol metabólico se asoció a mayores concentraciones de citosinas inflamatorias TNF-alfa e IL-6 con un incremento en la resorción ósea. Asimismo, encontramos una correlación o asociación positiva entre la IL-6 con el marcador de resorción ósea sCTX (el incremento de una unidad en la IL-6 aumentó 23.8 pg/mL de sCTX). La DM1 se asocia con un incremento en la fragilidad ósea. La convergencia de muchos factores,

entre estos el estado inflamatorio y la deficiencia de vitamina D, conduce a una mala calidad del hueso con un incremento en el riesgo de fracturas, especialmente la de cadera. Estos factores pueden ser modificados; sin embargo, se requiere mayor investigación de este problema para lograr mejores herramientas para la evaluación y el tratamiento de otros factores asociados a la mala calidad ósea en estos pacientes.

Declaración de conflicto de interés: los autores han completado y enviado la forma traducida al español de la declaración de conflictos potenciales de interés del Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas, y no fue reportado alguno en relación con este artículo.

Referencias

1. Wherrett DK, Daneman D. Prevention of Type 1 Diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2009 Dec; 38(4): 777-90. doi: 10.1016/j.ecl.2009.08.006
2. Gillespie KM. Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. *CMAJ.* 2006 Jul 18;175(2):165-70.
3. Gómez-Díaz RA, Pérez-Pérez G, Hernández-Cuesta IT, Rodríguez-García J del C, Guerrero-López R, Aguilar-Salinas CA, et al. Incidence of type 1 diabetes in Mexico: data from an institutional register 2000-2010. *Diabetes Care.* 2012;35(11): e77.
4. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. *Lancet.* 2014 Jan 4;383(9911):69-82. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60591-7.
5. Miller RG, Secret AM, Sharma RK, Songer TJ, Orchard TJ. Improvements in the life expectancy of type 1 diabetes. The Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications study cohort. *Diabetes.* 2012 Nov;61(11):2987-92. doi: 10.2337/db11-1625.
6. Bipradas R. Biomolecular basis of the role of diabetes mellitus in osteoporosis and bone fractures. *World J Diabetes.* 2013 Aug 15;4(4):101-13.
7. Vestergaard P. Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes: A meta-analysis. *Osteoporos Int.* 2007 Apr;18(4):427-44.
8. Dhaon P, Shah VN. Type 1 diabetes and osteoporosis: A review of literature. *Indian J Endocrinol Metab.* 2014 Mar-Apr; 18(2):159-65.
9. Khan TS, Frasser LA. Type 1 Diabetes and Osteoporosis: From Molecular Pathways to Bone Phenotype. *J Osteoporos.* 2015;2015:1-8. doi: 10.1155/2015/174186
10. Vasikaran S, Cooper C, Eastell R, Griesmacher A, Morris HA, Trenti T, et al. International Osteoporosis Foundation and International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine position on bone marker standards in osteoporosis. *Clin Chem Lab Med.* 2011 Aug;49(8):1271-4. doi: 10.1515/CCLM.2011.602.
11. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972 Jun;18(6):499-502.
12. Holick MF, Ninkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Jul;96(7):1911-30. doi: 10.1210/jc.2011-0385.
13. Janghorbani M, Feskanich D, Willett WC, Hu F. Prospective study of diabetes and risk of hip fracture: the nurses' health study. *Diabetes Care.* 2006 Jul;29(7):1573-8.
14. Livingstone S; Scottish Diabetes Research Network Epidemiology Group. Life Expectancy in Type 1 Diabetes: A Scottish Registry Linkage Study. University of Dundee, UK: Scottish Diabetes Research Network Epidemiology Group; 2013. Disponible en <http://www.easdvirtualmeeting.org/resources/3906>
15. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation.* 2006 Aug 8;114(6):597-605.