

Entorno inflamatorio diferencial en pacientes con osteoporosis y diabetes mellitus tipo 2

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2022000100004>

Muñoz-Torres M^{*1,2,3}, Carazo-Gallego A^{*4}, Jiménez-López JC^{5,6}, Avilés-Pérez MD^{2,3}, Díaz-Arco S⁷, Lozano-Alonso S⁸, Lima-Cabello E⁵, de Dios Alché J⁵, Reyes-García R^{3,9}, Morales-Santana S^{3,10}

1 Departamento de Medicina. Facultad de Medicina. Universidad de Granada. Granada (España)

2 Unidad de Metabolismo Óseo. UGC Endocrinología y Nutrición - Hospital Universitario San Cecilio - Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (Ibs.GRANADA) - Granada (España)

3 Área temática CIBER de Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERFES). Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBER). Instituto de Salud Carlos III. Madrid (España)

4 Unidad de Enfermedades Digestivas. Hospital Universitario San Cecilio. Instituto Biosanitario de Granada (España)

5 Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas. Estación Experimental del Zaidín. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Granada (España)

6 Instituto de Agricultura y Escuela de Agricultura y Medioambiente. Universidad del Oeste de Australia (UWA). Perth CRAWLEY (Australia)

7 Universidad de Granada. Hospital Universitario San Cecilio. Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (Ibs.GRANADA) - Granada (España)

8 Servicio de Angiología y Cirugía Vascular. Hospital Universitario San Cecilio. Granada (España)

9 Unidad de Endocrinología y Nutrición. Hospital Universitario Torrecárdenas. Almería (España)

10 Servicio de Investigación Proteómica. Hospital Universitario San Cecilio. Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (Ibs.Granada). Granada (España)

* Estos autores han contribuido de la misma forma para este trabajo.

Fecha de recepción: 31/12/2019 - Fecha de aceptación: 08/11/2021

Trabajo remitido como prestación por una beca de investigación FEIOMM

Resumen

Objetivo: La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y la osteoporosis son enfermedades asociadas con un entorno pro-inflamatorio, cuya prevención mediante nuevas estrategias terapéuticas podría evitar su desarrollo. Sin embargo, existe un escaso número de estudios que evalúen el perfil inflamatorio de la osteoporosis en pacientes con DM2.

El objetivo de este estudio se centró en evaluar la respuesta inflamatoria inmunitaria mediante concentraciones séricas de nueve citocinas, dos de ellas de carácter anti-inflamatorio (IL-10, IL-5) y seis pro-inflamatorias (IL-2, IL-6, IL-12 (p70), IL-17A, TNF α e IFN γ) en 163 individuos con DM2 y 47 controles. Una subpoblación, formada por 43 pacientes DM2 sin osteoporosis, y 33 con osteoporosis, fue analizada en más profundidad a nivel de parámetros óseos. Además, hemos evaluado las hormonas calciotropas, los marcadores de remodelado óseo, densidad mineral ósea y fracturas vertebrales en la población, y hemos analizado la relación de las citocinas ensayadas con la DM2, la osteoporosis y las fracturas vertebrales prevalentes.

Los pacientes con DM2 tenían concentraciones séricas significativamente más altas de IL-10 en comparación con el grupo control (0,5 \pm 1 vs. 0,14 \pm 0,3 pg/ml; p=0,016) y los niveles de IL-12 p70 se mostraron más bajos en pacientes con DM2 respecto a los controles (2,9 \pm 1,6 vs. 3,9 \pm 3,1 pg/ml; p=0,027).

En el grupo de pacientes con DM2 y osteoporosis, los niveles de la citocina IL-6 resultaron elevados respecto al grupo de DM2 sin osteoporosis (10,9 \pm 14,6 vs. 4,5 \pm 7,0; p=0,017). También se observó una asociación de IL-5, siendo sus niveles más bajos en el grupo DM2 con osteoporosis (1,7 \pm 0,2 vs. 3,8 \pm 0,6; p=0,032). Además, la IL-5 mostró una correlación directa con los niveles del biomarcador de formación ósea fosfatasa alcalina ósea (r=0,277, p=0,004) en la subpoblación de pacientes con DM2. El resto de citocinas no mostraron diferencias significativas.

En conclusión, nuestros hallazgos demuestran que en nuestra población de estudio, los pacientes con DM2 respecto a sujetos sanos presentan un perfil inflamatorio opuesto a lo que se espera en situación de hiperglicemia, probablemente como respuesta compensatoria a la inflamación originada. El perfil de citocinas se modifica en la subpoblación de los pacientes diabéticos, dependiendo de la presencia de osteoporosis. En este caso, el perfil inflamatorio en presencia de osteoporosis es coherente con la respuesta esperada.

Palabras clave: diabetes mellitus tipo 2, osteoporosis, inflamación, citocinas.



Correspondencia: Sonia Morales Santana (smorales@ibsgranada.es)

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM2) y la osteoporosis son enfermedades con una creciente prevalencia debido al envejecimiento de la población, y también influye el sexo, factores genéticos y ambientales, tales como una dieta desequilibrada, obesidad y una vida sedentaria. La DM2 aumentó de forma alarmante durante el año 2014, llegando a afectar a más de 420 millones de personas a nivel mundial¹. Los pacientes con DM2 presentan un mayor riesgo de caídas, y se ha observado un aumento en la prevalencia e incidencia de fracturas por fragilidad en estos pacientes²⁻⁵, siendo causa de una importante mortalidad, morbilidad y del aumento de gastos sanitarios.

La DM2 afecta a la homeostasis ósea^{6,7}, y se asocia con un mayor riesgo de fracturas⁸, a pesar de que los pacientes exhiben una mayor densidad mineral ósea (DMO)^{4,9-12}. Además, se han observado niveles circulantes reducidos de marcadores de recambio óseo en DM2¹³, que deben influenciar el alto riesgo de fractura en pacientes con DM2.

Por otra parte, la inflamación está ganando protagonismo en el desarrollo de la enfermedad y sus complicaciones. Múltiples estudios muestran un aumento de citocinas inflamatorias en la DM2, que confieren un estado crónico de inflamación en bajo grado.

En la DM2, es frecuente que los pacientes tengan un estilo de vida inadecuado, con una ingesta calórica excesiva y falta de ejercicio físico, lo que promueve la adiposidad central y la obesidad, de forma que existe una mayor infiltración de macrófagos en el tejido adiposo, pudiendo alterarse la secreción de citocinas¹⁴. La liberación de estas proteínas mediadoras de la inflamación, son así el resultado de la activación de células inmunitarias acumuladas en tejidos metabólicos y que al alterarse la secreción de citocinas, promueven la resistencia sistémica a la insulina (IR) y el daño a las células β productoras de insulina. Así, un entorno inflamatorio está asociado con valores alterados de citocinas circulantes, que podrían alterar la sensibilidad a la insulina, propiciando un mayor riesgo de padecer DM2¹⁵. Por otra parte, los pacientes con DM2 tienen un envejecimiento acelerado, proceso que conduce a un mayor riesgo de desarrollar fragilidad ósea de forma prematura, especialmente en los pacientes con glicemia poco controlada¹⁶. Las citocinas inflamatorias también aumentan su producción durante el envejecimiento, siendo cruciales para la homeostasis esquelética. Se ha observado que las citocinas inflamatorias pueden alterar los ratios de RANKL:OPG y puede resultar en un aumento de la osteoclastogénesis¹⁷. Así, el sistema inmunológico está fuertemente ligado al mantenimiento de huesos sanos.

Con objeto de prevenir la progresión de la osteoporosis y las fracturas relacionadas en pacientes con DM2, se debe evaluar la salud ósea e implementar intervenciones para la prevención de fracturas en esta población, y en caso de que DM2 y osteoporosis estén establecidas, hallar intervenciones farmacológicas y de estilo de vida eficaces. En este sentido, los tratamientos más novedosos para la DM2 incluyen bloqueo de la sobreproducción patológica de las citocinas proinflamatorias por antagonistas del receptor de la citocina de interés, o por anticuerpos neutralizantes de ésta. Actualmente, se están desarrollando tratamientos con vacunas, consistentes en inyección de la citocina repetidas veces para producir una sobreexpresión de anticuerpos neutralizantes contra la citocina inyectada. Concretamente, las drogas que bloquean el efecto de la citocina IL-1 β han surgido como

terapia de primera línea. Se están ensayando anticuerpos monoclonales dirigidos contra IL-1 β ^{18,19} y vacunas²⁰ que resultan ser beneficiosos en términos de parámetros glucémicos e inflamatorios en pacientes con DM2.

Debido a la creciente prevalencia de DM2 y sus comorbilidades, como es el caso de la osteoporosis, existe una creciente demanda de terapias personalizadas, cuya eficiencia se monitorice periódicamente mediante una evaluación de biomarcadores de la progresión de la enfermedad.

Este estudio pretende ampliar el conocimiento de los mecanismos involucrados en la homeostasis ósea, mediante la evaluación de citoquinas inflamatorias asociadas a la osteoporosis en pacientes con DM2. Nos hemos enfocado en 9 citoquinas circulantes, que podrían estar implicadas en la inflamación sistémica de la osteoporosis en pacientes con DM2. De esta forma, pretendemos contribuir al conocimiento de las citoquinas involucradas en la patogénesis de ambas enfermedades, facilitando y simplificando el diseño de terapias anti-inflamatorias para evitar el progreso de la osteoporosis en pacientes con DM2.

POBLACIÓN Y MÉTODOS

Diseño y población de estudio

Este estudio es de diseño transversal. La población engloba un total de 210 participantes, que incluyen 47 individuos control y 163 pacientes con DM2 con diagnóstico de diabetes, según los criterios de la Asociación Americana de Diabetes. Los pacientes diabéticos seguían terapia para su enfermedad, incluyendo metformina, sulfonilureas, insulina o combinación de éstas. Los pacientes tratados con tiazolidinedionas fueron excluidos por afectar el metabolismo óseo y la liberación de citocinas.

El estudio específico en presencia vs. ausencia de osteoporosis en la población de DM2 se realizó sobre 43 pacientes sin osteoporosis y 33 pacientes sin osteoporosis. Utilizamos los Criterios de la Organización Mundial de la Salud para la osteoporosis²¹. Debido a las características especiales de la fisiopatología de la diabetes tipo 2 condicionan la aparición de fracturas sin existir alteraciones densitométricas, los pacientes con osteoporosis también serán aquéllos que presenten fracturas vertebrales prevalentes, aun sin cumplir los criterios de DMO $\leq -2,5$ desviaciones estándar (DE) del T-score en la columna lumbar; la cadera total o el cuello femoral.

Todos los participantes eran caucásicos, de 35 a 65 años.

Los criterios de exclusión para la población de pacientes con DM2 incluyen historial previo de inflamación sistémica por otras enfermedades o enfermedades crónicas diferentes de la DM2, tratamientos anti-inflamatorios o elevado consumo de alcohol. Ninguno de los sujetos fue tratado con medicación que se conozca que modifique la masa ósea.

La población fue reclutada en el Hospital Universitario San Cecilio de Granada, España, y las muestras fueron gestionadas por el Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación Biomédica de Andalucía.

Medidas antropométricas, clínicas y bioquímicas

Se recopilaron datos antropométricos, entre los que se incluye el índice de masa corporal (IMC) (peso en kilogramos dividido por el cuadrado de altura en metros).

Para la medición de diversos parámetros bioquímicos en suero, se tomaron muestras de sangre venosa en la mañana siguiente al ayuno durante la noche. Los sueros se almacenaron a -80°C hasta el examen.

Los parámetros bioquímicos glucosa en ayunas, hemoglobina glicada (HbA1c), calcio, fósforo y creatinina se midieron utilizando técnicas estándar de laboratorio automatizadas. Las hormonas calciotropas medidas fueron iPTH (inmunoensayo; Roche Diagnostics SL) y 25-hidroxivitamina D (RIA; DiaSorin). Los biomarcadores de recambio óseo medidos fueron osteocalcina (RIA, DiaSorin Stillwater, MN); fosfatasa alcalina ósea - (inmunoensayo, Hybritech Europe), CTX (inmunoensayo, Elecsys CrossLaps; Roche Diagnóstica) y fosfatasa ácida resistente a tartrato 5b -TRAP5b- (inmunoensayo, IDS Ltd.).

Para la medición de densidad ósea y fracturas vertebrales, se evaluó la densidad mineral ósea (DMO) en la columna lumbar (CL) L2-L4, en el cuello femoral (CF) y en el total de cadera (CT) mediante absorciometría dual de rayos X de (DEXA) con densitómetro Hologic QDR 4500 (Waltham, MA; coeficiente de variación 1%). Utilizamos los Criterios de la Organización Mundial de la Salud para la osteoporosis²¹. La presencia de fracturas vertebrales prevalentes se evaluó en radiografías convencionales de vista lateral de la columna, a nivel del tórax y a nivel lumbar (T4-L5). Las fracturas vertebrales traumáticas fueron excluidas. Las fracturas vertebrales se identificaron de acuerdo al método de Genant *et al.*²² Solo se consideraron fracturas moderadas y severas en nuestro estudio.

Medida de citocinas

La concentración de nueve citocinas (IL-10, IL-4, IL-5, IL-2, IL-6, IL-12 (p70), IL-17, TNF α e IFN γ) se midió mediante ensayos multiplex con tecnología luminex, usando el kit Human Th17 Magnetic Bead Panel de Millipore (Cat. # HTH17MAG-14K), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La lectura se realizó sobre el sistema Bio-Plex[®] 200 (Bio-Rad). Los datos se expresan en $\text{pg} \times \text{mL}^{-1}$. El coeficiente de variación intra-ensayo fue menor del 10% y el coeficiente de variación inter-ensayo fue menor del 15% para todos los analitos estudiados. El kit ensayado incorpora controles internos de citocinas diseñados para su uso en control de calidad durante el monitoreo de exactitud y precisión en los análisis de citocinas realizados.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron usando el software SPSS-23 (SPSS, Inc.). Las variables continuas se expresaron mediante media y desviación standard y las categóricas mediante porcentajes. La distribución normal se evaluó mediante el test Kolmogorov-Smirnov. Las variables con distribución normal fueron estudiadas mediante el test t- de student, y las variables que no cumplían normalidad, se analizaron mediante el test de U de Mann-Whitney. Los test χ^2 se usaron para comparar variables categóricas. Se aceptaron valores de $p < 0,05$ como valores estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Características clínicas de la población de pacientes con DM2 y controles

Las características basales de la población completa de estudio, tanto grupo de pacientes con DM2 como controles, se describen en la tabla 1. Debido a los criterios de inclusión, los individuos con DM2 presentan signifi-

cativamente más altos niveles de glucosa y HbA1c que el grupo control ($p < 0,001$). Las hormonas calciotropas iPTH, osteocalcina y los biomarcadores CTX y TRAP5b se mostraron más elevadas en controles.

Perfil de citocinas en pacientes con DM2 y controles

Según se presenta en tabla 1, las citocinas que presentan diferencias en la comparación de sus concentraciones séricas corresponden a IL-10 e IL-12 p70. Las concentraciones séricas de IL-10 son más altas en el grupo de pacientes con DM2 en comparación con el grupo control ($0,5 \pm 1$ vs. $0,14 \pm 0,3$ pg/ml ; $p < 0,05$).

En el caso de IL-12 p70, se muestran valores séricos más bajos en pacientes con DM2 respecto a los controles sanos ($2,9 \pm 1,6$ vs. $3,9 \pm 3,1$ pg/ml ; $p < 0,05$). Por otra parte, los valores de las citocinas IL-5, IL-6, IL17A, TNF α e IFN γ no presentan diferencias entre los grupos de estudio, aunque IL-5 e IFN γ se aproximan a la significación en la comparativa de grupos. Además los niveles de la citocina IL-4, IL-2 e IL-17A no fueron detectables en la mayoría de los casos, por lo que los datos no se han presentado en este estudio.

En la figura 1, se muestran gráficamente la comparativa de los niveles séricos en los grupos DM2 y controles de las citoquinas, visualizándose en A) IL-10 y en B) IL-12 (p70).

Características clínicas del grupo de pacientes con DM2 y su relación con el metabolismo óseo

Las características de la población de pacientes con diabetes mellitus tipo 2, en base a la presencia o ausencia de osteoporosis, se presentan en la tabla 2.

En cuanto a las hormonas calciotropas 25 (OH)vitamina D y paratohormona, no se observan diferencias para la primera de ellas, sin embargo, los niveles de paratohormona se encuentran elevados en el grupo de DM2 en presencia de osteoporosis respecto al grupo de DM2 sin osteoporosis ($45,9 \pm 4,0$ vs. $31,1 \pm 1,4$; $p = 0,01$).

Los marcadores de remodelado óseo CTX y TRAP5b y fosfatasa alcalina ósea no muestran diferencias entre grupos.

Respecto a los parámetros de medida DEXA, se puede comprobar tanto en los T-scores como en DMO, que dichos valores corresponden a los criterios de selección de esta muestra de pacientes con DM2, según su estatus óseo. El grupo con osteoporosis presenta todos los parámetros de DMO y T-score con menor valor respecto al grupo sin osteoporosis.

Perfil de citocinas en pacientes según la presencia de osteoporosis en la población de DM2

Entre las citocinas estudiadas, se muestra IL-6 con una concentración sérica mayor en el grupo de DM2 con osteoporosis, respecto al grupo de DM2 sin osteoporosis ($10,9 \pm 14,6$ vs. $4,5 \pm 7,0$; $p = 0,01$). Por el contrario, la citocina IL-5 presentó menores valores en el mismo grupo de diabéticos con osteoporosis ($1,7 \pm 0,2$ vs. $3,8 \pm 0,6$; $p = 0,032$). Las citoquinas estudiadas IL-10, IL-12 (p70), TNF α e IFN γ no mostraron diferencias la comparativa de ambos grupos.

En la figura 2C, se muestran en ambos grupos de DM2, con y sin osteoporosis, gráficamente los niveles de IL-6, y en la figura 2D se muestran los niveles de IL-5 en los mismos grupos.

Por otra parte, hemos encontrado una falta de asociación en el análisis entre presencia de fracturas y las citocinas estudiadas en el grupo de diabéticos osteoporóticos.

Tabla 1. Parámetros antropométricos, bioquímicos y concentraciones de citoquinas en la población de estudio de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y grupo control

	Grupo DM2 (n=163)	Grupo control (n=47)	Valor P
Edad (años)	63±9	54±8	≤0,001*
Hombre/mujer (n)	91/72	29/18	0,028*
IMC (kg/m ²)	31,6±5,8	31,4±7,7	0,056
Glucosa (mg/dL)	159±59	90±11	≤0,001*
HbA1c (%)	8,2±1,9	4,9±0,4	≤0,001*
Creatinina (mg/dL)	1,8±8,0	0,8±0,2	0,106
Calcio (mg/dL)	10,8±9,9	9,3±0,4	≤0,001*
Fósforo (mg/dL)	3,8±3,3	3,4±0,48	0,779
25(OH)D (ng/mL)	18,2±9,9	21,3±10,8	0,069
iPTH (pg/mL)	46,3±43,9	51,7±18,7	0,003*
Osteocalcina (ng/mL)	1,4±1,2	4,3±4,9	0,002*
Fosfatasa alcalina ósea (µg/L)	15,9±9,8	13,7±7,3	0,06
CTX (ng/ml)	0,23±0,13	0,35±0,15	≤0,001*
TRAP5b (UI/L)	1,4±0,92	1,8±0,87	0,019*
Fractura vertebral (%)	27,7	0	≤0,001*
Osteoporosis (%)	43,42	0	≤0,001*
Enfermedad cardiovascular (%)	49	0	≤0,001*
Citocinas:			
IL-5 (pg/mL)	3,2±4,2	4,1±4,2	0,07
IL-10 (pg/mL)	0,5±1	0,14±0,3	0,016*
IL-2 (pg/mL)	1,3±2,8	0,3±0,6	0,57
IL-6 (pg/mL)	6,7±11,1	9,8±18	0,66
IL-12 (p70) (pg/mL)	2,9±1,6	3,9±3,1	0,027*
IL-17A (pg/mL)	2,7±2,2	2,1±1,7	0,41
TNF-α (pg/mL)	1,8±4,5	1,0±1,9	0,65
IFN-γ (pg/mL)	1,3±1,4	0,8±1,2	0,07

Los datos se muestran como media ± desviación estándar, porcentajes o número total (n) *: valor p<0,05 entre grupos.

IMC: índice de masa corporal; HbA1c: hemoglobina A1c; 25(OH)D: 25 hidroxil-vitamina D; IL: interleucina; TNFα: factor de necrosis tumoral alfa; IFNγ: interferon gamma.

Relación entre citocinas y marcadores de formación y resorción ósea

Se ha realizado un estudio de correlación entre las citocinas ensayadas y los biomarcadores de formación (fosfatasa alcalina ósea y osteocalcina) y resorción ósea (TRAP5b y CTX), en la población total, en la población diabética tipo 2, y en la población de diabéticos osteoporóticos con fracturas vertebrales prevalentes. Los resultados indican una correlación directa significativa en el caso de la fosfatasa alcalina y la interleucina 5, tanto para la población total (r=0,162, p=0,049), como para la población diabética tipo 2 (r=0,276, p=0,004). Esta última correlación se muestra en la figura 2. En el caso de la población de diabéticos osteoporóticos con fracturas vertebrales prevalentes se pierde la correlación.

DISCUSIÓN

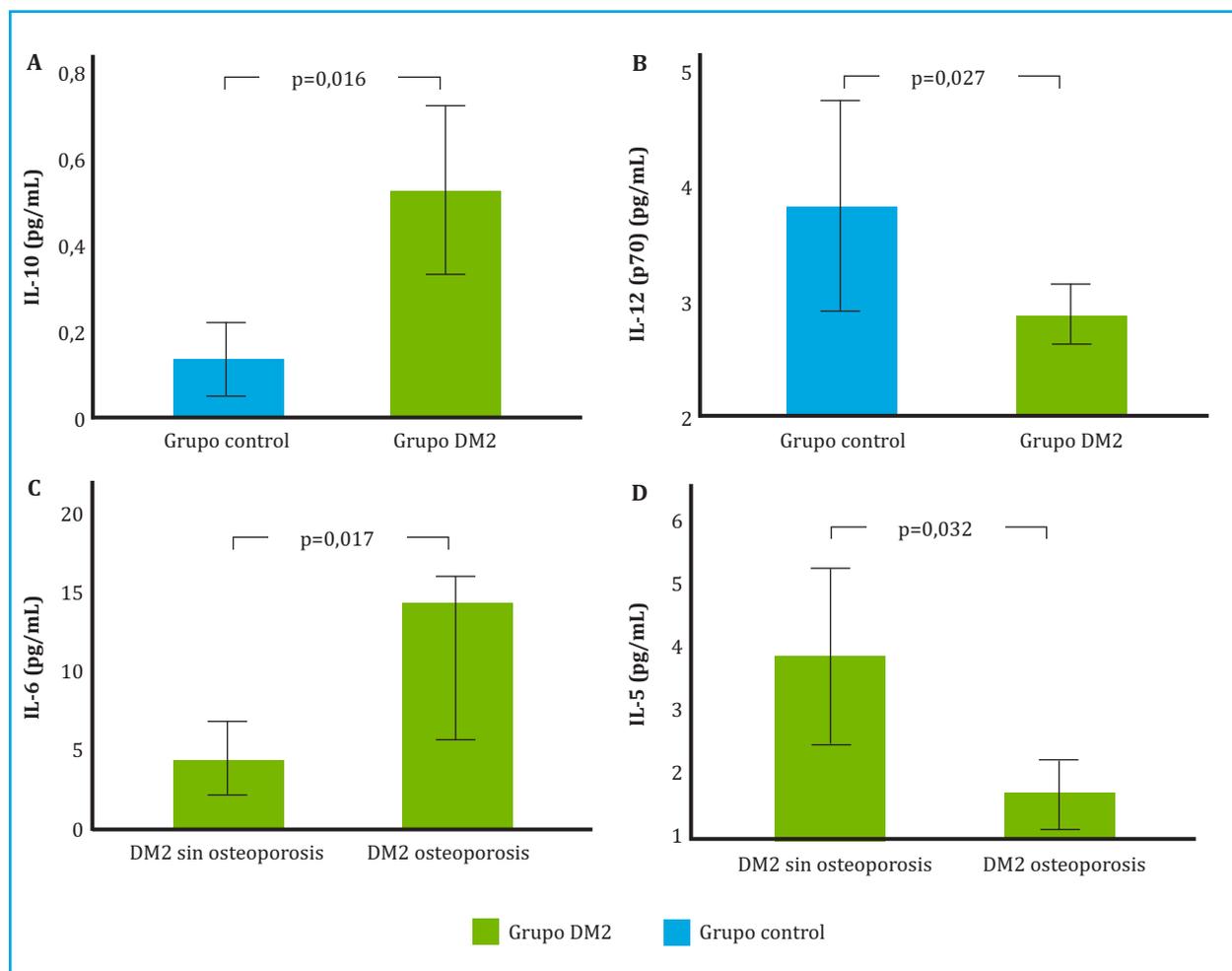
La DM2 es una enfermedad inflamatoria crónica y sistémica extremadamente compleja y multifactorial. Las evidencias clínicas demuestran que el riesgo de otras complicaciones como la osteoporosis aumenta considerablemente en estos pacientes. La resistencia a la insulina puede afectar a la secreción anormal de citocinas y

a su vez, producir alteraciones en el metabolismo óseo, resultando en un deterioro óseo y osteoporosis²³. Sin embargo, los factores concretos y los mecanismos moleculares que causan la osteoporosis en los pacientes con DM2 no han sido aún dilucidados.

En este estudio hemos explorado la relación del entorno inflamatorio con la presencia de la DM2 y la osteoporosis. En primer lugar, hemos evaluado la asociación de los niveles de diversas citocinas séricas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias (IL-2, IL-4, IL-17, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 p70, TNFα e IFNγ) en 210 individuos, de los que 163 correspondían a pacientes con DM2 y 47 individuos sanos. En segundo lugar, en la población de DM2, hemos analizado la asociación de estas citocinas con la osteoporosis, caracterizando a la población desde el punto de vista del metabolismo óseo.

Los resultados muestran concentraciones séricas de IL-10 más altas en DM2 en comparación con el grupo control, niveles menores de IL-12 (p70) en pacientes con DM2, así como concentraciones circulantes de IL-6 mayores e IL-5 menores en la población de DM2 con osteoporosis respecto a los pacientes DM2 sin osteoporosis (ver figura 1).

Figura 1. Asociación en la población completa, entre los grupos control y pacientes con diabetes mellitus tipo 2, con las concentraciones séricas de: A) IL-10 y B) IL-12 (p70). C) asociación en el grupo de pacientes con diabetes mellitus tipo 2, en relación a la presencia y ausencia de osteoporosis, con la concentración circulante de IL-6 y D) de IL-5



Un hallazgo destacado del presente estudio implica el aumento de los niveles de la citocina anti-inflamatoria IL-10, que se ha mostrado elevada en pacientes con DM2 respecto al grupo control. Previamente, se ha sugerido que esta citocina anti-inflamatoria forma parte de una compleja interacción entre moléculas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, donde los elevados niveles de estas últimas compensarían y limitarían el daño causado por el entorno inflamatorio. Esta hipótesis se formuló en el contexto tanto de la DM2, en un estudio reciente con un bajo número de pacientes ($n=25$)²⁴, como en un estudio de artrosis, donde se observa que citocinas inflamatorias como IL-6 y TNF α se expresaban paralelamente a la citocina anti-inflamatoria IL-10 como mecanismo compensatorio de la inflamación²⁵. De hecho, el papel fisiológico de IL-10 es limitar la respuesta inflamatoria inmunológica, inhibiendo la actividad de diversos tipos celulares, sobre todo, la activación de macrófagos y previniendo además la producción de otros mediadores pro-inflamatorios como IL-6 o TNF α ²⁶. Por otra parte, se ha podido comprobar que macrófagos expuestos a altos niveles de glicosa muestran una resistencia o baja respuesta al efecto de IL-10, impidiendo su acción antiinflamatoria²⁷, por lo que los altos niveles de IL-10 podrían también deberse a un intento de suplir la función con una sobreexpresión de la proteína.

Además, nuestros hallazgos están en línea a lo encontrado por Wang y colaboradores²⁸, que observaron un aumento progresivo de IL-10 entre pacientes sin DM2, prediabéticos y con diabetes tipo 2. Sin embargo, existen estudios en contraposición a nuestros resultados, tal como el llevado a cabo con 15 pacientes con DM2 respecto al mismo número de controles, en los que se observa una baja expresión de IL-10 en DM2, y sus niveles estaban correlacionados con los niveles de hemoglobina glicosilada, por lo que se propuso como predictor de la glicemia²⁹.

La citocina pro-inflamatoria IL-12 es una glicoproteína heterodimérica formada por las subunidades p40 y p35, siendo su forma bioactiva IL-12 p70³⁰. En nuestro estudio hemos encontrado una baja concentración sérica de la citocina pro-inflamatoria IL-12 p70 en pacientes con DM2 respecto a controles. Existen diversos estudios con resultados contradictorios. Así, se ha demostrado que la IL-12 aumenta en la DM2 y está implicada en la patogénesis de la aterosclerosis, las complicaciones macrovasculares, la retinopatía diabética y la disfunción endotelial, sobre todo en aquellos pacientes con mayor resistencia insulínica³¹⁻³³. Varios estudios establecen que la interrupción en la expresión de IL-12 desencadena la angiogénesis, protegiendo los tejidos endoteliales en la diabetes tipo 2. Además, se han mostrado estudios en modelos murinos de DM2 en los que

Tabla 2. Parámetros antropométricos, físicos y bioquímicos, del metabolismo óseo y concentraciones de citoquinas séricas en una subpoblación del grupo de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DM2), en relación a la presencia y ausencia de osteoporosis

	Grupo DM2 y OP (n=33)	Grupo DM2 sin OP (n=43)	Valor P
Edad (años)	59,5±5,2	56,33±6,8	0,02*
Hombre/mujer (n)	19/14	22/21	0,37
IMC (kg/m ²)	33,1±6,5	29,8±4,4	0,02*
HbA1c (%)	7,6±1,8	8,1±1,8	0,4
Glucosa (mg/dL)	163,3±65	180,5±58,5	0,08
Creatinina(mg/dL)	0,88±0,17	0,9±0,21	0,27
Calcio (mg/dL)	9,5±0,5	9,6±0,5	0,24
Fósforo (mg/dL)	3,6±0,4	3,7±0,6	0,84
25(OH)D (ng/mL)	19,2±11,8	16,5±10,6	0,38
Osteocalcina (ng/mL)	1,7±1,4	1,3±1,0	0,43
iPTH (pg/mL)	45,9±4,0	31,1±1,4	0,013*
Fosfatasa alcalina ósea (µg/L)	15,1±7,5	14,7±5,6	0,76
CTX (ng/ml)	0,24±0,1	0,18±0,09	0,14
TRAP5b (UI/L)	1,3±0,9	1,4±1,01	0,58
Fractura (%)	60,6	0	≤0,001*
Parámetros DEXA			
DMO CL (g/cm ²)	0,9±0,1	1,0±0,1	0,001*
DMO CF (g/cm ²)	0,7±0,1	0,8±0,1	0,005*
DMO CT (g/cm ²)	0,8±0,1	0,9±0,1	0,007
T-score CL	-2,0±1,4	-0,9±1,1	0,001*
T-score CF	-1,1±1,0	-0,27±0,7	0,001*
T-score CT	-1,1±1,0	-0,3±0,7	0,002*
Citocinas			
IL-5 (pg/mL)	1,7±0,2	3,8±0,6	0,032*
IL-10 (pg/mL)	0,7±1,2	0,4±0,7	0,97
IL-6 (pg/mL)	10,9±14,6	4,5±7,0	0,017*
IL-12 (p70) (pg/mL)	2,7±0,2	2,8±0,2	0,328
TNF-a (pg/mL)	1,0±2,1	1,2±1,7	0,41
IFN-g (pg/mL)	1,3±1,7	1,4±1,3	0,38

Los datos se muestran como media ± desviación estándar, porcentajes o número total (n). *: valor p<0,05 entre grupos. 25(OH)D: 25 hidroxvi-vitamina D; iPTH: paratohormona intacta; CTX: telopéptido carboxi-terminal; TRAP5b: fosfatasa ácida tartrato-resistente 5b; FAO: fosfatasa alcalina ósea; DMO: densidad mineral ósea; CL: columna lumbar; CF: cuello femoral; CT: cadera total; IL: interleucina; TNFα: factor de necrosis tumoral alfa; IFNγ: interferón gamma.

la deficiencia de IL-12³³ promueve la sobre-expresión de citocinas anti-inflamatorias y reduce la expresión de las pro-inflamatorias.

En línea con nuestros resultados, se ha observado en pacientes con DM2, un aumento de IL-10 y una disminución de IL-12 p70³⁴. En este estudio, se sugirió que la interleucina IL-10 suprime la activación de las células Th1, que requieren IL-12 para su diferenciación. De esta forma, el nivel reducido de IL-12 y la elevada concentración de IL-10 encontrada en nuestro estudio en los pacientes con DM2, contribuirían a detener la activación de la subpoblación de células Th1, principales productoras de la citocina pro-inflamatoria IFNγ, dando como resultado la homeostasis de tejidos relevantes.

Así, en nuestro estudio observamos que las diferencias encontradas en los niveles de citocinas entre pacientes con DM2 y controles parecen ser opuestas a lo que

se esperaría en hiperglucemia, una elevación de citocinas pro-inflamatorias y disminución de las anti-inflamatorias. Ello podría indicar una respuesta al incremento de la inflamación derivada de la hiperglucemia, más que a los factores intrínsecos a la DM2.

La citocina IL-6 se ha descrito en múltiples estudios epidemiológicos como un potente predictor de diabetes, sugiriéndose que interfiere en la señal insulínica y altera la función de las células beta^{35,36}. Nosotros hemos investigado el potencial de la IL-6 como factor implicado en la osteoporosis en los pacientes con DM2, sin que hayamos encontrado referencias extensivas en la bibliografía sobre esta temática. La citocina IL-6 efectúa dos funciones paralelas que agravan la condición osteoporótica: estimula los osteoclastos e inhibe la actividad de los osteoblastos, traduciéndose en una pérdida de densidad ósea³⁷. Este efecto de pérdida de densidad ósea se ha

mostrado principalmente en mujeres menopáusicas³⁸. Aquí se muestra que la IL-6 está también aumentada en pacientes DM2 con osteoporosis. La interleucina anti-inflamatoria IL-5 se ha mostrado en menores niveles en pacientes con DM2 y osteoporosis. Además, hemos observado una relación directa de esta IL-5 con el marcador de actividad osteoblástica fosfatasa alcalina ósea.

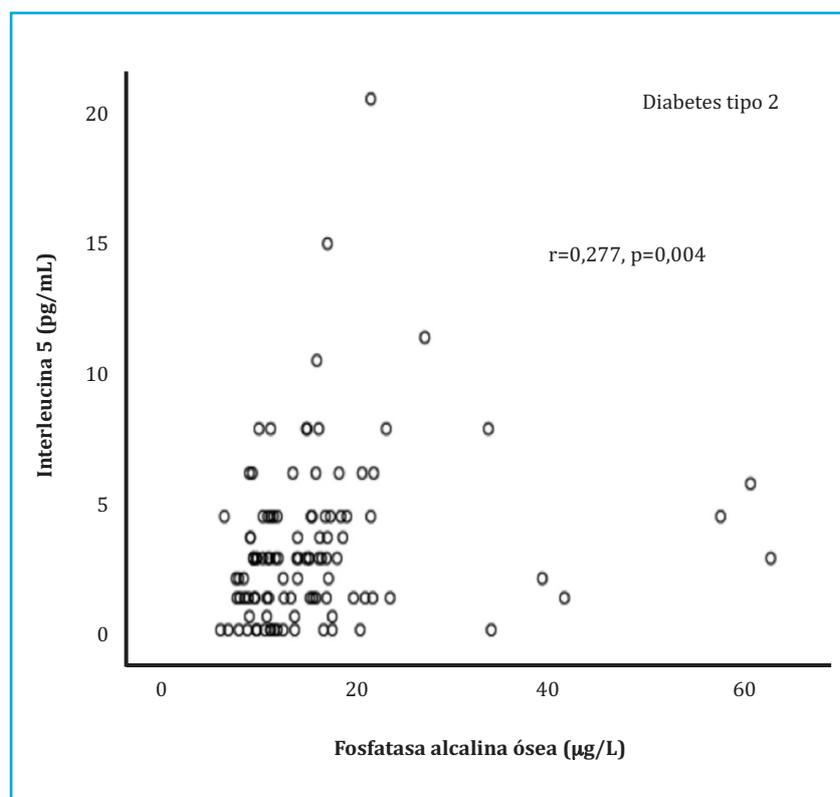
Estos resultados deben ampliarse con estudios de mayor envergadura que aclaren el papel de la asociación de los marcadores inflamatorios, la DM2 y la osteoporosis, así como su posible ampliación a la intervención terapéutica.

CONCLUSIONES

La DM2 es una enfermedad con un bajo grado de inflamación crónica, siendo extremadamente compleja y multifactorial. En este estudio hemos demostrado que los pacientes con DM2 tienen niveles alterados de algunas citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, que podrían ser factores implicados en la evolución de la enfermedad. El perfil inflamatorio varía dependiendo de la progresión de la enfermedad, de la presencia o ausencia de osteoporosis en los pacientes con DM2. Teniendo en cuenta la existencia de perfiles diferenciados, sería necesario desarrollar opciones más precisas para el tratamiento de los pacientes, e incluirlos en las guías de práctica clínica.

Agradecimientos: Este estudio ha sido financiado con las ayudas para realización de proyectos otorga-

Figura 2. Gráfico de correlación mostrando la relación entre IL-5 y el biomarcador de formación ósea fosfatasa alcalina ósea en la subpoblación de pacientes con diabetes mellitus tipo 2



das por las fundaciones FEIOMM y SEEN, así como por el proyecto de la Consejería de Salud y familias PI-0450-2019.

Además, el Dr. Jiménez-López agradece la financiación al programa de investigación Europeo Marie Curie (FP7--PEOPLE-2011-IOF, número de referencia PIOF-GA-2011-301550), así como al Ministerio de Economía, Industria y Competitividad por el proyecto del programa Ramón y Cajal (RYC-2014-16536) y el proyecto BFU2016-77243-P.



Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Bibliografía

- Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. *Lancet Lond Engl*. 2016 Apr 9;387(10027):1513-30.
- Koh W-P, Wang R, Ang L-W, Heng D, Yuan J-M, Yu MC. Diabetes and Risk of Hip Fracture in the Singapore Chinese Health Study. *Diabetes Care*. 2010 Aug 1;33(8):1766.
- Li G, Prior JC, Leslie WD, Thabane L, Papaioannou A, Josse RG, et al. Frailty and Risk of Fractures in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2019 Apr 1;42(4):507.
- Bonds DE, Larson JC, Schwartz AV, Strotmeyer ES, Robbins J, Rodriguez BL, et al. Risk of Fracture in Women with Type 2 Diabetes: the Women's Health Initiative Observational Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Sep;91(9):3404-10.
- Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Relative fracture risk in patients with diabetes mellitus, and the impact of insulin and oral antidiabetic medication on relative fracture risk. *Diabetologia*. 2005 Jul;48(7):1292-9.
- Napoli N, Strollo R, Paladini A, Briganti SI, Pozzilli P, Epstein S. The Alliance of Mesenchymal Stem Cells, Bone, and Diabetes. *Int J Endocrinol*. 2014;2014:1-26.
- on behalf of the Bone and Diabetes Working Group of IOF, Ferrari SL, Abrahamsen B, Napoli N, Akesson K, Chandran M, et al. Diagnosis and management of bone fragility in diabetes: an emerging challenge. *Osteoporos Int*. 2018 Dec;29(12):2585-96.
- Hofbauer LC, Brueck CC, Singh SK, Dobnig H. Osteoporosis in Patients With Diabetes Mellitus. *J Bone Miner Res*. 2007 May 14;22(9):1317-28.
- de Liefde II, van der Klift M, de Laet CEDH, van Daele PLA, Hofman A, Pols HAP. Bone mineral density and fracture risk in type-2 diabetes mellitus: the Rotterdam Study. *Osteoporos Int*. 2005 Dec 1;16(12):1713-20.
- Hanley D, Brown J, Tenenhouse A, Olszynski W, Ioannidis G, Berger C, et al. Associations Among Disease Conditions, Bone Mineral Density, and Prevalent Vertebral Deformities in Men and Women 50 Years of Age and Older: Cross-Sectional Results From the Canadian Multicentre Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res*. 2003 Apr 1;18(4):784-90.
- Melton LJ, Riggs BL, Leibson CL, Achenbach SJ, Camp JJ, Boussein ML, et al. A Bone Structural Basis for Fracture Risk in Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Dec 1;93(12):4804-9.
- Botella Martínez S, Varo Cenarruzabeitia N, Escalada San Martín J, Calleja Canelas A. The diabetic paradox: Bone mineral density and fracture in type 2 diabetes. *Endocrinol Nutr Engl Ed*. 2016 Nov;63(9):495-501.
- Reyes-García R, Rozas-Moreno P, López-Gallardo G, García-Martín A, Varsavsky M, Avilés-Perez MD, et al. Serum levels of bone resorption markers are decreased in patients with type 2 diabetes. *Acta Diabetol*. 2013 Feb;50(1):47-52.
- Hayashino Y, Jackson JL, Hirata T, Fukumori N, Nakamura F, Fukuhara S, et al. Effects of exercise on C-reactive protein, inflammatory cytokine and adipokine in patients with type 2 diabetes: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Metabolism*. 2014 Mar;63(3):431-40.
- Hameed I, Masoodi SR, Mir SA, Nabi M, Ghazanfar K, Ganai BA. Type 2 diabetes mellitus: From a metabolic disorder to an inflammatory condition. *World J Diabetes*. 2015 May 15;6(4):598-612.
- Tilling LM, Darawil K, Britton M. Falls as a complication of diabetes mellitus in older people. *J Diabetes Complications*. 2006 Jun;20(3):158-62.
- Harmer D, Falank C, Reagan MR. Interleukin-6 Interweaves the Bone Marrow Microenvironment, Bone Loss, and Multiple Myeloma. *Front Endocrinol*. 2019 Jan 8;9:788.
- Sloan-Lancaster J, Abu-Raddad E, Polzer J, Miller JW, Scherer JC, De Gaetano A, et al. Double-Blind, Randomized Study Evaluating the Glycemic and Anti-inflammatory Effects of Subcutaneous LY2189102, a Neutralizing IL-1 β Antibody, in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2013 Aug 1;36(8):2239.
- Cavelti-Weder C, Babians-Brunner A, Keller C, Stahel MA, Kurz-Levin M, Zayed H, et al. Effects of gevokizumab on glycemia and inflammatory markers in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2012 Aug;35(8):1654-62.
- Cavelti-Weder C, Timper K, Seelig E, Keller C, Osranek M, Lässig U, et al. Development of an Interleukin-1 β Vaccine in Patients with Type 2 Diabetes. *Mol Ther*. 2016 May 1;24(5):1003-12.
- Kanis JA, Melton LJ, Christiansen C, Johnston CC, Khaltaev N. The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res*. 2009 Dec 3;9(8):1137-41.
- Genant HK, Wu CY, van Kuijk C, Nevitt MC. Vertebral fracture assessment using a semiquantitative technique. *J Bone Miner Res*. 2009 Dec 3;8(9):1137-48.
- Heilmeier U, Patsch JM. Diabetes and Bone. *Semin Musculoskelet Radiol*. 2016 Jul;20(3):300-4.
- Randeria SN, Thomson GJA, Nell TA, Roberts T, Pretorius E. Inflammatory cytokines in type 2 diabetes mellitus as facilitators of hypercoagulation and abnormal clot formation. *Cardiovasc Diabetol*. 2019 Jun 4;18(1):72.
- Botha-Scheepers S, Watt I, Slagboom E, de Craen AJM, Meulenbelt I, Rosendaal FR, et al. Innate production of tumour necrosis factor alpha and interleukin 10 is associated with radiological progression of knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2008 Aug;67(8):1165-9.
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:683-765.
- Barry JC, Shakibakho S, Durrer C, Simtchouk S, Jawanda KK, Cheung ST, et al. Hyporesponsiveness to the anti-inflammatory action of interleukin-10 in type 2 diabetes. *Sci Rep*. 2016 Feb 17;6:21244.
- Wang Z, Shen X-H, Feng W-M, Ye G-F, Qiu W, Li B. Analysis of Inflammatory Mediators in Prediabetes and Newly Diagnosed Type 2 Diabetes Patients. *J Diabetes Res*. 2016;2016:7965317.
- Acharya AB, Thakur S, Muddapur MV. Evaluation of serum interleukin-10 levels as a predictor of glycemic alteration in chronic periodontitis and type 2 diabetes mellitus. *J Indian Soc Periodontol*. 2015;19(4):388-92.
- Gee K, Guzzo C, Che Mat NF, Ma W, Kumar A. The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2009 Mar;8(1):40-52.
- Mishra M, Kumar H, Bajpai S, Singh RK, Tripathi K. Level of serum IL-12 and its correlation with endothelial dysfunction, insulin resistance, proinflammatory cytokines and lipid profile in newly diagnosed type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011 Nov;94(2):255-61.
- Uyemura K, Demer LL, Castle SC, Jullien D, Berliner JA, Gately MK, et al. Cross-regulatory roles of interleukin (IL)-12 and IL-10 in atherosclerosis. *J Clin Invest*. 1996 May 1;97(9):2130-8.
- Radwan E, Mali V, Haddox S, Trebak M, Souad B, Matrougui K. Essential role for interleukin-12 in microvascular endothelial dysfunction in type 2 diabetes. *FASEB J*. 2017 Apr 1;31(1_supplement):681.11-681.11.
- Nunez Lopez YO, Garufi G, Seyhan AA. Altered levels of circulating cytokines and microRNAs in lean and obese individuals with prediabetes and type 2 diabetes. *Mol Biosyst*. 2016 Dec 20;13(1):106-21.
- Sloan-Lancaster J, Abu-Raddad E, Polzer J, Miller JW, Scherer JC, De Gaetano A, et al. Double-Blind, Randomized Study Evaluating the Glycemic and Anti-inflammatory Effects of Subcutaneous LY2189102, a Neutralizing IL-1 β Antibody, in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2013 Aug 1;36(8):2239.
- Liu C, Feng X, Li Q, Wang Y, Li Q, Hua M. Adiponectin, TNF- α and inflammatory cytokines and risk of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Cytokine*. 2016 Oct 1;86:100-9.
- Pietschmann P, Mechtcheriakova D, Meshcheryakova A, Foger-Samwald U, Ellinger I. Immunology of Osteoporosis: A Mini-Review. *Gerontology*. 2016;62(2):128-37.
- Scheidt-Nave C, Bismar H, Leidig-Bruckner G, Woitge H, Seibel MJ, Ziegler R, et al. Serum Interleukin 6 Is a Major Predictor of Bone Loss in Women Specific to the First Decade Past Menopause*. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 May 1;86(5):2032-42.