

Artículo Original

Marcadores de inflamación y autoinmunidad en pacientes con diabetes tipo 1

Viviana Arroyo J.¹, Patricia Camacho G.¹, Karla Vásquez O.¹, Cristian Flores R.¹, Alejandra Ávila A.², Ethel Codner D.² y Francisco Pérez B.¹

Inflammatory and autoimmune markers in patients with type 1 diabetes

¹Laboratorio de Genómica Nutricional. Departamento de Nutrición. Facultad de Medicina. Universidad de Chile.
²Instituto de Investigaciones Materno Infantil (DIMI). Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

Ninguno de los autores recibió ayuda financiera de ningún tipo en la realización de este manuscrito.

Correspondencia:

Dr. Francisco Pérez Bravo
Laboratorio de Genómica Nutricional, Departamento de Nutrición, Facultad de Medicina Universidad de Chile.
Independencia 1027 (3° piso), Santiago, Chile.
Teléfono: 56-2-978 62 42
E-mail: fperez@med.uchile.cl

Recibido: 15 de noviembre de 2013
Aceptado: 23 de diciembre de 2013

Objectives: To determine the serological levels of inflammatory markers and autoimmunity in patients with T1D compared with controls, and determined its relation to the duration of diabetes. **Methods:** We selected 139 patients with T1D without chronic complications of diabetes, and 110 control subjects without family history of diabetes. Serological ultrasensitive C-reactive protein levels (usCRP), interleukin-6 and adhesion protein VCAM through ELISA assay were determined. Autoimmune profile was also analyzed through GAD65, IA-2 and ZnT8 autoantibodies. **Results:** Increased levels of usCRP 1.74 (0.10 to 13.6) vs 1.08 (0.40 to 3.70) ng/ml ($p < 0.03$), VCAM 236.0 (122.2 to 693.5) vs 185.4 (101.3 to 421.3) ng/ml, $p < 0.02$ and IL-6 1.73 (0.40 to 9.10) vs 1.28 (0.30 to 4.60) ng/ml, $p < 0.05$ was found in the group of T1D patients compared with the control group. When analyzing inflammatory markers according to age groups (0-10 years and ≥ 10 years), the values of usCRP were higher in the second group. There was no significant association between patients with DM1 and autoimmune positive profile with a higher frequency of markers of inflammation. **Conclusions:** These results suggest the presence of pro-inflammatory state is considerably more frequent in patients with T1D. The increased level of usCRP and IL-6 and according to age of the patients could indicate a possible role of adiposity and weight gain during the adolescence in the higher frequency of inflammatory markers in T1D patients.

Key words: Inflammation, autoimmunity, GAD65, usPCR, IL-6, IA-2.

Introducción

La diabetes tipo 1 (DM1) es un trastorno autoinmune dirigido a las β -células en el páncreas resultante de un proceso autoinmune mediado por células T¹. Corresponde a una de las enfermedades pediátricas más complejas desde la perspectiva epidemiológica y genética^{2,3}. Muchos estudios y recientes revisiones han demostrado que la mayoría de los países muestra un incremento progresivo y sostenido de la DM1 en los últimos años⁴. La explosión epidemiológica de nuevos casos ha centrado la atención en los múltiples factores de riesgo involucrados tales como: la predisposición genética, la dieta, la estacionalidad, los agentes virales, la geografía, la autoinmunidad y la higiene ambiental⁵⁻⁸. Desde el punto de vista inmunológico, la presencia de autoanticuerpos contra epítopes pancreáticos como anticuerpos

anti-insulina (AIA), la isoforma 65 kDa de la decarboxilasa del ácido glutámico, auto-anticuerpos (GAD65), y los anticuerpos asociados a insulinoma (IA-2), son indicadores altamente predictivos del riesgo para desarrollar DM1 cuando se presentan con títulos altos⁹. Se postula que la seroconversión podría ocurrir a edades tempranas (< 10 años de edad), sin embargo, se ha demostrado que la autoinmunidad puede ocurrir a cualquier edad^{10,11}.

Dentro de las complicaciones clínicas de la DM1 las anomalías vasculares han sido poco descritas tanto en niños como en adolescentes; sin embargo ciertas alteraciones ligadas a aspectos funcionales y estructurales del endotelio pueden presentarse en estos pacientes incluso antes de las manifestaciones clínicas de angiopatía.

Los mecanismos inflamatorios que se pueden presentar en las fases tempranas de la diabetes determinan un incre-

mento en los niveles séricos de distintas citoquinas como la interleuquina-6 (IL-6), y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), que por vía portal se trasladan al hígado promoviendo la síntesis de proteínas de fase aguda tales como la proteína C reactiva (PCR). La PCR estimula la expresión endotelial de moléculas de adhesión como E-selectina (E-S), VCAM-1 y molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), favoreciendo así el desarrollo acelerado de otras alteraciones^{12,13}. La participación de la inflamación en el proceso de aterosclerosis ha llevado a la utilización de indicadores inflamatorios en la predicción de riesgo cardiovascular. La proteína C reactiva es uno de los biomarcadores más aceptado porque refleja apropiadamente el proceso inflamatorio subyacente y se correlaciona con otras moléculas como VCAM-1 e, IL-6¹³. También la PCR ultrasensible (usPCR) es considerada un predictor de mortalidad cardiovascular. Este estudio se propuso evaluar el perfil inflamatorio de pacientes con DM1 y analizar su posible asociación con autoinmunidad y estatus metabólico.

Pacientes y Metodología

El estudio fue realizado en Santiago, Chile con pacientes diabéticos tipo 1 diagnosticados a través de métodos estandarizados (WHO Dia Mond Project) durante el período comprendido entre marzo de 2011 y diciembre de 2013. Se incluyeron 139 casos diagnosticados durante este período (edad promedio $9,5 \pm 4,2$ años, rango de edad 4 a 17 años) y 110 controles, sin diabetes, ni antecedentes de patologías autoinmunes (edad promedio $14,8 \pm 3,2$ años, rango de edad 10 a 19 años). Las muestras de sangre pertenecientes a los pacientes diabéticos fueron obtenidas dentro de un período de tiempo cercano al debut (10-40 días). Todos los pacientes, controles y sus padres firmaron un consentimiento informado para participar en esta investigación. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina e IDIMI de la Universidad de Chile.

Análisis de autoinmunidad

Los anticuerpos anti-GAD65, anti-IA2 y anti-ZnT8 fueron determinados mediante inmunoensayo enzimático (ELISA) con el uso de kits comerciales (Medizym® Diagnostic, Berlín, Alemania). La detección de anticuerpos se llevó a cabo de manera semi-cuantitativa tomando como referencia de positividad el valor de 5 UI/mL para GAD65 y 10 UI/mL para IA2 y ZnT8. Aquellas muestras con un título mayor o igual a dicho valor fueron consideradas muestras positivas. Se obtuvo una sensibilidad y especificidad del 92,3%, 98,6% para anti-GAD 65, 85% y 98% para anti-IA-2 y 94% y 98,2% para anti-ZnT8. Todas las muestras fueron tratadas en duplicado y los valores detectados se encontraron dentro de los rangos esperados para un ELISA de acuerdo al programa DASP, Diabetes Antibody Standardization Program¹⁰.

Análisis de marcadores de inflamación

Las muestras se recolectaron en un tubo de separación

de 1,5 ml de suero y se les permitió coagular durante 1 h a temperatura ambiente. Después se centrifugaron durante 10 min a 4° C y el suero se dividió en alícuotas y se almacenaron a -80° C para su uso posterior.

La Proteína C reactiva ultra sensibilidad (usCRP) y los niveles de IL-6 y vCAM se midieron mediante un kit comercial de diagnóstico BioVendor y R & D, respectivamente, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El inmunoensayo Quantikine Human IL-6 y vCAM corresponde a un ELISA en fase sólida diseñado para medir ambas proteínas en suero y plasma. El coeficiente intra-ensayo fue de 2,6% y 2,1%, y el coeficiente inter-ensayo fue del 3,8% y 4,2% respectivamente. Para la determinación de usPCR se utilizó un ELISA competitivo alta sensibilidad. Este es un ELISA de tipo sándwich con un límite de detección de 0,02 ug/ml. El intraensayo intra fue del 4,4% y la inter-ensayo fue de 5,7%.

Análisis estadístico

Las comparaciones de las variables continuas del estudio se realizaron mediante prueba t de Student y la comparación del perfil de anticuerpos se realizó a través de análisis de proporciones. Un valor de p menor de 0,05 fue considerado como estadísticamente significativo.

Resultados

La Tabla 1 muestra las características clínicas y antropométricas de los pacientes con DM1 y controles desde el punto de vista de su edad, edad de diagnóstico, IMC y porcentaje de autoanticuerpos. No se observaron diferencias significativas al comparar ambos grupos. El título positivo de auto-anticuerpos alcanzó al 75,7% entre los pacientes con DM1 y fue negativo en el grupo control.

La Tabla 2 presenta la información relacionada al perfil inflamatorio y estatus metabólico en pacientes con DM1 y controles. Al respecto, el perfil de marcadores de inflamación fue significativamente mayor en los pacientes con DM1 *versus* los controles: vCAM mostró una mediana de 236,0 en pacientes y 185,4 en controles ($p < 0,02$). La IL-6 alcanzó una mediana de 1,73 en pacientes con DM1 *versus* 1,28 en controles ($p < 0,05$) y finalmente la usPCR mostró una mediana de 1,74 en pacientes *versus* 1,08 en controles

Tabla 1. Características clínicas y antropométricas de ambos grupos

	Grupo DM1	Grupo Control
n	139	110
Edad (años)	$9,5 \pm 4,2$	$14,8 \pm 3,2$
Edad Diagnóstico (años)	$10,5 \pm 7,5$	-
IMC (kg/m ²)	$23,9 \pm 1,4$	$25,6 \pm 3,4$
Autoanticuerpos positivos (%)	75,7	0,0

Artículo Original

Tabla 2. Distribución de biomarcadores de inflamación y estatus metabólico en pacientes con DM1 y controles

Biomarcadores	Casos DM1 (n = 139)	Controles (n = 110)	p-value
vCAM (ng/ml)	236,0 (122,2-693,5)	185,4 (101,3-421,3)	< 0,02
usPCR (ng/ml)	1,74 (0,1-13,6)	1,08 (0,4-3,7)	< 0,03
HbA1c (%)	10,6 (7,3-15,1)	4,9 (4,1-5,5)	< 0,001
Péptido C (ng/ml)	0,29 ± 0,18	1,56 ± 0,13	< 0,001
IL-6 (ng/ml)	1,73 (0,4-9,1)	1,28 (0,3-4,6)	< 0,05
Cetoacidosis (%)	66,3	-	
Glicemia al debut (mmol/L)	29,9 ± 13,4	-	

($p < 0,03$). La frecuencia de este marcador alterado (usPCR > 3) fue del 10% en pacientes con DM1 y del 2% en controles. Los pacientes positivos para el perfil inflamatorio elevado correspondieron mayoritariamente a pacientes con DM1 mayores de 10 años. No se encontró ninguna asociación estadísticamente relevante entre el perfil inflamatorio elevado con: autoinmunidad positiva, cetoacidosis, IMC o glicemia al debut.

Discusión

El Péptido C, en personas sanas se encuentra circulando en concentraciones del orden de los nanogramos, pero, en pacientes diabéticos se encuentra ausente o severamente disminuido¹⁴. Esto se condice con lo observado en este estudio, donde los niveles de Péptido C fueron significativamente menores en pacientes con DM1 en comparación con los controles. Existe evidencia de que esta molécula tiene actividad biológica importante preventiva de daño vascular; previene la muerte celular inducida, por ejemplo, por altos niveles de glucosa sanguíneos, tiene efectos citoprotectores mediante la disminución plasmática de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 e IL-6), y disminuye la expresión de ICAM-1, VCAM-1 y Selectina P¹⁴.

La usPCR, además de ser un sensible marcador de inflamación, es considerada un factor de riesgo de aterosclerosis y mortalidad cardiovascular. Se han referido niveles elevados de usPCR en pacientes con DM2, diabetes gestacional, síndrome metabólico y obesidad. También se han observado resultados similares en adultos con DM1.

Los resultados del presente trabajo mostraron que la usPCR está aumentada en niños y adolescentes con DM1, coincidiendo con los encontrados por otros investigadores¹⁵. Además, Juonola y col.¹⁶ observaron que niveles elevados de usPCR estaban asociados al desarrollo de aterosclerosis en individuos jóvenes, sugiriendo que este marcador colabora en la apreciación del riesgo cardiovascular en la infancia. Por lo tanto, sería importante la realización de estudios prospectivos que permitan confirmar la utilidad de la usPCR como marcador de riesgo cardiovascular en niños con DM1.

La disfunción endotelial es una de las primeras etapas

en el proceso de aterosclerosis. Las moléculas de adhesión como las selectinas, ICAM-1 y VCAM-1, secretadas como consecuencia de la activación de las células endoteliales, son consideradas, en la actualidad, como marcadores emergentes de aterosclerosis.

Coincidiendo con otros autores, este estudio muestra que los niveles de VCAM-1 en una población infanto-juvenil con DM1 se encuentran significativamente aumentados respecto al grupo control. Del mismo modo Katakami y col.¹⁷ obtuvieron resultados similares estudiando adultos jóvenes con DM1 sin complicaciones vasculares. Estos resultados indican que la activación endotelial podría presentarse en niños con DM1 en etapas muy precoces antes del proceso aterosclerótico propiamente tal.

Algunos estudios han encontrado correlación positiva entre los niveles de usPCR y las moléculas de adhesión VCAM-1. Al respecto, Schram y col.¹⁸ describen este fenómeno en pacientes adultos con DM1.

La inflamación juega un importante rol en el proceso arteriosclerótico y los marcadores de inflamación, tales como la usPCR y la IL-6, se han correlacionado con el grado de arteriosclerosis en adultos y adolescentes con diabetes. Snell-Bergeon y cols.¹⁹ determinaron que en individuos con DM1 existe una correlación positiva entre los niveles de usPCR y fibrinógeno, colesterol total, colesterol LDL y apoB, mientras que existe una correlación negativa entre IL-6 y los niveles de colesterol HDL; por lo tanto, mayores niveles de usPCR e IL-6 implicarían un mayor riesgo aterosclerótico a través de este mecanismo.

Niveles aumentados de usPCR también han sido asociados a la presencia de ciertas complicaciones de la diabetes, como la cetoacidosis, la cual, ocurre generalmente en pacientes con un bajo control de la enfermedad o que han sido recientemente diagnosticados¹⁸. Posteriormente, los niveles de usPCR pueden ser comparables a los sujetos sin diabetes, y finalmente elevarse en relación a los procesos inflamatorios que conllevan a las complicaciones crónicas. En este estudio no se observó asociación significativa entre marcadores de inflamación (usPCR, IL-6 o VCAM) y mayor frecuencia de cetoacidosis. De forma similar, no hubo asociación entre estos marcadores y una mayor frecuencia de autoanticuerpos.

Agradecimientos

Este estudio ha sido parcialmente financiado por el PROYECTO FONDECYT N° 1130240.

Referencias bibliográficas

- Morran MP, Omenn GS, Pietro Paolo M. 2008. Immunology and genetics of type 1 diabetes. *Mount Sinai J Med* 75: 314-327.
- Concannon P, Rich S, Nepom GT. 2009. Genetics of type 1A diabetes. *N Engl J Med* 360: 1646-1651.
- Van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG. 2011. Type 1 diabetes: etiology, immunology and therapeutic strategies. *Physiol Rev* 91: 79-118.
- Vehik K, Dabelea D. 2011. The changing epidemiology of type 1 diabetes: why it is going through the roof? *Diab Metab Res Rev* 27: 3-13.
- Norris JM, Barriga K, Klingensmith G, Hoffman M, Eisenbarth GS, Erlich HA, Rewers M. 2003. Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity. *JAMA* 290: 1713-1720.
- Lefebvre D, Powell K, Strom A, Scott F. 2006. Dietary Proteins as Environmental Modifiers of Type 1 Diabetes Mellitus. *Ann Rev Nutr* 26: 175-202.
- van der Werf N, Kroese F, Rozing J, Hillebrands JL. 2007. Viral infections as potential triggers of type 1 diabetes. *Diab Metab Res Rev* 23: 169-183.
- Gale EA. 2002. A missing link in the hygiene hypothesis? *Diabetologia* 45: 588-594.
- Colman PG, McNair PD, Gellert S, Kewming K, Schmidli RS, Steele CE, Harrison LC. 2002. Development of autoantibodies to islet antigens during childhood: implications for preclinical type 1 diabetes screening. *Pediatr Diabetes* 3: 144-148.
- Orban T, Sosenko JM, Cuthbertson D, Krischer JP, Skyler JS, Jackson R, et al. 2009. Pancreatic islet autoantibodies as predictors of type 1 diabetes in the Diabetes Prevention Trial-Type 1. *Diab Care* 32: 2269-2274.
- Litherland SA. 2008. Immunopathogenic interaction of environmental factors triggers and genetic susceptibility in diabetes: is epigenetic the missing link? *Diabetes* 57: 3184-3185.
- Hartge MM, Unger T, Kintscher U. 2007. The endothelium and vascular inflammation in diabetes. *Diabetes Vasc Dis Res* 4: 84-8.
- Targher G, Bertolini L, Zoppini G, Zerani L, Falezza G. 2005. Increased plasma markers of inflammation and endothelial dysfunction and their association with microvascular complications in Type 1 diabetic patients without clinically manifest macroangiopathy. *Diabetes Uk. Diabetic Medicine* 22: 999-1004.
- Luppi P, Kallas A, Wahren J. 2012. Can C-peptide mediated anti-inflammatory effects retard the development of microvascular complications of type 1 diabetes? *Diabetes Metab Res Rev* 29 (5): 357-62.
- Snell-Bergeon JK, West NA, Mayer-Davis EJ, Liese AD, Marcovina SM, D'Agostino RB, Jr. 2010. Inflammatory markers are increased in youth with type 1 diabetes: the SEARCH Case-Control study. *J Clin Endocrinol Metab* 95 (6): 2868-76.
- Juonala M, Viikari J, Rönkämaa T, Taittonen L, Marniemi J, Raitakari O. 2006. Childhood C-reactive protein in predicting CRP and carotid intima-media thickness in adulthood: The cardiovascular risk in young Finns study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 1883-8.
- Katakami N, Kaneto H, Matsuhisa M. 2007. Serum interleukin-18 levels are increased and closely associated with various soluble adhesion molecule levels in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* 20: 159-61.
- Schram MT, Chaturvedi N, Schalkwijk C. 2003. Vascular risk factors and markers of endothelial function as determinants of inflammatory markers in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 26: 2165-73.
- Ma SG, Jin Y, Xu W, Hu W, Bai F, Wu XJ. 2012. Increased serum levels of ischemia-modified albumin and C-reactive protein in type 1 diabetes patients with ketoacidosis. *Endocrine* 42 (3): 570-6.