

# Granulocitos de baja densidad: Un nuevo marcador de deterioro óseo en pacientes en diálisis peritoneal

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2022000400003>

Ulloa-Clavijo C<sup>1,2</sup>, Martín-Vírgala J<sup>2,3^</sup>, Gómez-Alonso C<sup>2,4^</sup>, Fernández-Mariño B<sup>5^</sup>, Rodríguez-Carrio J<sup>6^</sup>, Carrillo-López N<sup>2,3</sup>, Sobrino-Díaz L<sup>7</sup>, Rodríguez C<sup>7</sup>, Rodríguez-García M<sup>2,3,7</sup>, Suarez A<sup>6</sup>, Dusso A<sup>2,8</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Hemodiálisis, Fundación Hospital de Jove, Gijón (España)

<sup>2</sup> Unidad de Investigación Ósea y Mineral, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Oviedo (España)

<sup>3</sup> Redes de Investigación Cooperativa Orientadas a Resultados en Salud (RICORS), RICORS2040 (Kidney Disease) (España)

<sup>4</sup> Unidad de Gestión Clínica de Metabolismo Óseo y Mineral, Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), Oviedo (España)

<sup>5</sup> Servicio de Radiología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo (España)

<sup>6</sup> Área de Inmunología, Departamento de Biología Funcional, Universidad de Oviedo; Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Oviedo (España)

<sup>7</sup> Área de Gestión Clínica de Nefrología, Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), Oviedo (España)

<sup>8</sup> Division of Endocrinology, Metabolism and Lipid Research, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri (EEUU)

<sup>^</sup> Igual contribución como segundos autores

Fecha de recepción: 29/05/2022 - Fecha de aceptación: 31/07/2022

## Resumen

**Objetivo:** En enfermos renales, la enfermedad ósea-metabólica, la inflamación sistémica y la malnutrición exacerban el riesgo de calcificación vascular (CV) y la morbimortalidad. Dada la fuerte asociación entre CV y fracturas por fragilidad, el objetivo de este estudio es evaluar la contribución de los mayores determinantes de CV al deterioro óseo en pacientes en diálisis peritoneal (DP).

**Métodos:** En 31 pacientes no diabéticos en DP (>6 meses), se estudiaron marcadores de alteraciones del metabolismo óseo, daño vascular, inflamación y desnutrición, y su impacto en el deterioro óseo (osteopenia radiológica y/o antecedentes de fractura por fragilidad).

**Resultados:** En estos pacientes, (20 varones y 11 mujeres; edad=54±15 y 60±11 años respectivamente (p=0,24)), la prevalencia de fracturas por fragilidad fue de 5% en hombres y del 27% en mujeres. El deterioro óseo fue mayor en personas de edad avanzada, sexo femenino, índices de Charlson y Kauppila elevados, menor masa muscular y con expansión de una subpoblación altamente inflamatoria de granulocitos inmaduros de baja densidad (LDGi). Un análisis de regresión logística demostró que el riesgo de deterioro óseo está más influenciado por el sexo femenino que por la edad y que, de los múltiples factores asociados a mayor deterioro óseo estudiados, sólo la expansión de LDGi estima el riesgo de alteraciones óseas en estos pacientes independientemente de su edad y sexo.

**Conclusión:** La expansión de LDGi provee de un biomarcador certero para el diagnóstico de deterioro óseo y para monitorizar estrategias que atenúen su progresión en pacientes en DP de cualquier edad y sexo.

**Palabras clave:** Fracturas por fragilidad, metabolismo óseo, calcificación vascular, inflamación, riesgo cardiovascular, desnutrición.

## INTRODUCCIÓN

El concepto de enfermedad metabólica ósea asociada a la enfermedad renal crónica (CKD-MBD, Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder) para referirse a las anomalías óseas (osteodistrofia), de laboratorio (calcio, P, vitamina D, paratohormona -PTH-, factor de crecimiento fibroblástico 23 -FGF23- y Klotho) y de calcificación vascular (CV) o de tejidos blandos que acontecen en el enfermo renal está asentado desde 2007 y convergen en un

incremento de riesgo cardiovascular (RCV), riesgo de fractura y, en definitiva un exceso de morbi-mortalidad<sup>1,2</sup>.

La inflamación crónica juega un papel muy importante en el desarrollo de las alteraciones vasculares en pacientes renales y en estudios previos se identificó la importancia de los granulocitos de baja densidad (LDG) en el desarrollo de calcificaciones vasculares en pacientes en diálisis respecto a población control<sup>3</sup>, así como en RCV de pacientes con lupus<sup>4</sup>.



**Correspondencia:** Catalina Beatriz Ulloa Clavijo (catalinaulloac@hotmail.com)

La asociación entre calcificaciones vasculares y fracturas por fragilidad está establecida tanto en población general como en pacientes renales. La calcificación aórtica grave se asocia a mayor número y gravedad de fracturas<sup>5</sup>. Es un hecho preocupante ya que la enfermedad cardiovascular (ECV) es la primera causa de muerte en pacientes con ERC, siendo ésta, de 15 a 30 veces mayor a la de la población general al ajustar por edad<sup>6</sup>. La fisiopatología del llamado “eje hueso-vaso” es compleja e intervienen varios factores entre los que destacan la edad, la desnutrición y la inflamación sistémica, un factor de RCV no tradicional agravado en el enfermo renal por el envejecimiento acelerado, con incremento de células senescentes que promueve un estado inflamatorio que “sincroniza” el deterioro de múltiples órganos y sistemas, condicionando el agrupamiento de diversas enfermedades degenerativas<sup>7</sup>.

En enfermos en diálisis peritoneal y hemodiálisis, se producen cambios en subpoblaciones leucocitarias tales como descensos en las células T angiogénicas (Tang), protectoras de la homeostasis vascular; aumentos de células inmuno-senescentes (CD4+ CD28null)<sup>8</sup>, como así también una expansión aberrante de una subpoblación de granulocitos inmaduros de baja densidad (LDG CD14-, CD16-, CD15+) relacionados con una mayor propensión a CV en la ERC avanzada<sup>3</sup>.

El incremento de la fragilidad ósea observada con la edad (osteoporosis senil/postmenopáusicas) se desarrolla de forma independiente de la ERC. Así, puede estar presente en pacientes con ERC, con función renal normal o levemente reducida, e incluso coexistir con la CKD-MBD después de estar instaurada. A esto se suma el efecto de la propia ERC en la calidad y la microestructura ósea, ya definida previamente como osteodistrofia renal, junto con factores asociados a la uremia que algunos autores describen como osteoporosis urémica<sup>9</sup>. Además, a los factores de riesgo habituales de osteoporosis de la población general, en la ERC se añaden desórdenes en el estado nutricional, de actividad física, la propia enfermedad de base y la toma de fármacos que interfieren con el metabolismo óseo<sup>10</sup>.

En el enfermo renal es frecuente la coexistencia de tres factores: malnutrición, estado inflamatorio y aterosclerosis, conocida como síndrome MIA, con un gran impacto negativo en la supervivencia<sup>11</sup>. La evidencia sugiere que la disminución de la ingesta alimentaria y el incremento de los reactantes de fase aguda y citoquinas inflamatorias pueden apreciarse desde estadios tempranos de ERC<sup>12</sup>. De igual manera sucede con la aterosclerosis<sup>13</sup>. Esta combinación resulta en un marcado daño cardiovascular que condiciona ingresos hospitalarios y mortalidad.

El objetivo de este estudio ha sido evaluar la contribución de cambios en algunas poblaciones celulares del sistema inmunitario involucradas en la homeostasis vascular y en otros factores de riesgo CV, como la desnutrición, al deterioro óseo en una cohorte de pacientes sometidos a diálisis peritoneal.

## PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

### Participantes

Se reclutaron 31 pacientes con ERC estadio 5 mayores de 18 años, sometidos a diálisis peritoneal (CKD5-PD) en la Unidad de Gestión Clínica de Nefrología, Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), España) que otorgaron su consentimiento informado. Se excluyeron pacientes diabéticos y con antecedentes de eventos cardiovasculares (aneurisma abdominal, claudicación intermitente y cirugía carotídea previa), tratamiento inmunosupresor; embarazo, diagnós-

tico de enfermedad inmunomediada, cáncer; diabetes mellitus, infecciones recientes menores de 3 meses o actuales. Estos criterios de exclusión limitaron la capacidad de reclutamiento de pacientes, pero se eligieron con el objetivo de identificar mediadores inflamatorios precoces del daño vascular asociados a la DP y su posible impacto en la salud ósea.

### Pruebas de laboratorio

Las muestras de sangre se obtuvieron por venopunción. Parámetros bioquímicos séricos automatizados, análisis de lípidos y hemogramas completos se realizaron en el Laboratorio de Medicina (HUCA) con métodos de laboratorio de rutina. Los niveles de Klotho circulante se determinaron usando un ensayo ELISA (Ref. 27998, human soluble a-Klotho; IBL Immuno-Biological Laboratories Co, JAPAN). Para otras determinaciones, las muestras de suero o plasma se almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis. Se evaluó también la función renal residual (FRR) definida como un promedio del aclaramiento de urea y creatinina ((CCr + CU)/2) en orina de 24 h >1 ml/min).

### Análisis de poblaciones celulares del sistema inmune en sangre periférica

Las muestras de sangre periférica se procesaron inmediatamente para obtener células mononucleares de sangre periférica (PBMC, peripheral blood mononuclear cells) mediante centrifugación (1900 rpm, 20 minutos) en gradientes de densidad de Ficoll TM (Lymphosep, Biowest, Alemania) para la identificación de LDG. La población CD4+ CD28null se analizó en muestras de sangre periférica directamente.

Las PBMC se trataron con reactivo de bloqueo FcR (Milteny Biotech, Alemania) durante 20 minutos a 4°C para evitar la unión inespecífica de anticuerpos a los receptores Fc, seguidas de incubación con CD14 FITC (Immunostep, España), CD15 PE-Cy7 (Milteny Biotech), CD16 APC-Cy7 (BioLegend, Alemania), CD4 PE (Immunostep) y CD28 APC-Cy7 (Thermo Fischer, Alemania) o anticuerpos de control isotipo correspondientes durante 30 minutos a 4°C. Después de un lavado con PBS. Los tipos celulares se analizaron por citometría de flujo en un Citómetro de flujo Canto II (BD Biosciences) equipado con un software FACS Diva 6.5. La identificación de subpoblaciones celulares leucocitarias se realizó mediante la expresión de sus marcadores específicos. Los LDG inmaduros se detectaron por su fenotipo LDG CD14-, CD16-, CD15+ y sus valores se expresan como % de CD15+. Los linfocitos CD4+ senescentes se identificaron por su fenotipo CD4+ CD28null y sus valores se expresan como % de CD4+, según el método descrito por Rodríguez-Carrio et al.<sup>3</sup>.

### Cuantificación de citocinas circulantes

Los niveles circulantes de IL-10, IL-6, IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  se midieron en muestras de suero utilizando un ensayo multiplex (BiolegendPlex, BioLegend), siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Los límites de detección fueron 1,2 pg/ml (IL-10 e IL-2) o 2,4 pg/ml (IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ).

### Deterioro óseo

Si bien sólo la densitometría ósea permite cuantificar de forma precisa la masa ósea, se estratificó a los pacientes considerando el deterioro óseo en virtud de la presencia de osteopenia radiológica y/o los antecedentes de fractura por fragilidad. Se evaluaron las radiografías simples de columna dorsal y lumbar en proyección lateral y se

definió como osteopenia a la disminución de la densidad del cuerpo vertebral del hueso esponjoso central y de las trabéculas horizontales, ya que las verticales están afectadas en osteopenias más severas, con el consiguiente resquebrajamiento de las corticales. Las fracturas vertebrales se identificaron siguiendo los criterios de Genant. Las fracturas periféricas se constataron mediante informe médico o revisión de las radiografías. La lectura radiográfica fue realizada por una radióloga experimentada.

### Composición corporal

La composición corporal se evaluó mediante bioimpedancia eléctrica (BIE) multifrecuencia utilizando BCM<sup>®</sup>, Body Composition Monitor, de Fresenius Medical Care. Las mediciones se obtuvieron a una frecuencia de 50 Hz, con el paciente en decúbito supino y después del drenaje del líquido de DP. El software arrojó los datos de resistencia<sup>®</sup>, reactancia (Xc), agua corporal total (TBW), agua intracelular (ICW), agua extracelular (ECW), ECW/TBW, litros (OH), masa de tejido magro (LTM Kg), índice de tejido magro (LTI Kg/m<sup>2</sup>), masa de tejido adiposo (ATM, Kg), índice de tejido graso (FTI Kg/m<sup>2</sup>), índice de masa corporal (BMI Kg/m<sup>2</sup>) y ángulo de fase (AF) a 50 Hz.

El AF es una medida bioeléctrica de la salud celular que se calcula tomando en cuenta el estado de hidratación y el grado de celularidad tisular; y, constituye un marcador de sarcopenia, estrés oxidativo, inflamación y de calcificación vascular en pacientes en diálisis, y es el parámetro de la BIE que mejor predice supervivencia en la ERC<sup>14-19</sup>.

### Declaraciones éticas

Este estudio ha sido aprobado por el Comité de Revisión Institucional (Comité de Ética Regional de Investigación Clínica, referencia PI17/02181), en cumplimiento de la Declaración de Helsinki. Todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito antes de su inclusión en el estudio.

### Análisis estadístico

El análisis descriptivo se muestra en forma de porcentajes (%), medias (X) y desviaciones estándar (DE). Para el análisis de las diferencias entre los parámetros clínicos y bioquímicos, y la asociación de los mismos con la calcificación vascular, se utilizaron las pruebas estadísticas de T-Student, test de Chi-cuadrado, análisis de regresión logística múltiple y pruebas no paramétricas (U-Mann Whitney) cuando fueron necesarias, con un intervalo de confianza (IC) de 95% y considerando un valor de  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo. El análisis estadístico se realizó mediante SPSS 26.0 para Windows.

### RESULTADOS

Se incluyeron 31 pacientes, 20 hombres y 11 mujeres, con una edad de  $54 \pm 15$  y de  $60 \pm 11$  años respectivamente ( $p = 0,24$ ). La prevalencia de fracturas por fragilidad fue del 5% en los hombres y del 27% en mujeres, todos ellos con fracturas vertebrales y, en una de las pacientes, además con dos fracturas periféricas.

En la tabla 1 se recogen los parámetros clínicos, determinaciones analíticas del metabolismo óseo relacionados con la ERC, así como los parámetros nutricionales e inflamatorios estudiados, la etiología de la ERC, los tratamientos médicos con repercusión metabólica-ósea y las diferencias entre los pacientes con o sin deterioro óseo. Como cabría esperar, los pacientes con deterioro óseo fueron de mayor

edad, con un predominio significativo de las mujeres [26,32% de hombres y 77,78% de mujeres ( $p = 0,01$ )], con índice de Charlson discretamente superior y con un LTI menor: No se encontraron diferencias significativas entre pacientes con o sin deterioro óseo en los parámetros analíticos vinculados a CKD-MBD, incluyendo los niveles de PTH, a excepción del Klotho soluble, más elevado en pacientes con deterioro óseo ( $p = 0,03$ ). Esta ausencia de vinculación puede ser debida a la estimación categórica y poco precisa del deterioro óseo como, sobre todo, al tamaño muestral. Además, hasta 2017 no se recoge la relevancia de la DXA en la evaluación sistemática, de pacientes con CKD-MBD y no formaba parte de la rutina de parámetros clínicos, al contrario de la evaluación radiológica<sup>2</sup>.

Es destacable la deficiencia/insuficiencia de vitamina D en ambos grupos. Los valores medios de 25-hidroxivitamina D en pacientes suplementados con vitamina D nutricional (38,7%) fueron de 8,4 [6,8, 18,3] ng/ml, frente a 9,3 [5,4, 15] ng/ml en los no suplementados, ambos niveles en el rango de deficiencia de vitamina D ( $< 20$  ng/ml). En el 48,4% de los pacientes que recibían vitamina D activa (calcitriol o paricalcitol), los valores medios de vitamina D fueron de 9,3 [5,4, 12,4] ng/ml, similar al del grupo de pacientes suplementados con vitamina D nutricional.

Respecto a la cuantificación de las calcificaciones vasculares, el índice de Kauppila fue 6 veces superior en los pacientes con deterioro óseo ( $p < 0,01$ ).

En cuanto a los parámetros nutricionales, no se observaron diferencias significativas en los niveles de proteínas totales, albúmina, FTI, ángulo de fase ni IMC. Solo el LTI fue menor en los pacientes con deterioro óseo.

De todas las subpoblaciones celulares leucocitarias estudiadas, solo se observó una elevación significativa en la población de LDG inmaduros LDG CD14-, CD16-, CD15+ en el grupo de pacientes con deterioro óseo y, si bien hubo una tendencia a valores superiores en linfocitos CD4+ CD28null, no alcanzó significación estadística.

Con respecto a la etiología de la ERC y los tratamientos médicos que estaban recibiendo en el momento del estudio, no se encontraron diferencias entre los pacientes asociadas al deterioro óseo.

En el análisis de regresión logística analizando el deterioro óseo como variable dependiente respecto a la edad y el sexo, fue el sexo femenino (OR 10,41; IC 95%: 1,52-119,30;  $p = 0,03$ ) la variable con mayor peso, mientras que la edad estuvo en el límite de la significación (OR 1,09; IC 95%: 1,01-1,22;  $p = 0,05$ ).

Cuando se analizó la contribución independiente de cada uno de los parámetros de riesgo identificados al deterioro óseo, ajustando por edad y sexo, únicamente los LDG inmaduros (LDG CD14-, CD16-, CD15+) resultaron ser predictores independientes tanto en datos crudos como ajustados por edad, por sexo y por ambos en conjunto (tabla 2). Cabe resaltar que no se observaron diferencias en los neutrófilos circulantes entre pacientes con o sin deterioro óseo. El subconjunto de LDG inmaduros LDG CD14-, CD16-, CD15+ tampoco se correlacionó con los recuentos absolutos de neutrófilos ( $p > 0,05$ , datos no mostrados).

Importante destacar también que todos los cambios en los parámetros diferencialmente expresados en pacientes con deterioro óseo, como los aumentos en los índices de Charlson o Kauppila y en la densidad de LDG inmaduros LDG CD14-, CD16-, CD15+, así como el LTI se correlacionan significativamente con la edad ( $r = 0,68$ ,  $p = 0,00$ ;  $r = 0,48$ ,  $p = 0,01$ ;  $r = 0,36$ ,  $p = 0,04$ ;  $r = -0,40$ ,  $p = 0,02$ ) (figura 1).

**Tabla 1. Características clínicas, CKD-MBD, nutricionales e inmunológicas en pacientes con ERC5-DP discriminados por presencia o ausencia de deterioro óseo**

	Sí N=14 (45,2%)	No N=17 (54,8%)	p valor
<b>Parámetros clínicos</b>			
Sexo (H/M)	5/9	15/2	<b>0,02</b>
Edad (años) (media (SD))	62,6 (9,5)	51,9 (15,3)	<b>0,02</b>
Índice de Charlson (mediana [IQR])	6 [3, 7]	4 [2, 6]	ns
Tiempo en diálisis (meses) (mediana [IQR])	18 [11, 32]	15 [9, 48]	ns
Función renal residual (Sí/No)	12/2	12/5	ns
<b>CKD-MBD</b>			
Calcio, mmol/l (media (SD))	2,18 (0,18)	2,18 (0,17)	ns
Fósforo, mmol/l (media (SD))	1,69 (0,35)	1,64 (0,42)	ns
Magnesio, mmol/l (mediana [IQR])	0,81 [0,77, 0,95]	0,87 [0,67, 1,01]	ns
PTH, pg/ml (mediana [IQR])	386 [230, 453]	300 [214, 600]	ns
Vitamina D 25 OH, ng/ml (mediana [IQR])	10,1 [5,1, 18,6]	8 [6, 13]	ns
Fosfatasa alcalina, U/L (mediana [IQR])	106 [81, 143]	89 [71, 127]	ns
Klotho, pg/mL (mediana [IQR])	1,79 [0,82, 2,83]	0,79 [0,64, 1,20]	<b>0,03</b>
Índice de Kauppila (mediana [IQR])	6 [1, 16]	0 [0, 4]	<b>&lt;0,01</b>
<b>Parámetros nutricionales</b>			
Proteínas totales, mg/dl (media (SD))	63 (6)	63 (7)	ns
Albúmina, mg/dl (media (SD))	37 (3)	36 (5)	ns
LTI, Kg/m <sup>2</sup> (mediana [IQR])	13,1 [11,4, 17]	16,3 [14,5, 18,5]	<b>0,04</b>
FTI, Kg/m <sup>2</sup> (media (SD))	14,8 (8,3)	10,1 (6,7)	ns
Ángulo de fase, ° (media (SD))	4,9 (1,1)	5,6 (1,1)	ns
IMC Kg/m <sup>2</sup> , (media (SD))	28,6 (7,1)	27,1 (5,4)	ns
<b>Parámetros inflamatorios</b>			
PCR, mg/dl (mediana [IQR])	0,3 [0,1, 1,7]	0,3 [0,1, 0,7]	ns
IFN γ, pg/ml (mediana [IQR])	7,33 [3,80, 15,50]	7,82 [5,88, 11,19]	ns
TNFα, pg/ml (mediana [IQR])	8,13 [4,13, 13,07]	8,50 [7,76, 12,48]	ns
IL-2, pg/ml (mediana [IQR])	1,60 [1,32, 2,30]	1,52 [1,26, 1,91]	ns
IL-6, pg/ml (media (SD))	11,26 (5,09)	11,31 (9,01)	ns
IL-10, pg/ml (mediana [IQR])	1,71 [1,36, 2,30]	1,91 [1,36, 4,78]	ns
CD4+ CD28null, % CD4+ (media (SD))	10,88 (4,53)	8,02 (2,97)	ns
Tang, % de linfocitos (media (SD))	1,65 (0,69)	1,96 (0,71)	ns
LDG inmaduros[log], % CD15+ (media (SD))	-0,44 (0,4)	-0,12 (0,4)	<b>&lt;0,01</b>
DEFA3 [log] (media (SD))	0,07 (0,41)	-0,12 (0,67)	ns
<b>Etiología</b>			
Glomerular, %	50%	23,5%	ns
Nefritis intersticial, %	0%	5,9%	ns
No filiada, %	14,29%	35,29%	ns
Otras, %	0%	11,76%	ns
Pielonefritis, %	0%	5,88%	ns
PQHR, %	14,29%	11,76%	ns
Nefroangioesclerosis, %	21,43%	5,88%	ns
<b>Tratamientos</b>			
Vitamina D nutricional	38%	41,1%	ns
Vitamina D activa	50%	47%	ns
Cinacalcet	35,7%	29,4%	ns
Captore de fósforo	64,28%	47%	ns
Corticoides	17,6%	18,75%	ns

Las variables se expresan como promedio±DS, %. Las diferencias fueron analizadas mediante los test T Student, U de Mann-Withney o chi 2 según la distribución normal o no normal en la variable analizada. PTH: paratohormona; LTI: índice de tejido magro; FTI: índice de tejido graso; IMC: índice de masa corporal; IFN γ: interferón gamma; TNFα: factor de necrosis tumoral alfa; IL: interleuquinas; CD4+ CD28null: células senescentes; Tang: células T angiogénicas; LDG inmaduros [log]: granulocitos de baja densidad inmaduros: transformación logarítmica; DEFA3[log]: defensina 3: transformación logarítmica; PQHR: Poliquistosis hepatorenal. Remarcamos con negrita los valores significativos.

**Tabla 2. Factores de riesgo de deterioro óseo ajustados por edad y sexo en pacientes con ERC5-DP**

	Análisis crudo		Ajustado por edad		Ajustado por sexo		Ajustado por edad y sexo	
	Odds ratio [95% IC]	P	Odds ratio [95% IC]	P	Odds ratio [95% IC]	P	Odds ratio 95% IC]	P
I. Charlson	1,4 [0,97-2,01]	0,07	1,13 [0,71-1,82]	0,60	1,52 [0,96-2,41]	0,07	1,22 [0,68-2,21]	0,50
I. Kauppila	1,52 [0,96-2,41]	0,07	1,05 [0,93-1,17]	0,44	1,11 [0,98-1,25]	0,10	1,06 [0,93-1,21]	0,39
LTI	1 [0,93-1,07]	0,92	1 [0,93-1,07]	0,94	0,99 [0,91-1,07]	0,78	0,99 [0,91-1,07]	0,78
LDGi [log]	8,57 [2,58-52,39]	<b>0,00</b>	10,5 [2,5-92,5]	<b>0,01</b>	13,21 [2,71-179,6]	<b>0,01</b>	15,6 [2,6-300,2]	<b>0,02</b>
CD4+ CD28null	1,27 [0,97-1,68]	0,08	1,14 [0,84-1,54]	0,39	1,31 [0,96-1,79]	0,09	1,18 [0,84-1,66]	0,33
Sexo	13,5 [2,15-84,69]	<b>0,00</b>	15,63 [2,01-121,47]	<b>0,01</b>				
Edad	1,07 [1-1,15]	<b>0,04</b>			1,09 [0,99-1,19]	0,07		

Análisis de regresión logística entre cada uno de los factores de riesgo de daño óseo sin ajuste o ajustados por edad, sexo o edad y sexo. IC: intervalo de confianza; p: significación estadística; LTI: índice de tejido magro; LDG [log]: granulocitos de baja densidad inmaduros CD14-, CD16-, CD15+: transformación logarítmica; CD4+ CD28null: linfocitos T senescentes. Remarcamos con negrita los valores significativos.

### Discusión

Este trabajo muestra por primera vez la asociación entre la expansión de una subpoblación de LDG inmaduros LDG CD14-, CD16-, CD15+ y el deterioro óseo en pacientes de diálisis peritoneal, aumentos previamente vinculados a una mayor propensión a calcificación vascular.

El número de pacientes incluidos, aunque pueda parecer escaso, estuvo muy condicionado por los criterios de exclusión encaminados a seleccionar pacientes en los que se pudieran determinar marcadores precoces de inflamación y su papel en la patogénesis de la CV y deterioro óseo, sin interferencias de otros procesos o en estadios avanzados.

Respecto a las características generales de la población a estudio, la distribución por sexos es similar a la distribución general de los pacientes en diálisis (2/3 varones y 1/3 mujeres)<sup>20</sup>. Como cabría esperar, el deterioro óseo, pese a ser una variable cualitativa, fue predominante en el sexo femenino, como así también la mayor prevalencia de fracturas.

El riesgo de fractura aumenta conforme avanza la enfermedad renal crónica (ERC) y el tipo de terapia renal sustitutiva (TRS) influye en su comportamiento. Los pacientes con ERC G3-G5, aquellos en diálisis (G5D) y quienes son portadores de trasplante renal, tienen una incidencia de fractura de 2 a 100 veces mayor que la población general de la misma edad y sexo<sup>2</sup>. Así, la incidencia de fracturas se triplica en hemodiálisis (HD) y se duplica en diálisis peritoneal (DP) al comparar con el trasplante renal<sup>21</sup>. De hecho, se ha visto que las fracturas vertebrales son prevalentes hasta en la cuarta parte de pacientes en HD<sup>22</sup> y un metaanálisis demostró que la HD aumenta en un 60% el riesgo de fractura de cadera al comparar con la DP<sup>23</sup>.

En nuestro estudio, el 13% de pacientes en DP presentaron fracturas por fragilidad siendo mayoritariamente mujeres (75%). La misma influencia del sexo se vio al valorar osteopenia. Al agrupar fracturas y osteopenia bajo el término "deterioro óseo", vimos que éste fue tres veces mayor en mujeres, aunque representaran solamente un tercio de los participantes. Se sabe que el sexo femenino es un factor predictivo de fractura<sup>24</sup>. En el estudio realizado por Naylor et al. durante 3 años de seguimiento, se vio que hasta el 10% de mujeres y el 5% de hombres con ERC estadio 5 tuvieron al menos una fractura<sup>25</sup>.

Acompañando al sexo, la edad también fue diferente entre los pacientes con deterioro óseo, 10 años más, similar a los datos del estudio DOPPS<sup>26</sup>. Sin embargo, Maravic et al. demostraron que las mujeres en diálisis que presentan fractura de cadera son más jóvenes con respecto a la población general<sup>24</sup>. Este hecho refuerza el concepto de que la ERC es un condicionante para desarrollar un envejecimiento temprano que incluye el esqueleto.

En población general y en DP, se ha asociado la comorbilidad con el riesgo de fractura<sup>27</sup>. Los pacientes que tuvieron deterioro óseo presentaron un mayor índice de Charlson, siendo estos hallazgos prevalentes en hombres.

Por otro lado, la prevalencia de malnutrición en los pacientes en DP es hasta del 56%<sup>28</sup>. Se ha visto que en ellos predomina la malnutrición proteica como consecuencia de la baja ingesta, la pérdida de proteínas a través del líquido de diálisis y el aumento del catabolismo proteico<sup>29</sup>, condicionando a su vez a una enfermedad ósea adinámica.

En las unidades de diálisis cada vez es más frecuente el uso de BIE para evaluar el estado nutricional de nuestros pacientes. Interesa principalmente la masa magra, ya que es conocida la asociación entre sarcopenia y osteoporosis, llamada "sarco-osteoporosis"<sup>30</sup>. El riesgo de fracturas es mayor por el riesgo de caídas que condiciona la debilidad inducida por la sarcopenia<sup>31,32</sup>. Nuestro estudio concuerda con las investigaciones demostrando que a menor índice de tejido magro, mayor deterioro óseo, primordialmente en hombres. Verschueren et al. estudiaron a 679 hombres, entre quienes el 11,9% presentaban sarcopenia y un riesgo 3 veces superior de desarrollar osteoporosis<sup>33</sup>. Por ello, sería conveniente incentivar al uso más generalizado de mediciones de BIE en las consultas de Nefrología desde estadios tempranos de ERC.

En nuestro estudio, el índice de Kauppila elevado en los pacientes con deterioro óseo concuerda con el concepto que la "desmineralización ósea se asocia a mineralización vascular". Sin embargo, el índice de Kauppila no tuvo una contribución independiente de la edad y el sexo como posible factor determinante de deterioro óseo. Tampoco se evidenció una asociación entre deterioro óseo y los marcadores de actividad metabólica

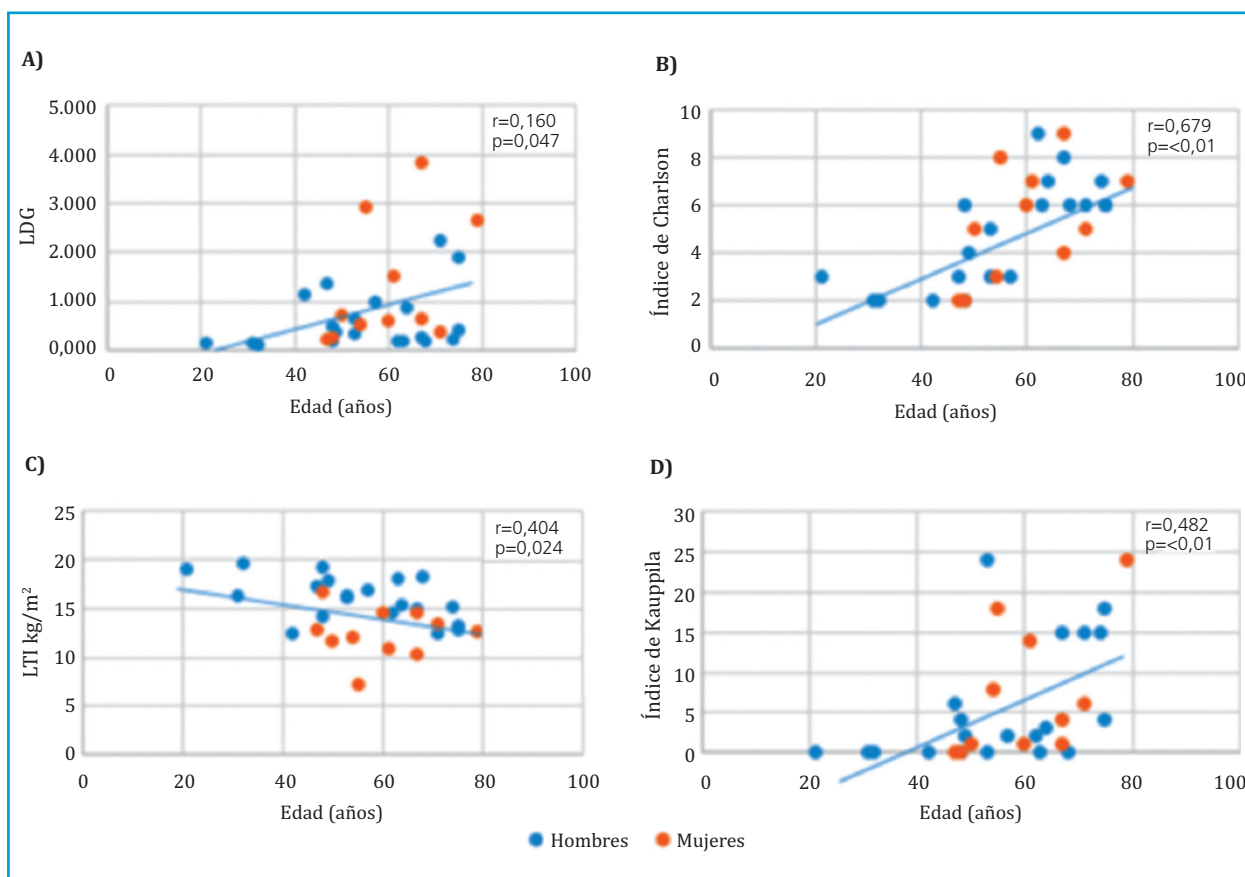
**Figura 1. Asociación de edad y el sexo con factores de riesgo de deterioro óseo en pacientes con ERC5-DP**

Gráfico de dispersión. Se muestra la correlación de la edad y el sexo con A) LDG: granulocitos de baja densidad inmaduros, B) índice de Charlson, C) LTI, índice de tejido magro, y, D) índice de Kauppila. Cada círculo representa un sujeto de estudio.

ósea, en consonancia con otros estudios donde solo la PTH se asoció débilmente al riesgo de fracturas en pacientes en diálisis<sup>27,34</sup>. Curiosamente el Klotho soluble fue más alto en quienes tienen deterioro óseo. Aunque se desconoce con precisión el efecto del Klotho en el hueso, se sabe que la delección del gen Klotho exclusivamente en los osteocitos, aumenta en lugar de disminuir, la tasa de formación ósea<sup>35,36</sup>. El impacto de acciones locales del Klotho soluble es un área de gran interés en nefrología, pero aun con muchas limitaciones debido a la variabilidad entre los ensayos comerciales disponibles para cuantificar los niveles circulantes de Klotho. Dadas las acciones antiinflamatorias y antienvjecimiento del Klotho circulante, sería importante corroborar si los cambios en los niveles en sangre, influyen favorablemente en atenuar acciones leucocitarias que afectan la propensión a deterioro óseo y CV. En este momento, el impacto favorable de aumentos en el Klotho soluble en cuanto a protección inmunológica, renal y vascular se ha demostrado solo a nivel experimental.

El status de vitamina D, claramente deficitario, y los niveles similares de 25-hidroxi-vitamina D entre los pacientes que recibían o no suplementación, respecto a los tratados con metabolitos activos, refleja la escasa preocupación de los nefrólogos respecto a la importancia de corregir la deficiencia de vitamina D en el enfermo renal, corrección imposible de alcanzar con la administración de vitamina D activa. Los niveles de 25-hidroxi-vitamina D en los pacientes bajo estos tratamientos, descartan una posible inducción de la degradación de la vitamina D nu-

tricional debida a dosis excesivas de la forma activa<sup>37</sup> (tabla 1).

De las subpoblaciones de células inmunes más comúnmente usados para valorar daño vascular, únicamente la expansión exacerbada de LDG inmaduros LDG CD14-, CD16-, CD15+ se vinculó con el deterioro óseo. En el contexto de inflamación sistémica, se ha demostrado que los LDG inmaduros LDG CD14-, CD16-, CD15+ son liberados tempranamente desde la médula ósea a través de vasos transcorticales cuando hay aumentos en la resorción ósea mediada por osteoclastos<sup>38</sup>. Aunque los LDG inmaduros CD14-, CD16-, CD15+ son una fracción minoritaria de los neutrófilos, en un estudio en 2.586 hombres, los individuos con menor densidad mineral ósea (DMO) presentaban un mayor recuento de neutrófilos<sup>39</sup>, lo que sugiere una asociación inversa entre salud ósea y tasa de granulopoyesis. De hecho, Terraciano y colaboradores encontraron que mujeres postmenopáusicas con una DMO baja, presentaron concentraciones altas en saliva, de un tipo de defensiva liberada por neutrófilos llamada DEFA1<sup>40</sup>.

La contribución de aumentos de LDG inmaduros LDG CD14-, CD16-, CD15+ circulantes al grado de calcificación vascular en pacientes en diálisis peritoneal y hemodiálisis, demostró también la utilidad de mediciones de los niveles de RNA mensajero de la defensiva 3 (DEFA3) en leucocitos mononucleares circulantes, como un marcador certero de granulopoyesis temprana con expansión de los LDG inmaduros LDG CD14-, CD16-, CD15+3. Sin embargo, en éste, los niveles de RNA mensajero de defensiva 3 no se asocian a mayor deterioro óseo.

## LIMITACIONES

La mayor limitación de este estudio es que el deterioro óseo no fue evaluado con el patrón de oro, DXA, sino con la presencia de osteopenia radiológica y/o fracturas por fragilidad, siendo la resultante una variable categórica, con menor capacidad de mostrar una gradación de efectos.

Además, el pequeño tamaño muestral debido a los criterios de exclusión, si bien es apropiado para determinar efectos precoces y no las interferencias debidas a otros procesos que alteren la inmunidad, pueden limitar la cuantificación real de la influencia de otras variables.

## CONCLUSIONES

La contribución más importante de este estudio es la demostración la utilidad de mediciones de la densidad circulante de LDG inmaduros LDG CD14-, CD16-, CD15+ en estimar el deterioro óseo independientemente de la edad y el sexo del paciente. Esto convierte a los LDG inmaduros LDG CD14-, CD16-, CD15+ circulantes en un marcador temprano de alteraciones en el hueso del enfermo renal que podrían permitir tomar una actitud proactiva tanto en el diagnóstico como en la toma de decisiones para atenuar su progresión.

Nuestro estudio guarda sincronía con el conocimiento actual en el que, el deterioro óseo es mayor en personas de edad avanzada, de sexo femenino, con un índice de Charlson elevado y en quienes tienen menor masa muscular. Por otra parte, entendemos que puede abrir nuevas vías para profundizar la investigación de los mecanismos patogéni-

cos de CKD-MBD en estadios más tempranos de ERC, con una muestra mayor de pacientes y utilizando DXA para una adecuada validación de estos hallazgos.

**Financiación:** Este trabajo ha sido financiado por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) - Fondo de Investigación Sanitaria (PI14/01452, PI17/02181y PI19/00532), Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), Plan de Ciencia, Tecnología e Innovación 2013-2017 y 2018-2022 del Principado de Asturias (GRUPIN14-028, IDI-2018-000152, IDI-2021-000080), Fundación Renal Íñigo Álvarez de Toledo (FRIAT), Retic REDinREN de ISCIII (RD16/0009/0017) y RICORS2040 (Kidney Disease). Julia Martín-Vírgala ha sido financiada por una beca de posgrado del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (programa FPU) y por una beca de movilidad FEIOMM 2022. Natalia Carrillo-López ha sido financiada por IDI-2018-000152 y IDI-2021-000080.

**Agradecimientos:** Un reconocimiento especial a los doctores Esmeralda Castelblanco, Washington University School of Medicine. St. Louis, Missouri, USA; y José Luis Fernández-Martín, Unidad de Investigación de Metabolismo Óseo, Hospital Universitario Central de Asturias, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Oviedo, España, por su contribución al análisis estadístico de los datos de este estudio.



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

## Bibliografía

- Moe S, Drüeke T, Cunningham J, Goodman W, Martin K, Olgaard K, et al. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 2006 Jun;69(11):1945-53.
- Moe SM, Nickolas TL. Fractures in Patients with CKD: Time for Action. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2016 Nov 7;11(11):1929-31.
- Rodríguez-Carrio J, Carrillo-López N, Ulloa C, Seijo M, Rodríguez-García M, Rodríguez-Suárez C, et al. A subset of low density granulocytes is associated with vascular calcification in chronic kidney disease patients. *Sci Rep.* 2019 Sep 13;9(1):13230.
- López P, Rodríguez-Carrio J, Martínez-Zapico A, Pérez-Álvarez ÁI, Suárez-Díaz S, Mozo L, et al. Low-density granulocytes and monocytes as biomarkers of cardiovascular risk in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford).* 2020 Jul 1;59(7):1752-64.
- Szulc P. Vascular calcification and fracture risk. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2015 Aug;12(2):139-41.
- Tonelli M, Wiebe N, Culleton B, House A, Rabbat C, Fok M, et al. Chronic kidney disease and mortality risk: a systematic review. *J Am Soc Nephrol.* 2006 Jul;17(7):2034-47.
- Farr JN, Xu M, Weivoda MM, Monroe DG, Fraser DG, Onken JL, et al. Targeting cellular senescence prevents age-related bone loss in mice. *Nat Med.* 2017 Sep;23(9):1072-9.
- Rodríguez-Carrio J, Carrillo-López N, Ulloa C, Martín-Carro B, Rodríguez-Suárez C, Naves-Díaz M, et al. Novel Immune Cell Subsets Exhibit Different Associations With Vascular Outcomes in Chronic Kidney Disease Patients-Identifying Potential Biomarkers. *Front Med (Lausanne).* 2021;8:618286.
- Kazama JJ, Iwasaki Y, Fukagawa M. Uremic osteoporosis. *Kidney Int Suppl (2011).* 2013 Dec;3(5):446-50.
- Bover J, Ureña-Torres P, Cozzolino M, Rodríguez-García M, Gómez-Alonso C. The Non-invasive Diagnosis of Bone Disorders in CKD. *Calcif Tissue Int.* 2021 Apr;108(4):512-27.
- Stenvinkel P, Heimbürger O, Lindholm B, Kaysen GA, Bergström J. Are there two types of malnutrition in chronic renal failure? Evidence for relationships between malnutrition, inflammation and atherosclerosis (MIA syndrome). *Nephrol Dial Transplant.* 2000 Jul;15(7):953-60.
- Eustace JA, Astor B, Muntner PM, Ikizler TA, Coresh J. Prevalence of acidosis and inflammation and their association with low serum albumin in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2004 Mar;65(3):1031-40.
- Wanner C, Amann K, Shoji T. The heart and vascular system in dialysis. *Lancet.* 2016 Jul 16;388(10041):276-84.
- Tomeleri CM, Cavaglieri CR, de Souza MF, Cavalcante EF, Antunes M, Nabuco HCG, et al. Phase angle is related with inflammatory and oxidative stress biomarkers in older women. *Experimental Gerontology.* 2018 Feb 1;102:12-8.
- Barrea L, Muscogiuri G, Pugliese G, Laudisio D, de Alteriis G, Graziadio C, et al. Phase Angle as an Easy Diagnostic Tool of Meta-Inflammation for the Nutritionist. *Nutrients.* 2021 Apr 24;13(5):1446.
- Do JY, Kim AY, Kang SH. Association Between Phase Angle and Sarcopenia in Patients Undergoing Peritoneal Dialysis. *Front Nutr.* 2021 Sep 24;8:742081.
- Huang Y, Ge Y, Li F, Zhang C, Zhang Z, Xu N, et al. Elucidating the relationship between nutrition indices and coronary artery calcification in patients undergoing maintenance hemodialysis. *Ther Apher Dial.* 2022 Feb;26(1):71-84.
- Sarmento-Dias M, Santos-Araújo C, Poínhos R, Oliveira B, Sousa M, Simões-Silva L, et al. Phase Angle Predicts Arterial Stiffness and Vascular Calcification in Peritoneal Dialysis Patients. *Perit Dial Int.* 2017 Aug;37(4):451-7.
- Piccoli A. Identification of operational clues to dry weight prescription in hemodialysis using bioimpedance vector analysis. The Italian Hemodialysis-Bioelectrical Impedance Analysis (HD-BIA) Study Group. *Kidney Int.* 1998 Apr;53(4):1036-43.
- Gorostidi M, Sánchez-Martínez M, Rui-lope LM, Graciani A, de la Cruz JJ, Santamaría R, et al. Prevalencia de enfermedad renal crónica en España: impacto de la acumulación de factores de riesgo cardiovascular. *Nefrología.* 2018 Nov 1;38(6):606-15.
- Dey V, Farrah TE, Traynor JP, Spalding EM, Robertson SE, Geddes CC. Symptomatic fracture risk in the renal replacement therapy population. *Nephrol Dial Transplant.* 2017 Jul 1;32(7):1211-6.
- Rodríguez-García M, Gómez-Alonso C, Naves-Díaz M, Diaz-Lopez JB, Diaz-Corte C, Cannata-Andía JB, et al. Vascular calcifications, vertebral fractures and mortality in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2009 Jan;24(1):239-46.
- Boonpheng B, Thongprayoon C, Mao MA, Wijarnprecha K, Bathini T, Kaewput W, et al. Risk of hip fracture in patients on hemodialysis versus peritoneal dialysis: A meta-analysis of observational studies. *J Evid Based Med.* 2019 May;12(2):98-104.
- Maravic M, Ostertag A, Torres PU, Cohen-Solal M. Incidence and risk factors for hip fractures in dialysis patients. *Osteoporos Int.* 2014 Jan;25(1):159-65.
- Naylor KL, McArthur E, Leslie WD, Fraser LA, Jamal SA, Cadarette SM, et al. The three-year incidence of fracture in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2014 Oct;86(4):810-8.
- Tentori F, McCullough K, Kilpatrick RD, Bradbury BD, Robinson BM, Kerr PG, et al. High rates of death and hospitalization follow bone fracture among hemodialysis patients. *Kidney Int.* 2014 Jan;85(1):166-73.
- Ma MKM, Yap DYH, Yip TPS, Lui SL, Lo WK. Charlson co-morbidity index and albumin significantly associated with fracture risk in peritoneal dialysis patients. *Nephrology (Carlton).* 2013 May;18(5):365-8.
- Dombros NV. Pathogenesis and management of malnutrition in chronic peritoneal dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2001;16 Suppl 6:111-3.
- Guerrero-Riscos MA. Nutrición y diálisis adecuada en diálisis peritoneal. *Revista de la Sociedad Española de Enfermería Nefrológica.* 1999;2(1)6-17.
- Li G, Zhang L, Wang D, AIQudsy L, Jiang JX, Xu H, et al. Muscle-bone crosstalk and potential therapies for sarco-osteoporosis. *J Cell Biochem.* 2019 Sep;120(9):14262-73.
- Jamal SA, Leiter RE, Jassal V, Hamilton CJ, Bauer DC. Impaired muscle strength is associated with fractures in hemodialysis patients. *Osteoporos Int.* 2006;17(9):1390-7.
- Molina P, Carrero JJ, Bover J, Chauveau P, Mazzaferro S, Torres PU, et al. Vitamin D, a modulator of musculoskeletal health in chronic kidney disease. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2017 Oct;8(5):686-701.
- Verschuere S, Gielen E, O'Neill TW, Pye SR, Adams JE, Ward KA, et al. Sarcopenia and its relationship with bone mineral density in middle-aged and elderly European men. *Osteoporos Int.* 2013 Jan;24(1):87-98.
- Danese MD, Kim J, Doan QV, Dylan M, Griffiths R, Chertow GM. PTH and the Risks for Hip, Vertebral, and Pelvic Fractures Among Patients on Dialysis. *American Journal of Kidney Diseases.* 2006 Jan 1;47(1):149-56.
- Moysés RMA, Dusso A. Is osteocyte Klotho bad for bone health? *Kidney International.* 2017 Sep 1;92(3):540-3.
- Komaba H, Kaludjerovic J, Hu DZ, Nagan K, Amano K, Ide N, et al. Klotho expression in osteocytes regulates bone metabolism and controls bone formation. *Kidney Int.* 2017 Sep;92(3):599-611.
- Dusso AS, Bauerle KT, Bernal-Mizrachi C. Non-classical Vitamin D Actions for Renal Protection. *Front Med (Lausanne).* 2021;8:790513.
- Grüneboom A, Hawwari I, Weidner D, Culemann S, Müller S, Henneberg S, et al. A network of trans-cortical capillaries as mainstay for blood circulation in long bones. *Nat Metab.* 2019 Feb;1(2):236-50.
- Valderrábano RJ, Lui LY, Lee J, Cummings SR, Orwoll ES, Hoffman AR, et al. Bone Density Loss Is Associated with Blood Cell Counts. *J Bone Miner Res.* 2017 Feb;32(2):212-20.
- Terracciano R, Migliaccio V, Savino R, Pujia A, Montalcini T. Association between low bone mineral density and increased  $\alpha$ -defensin in salivary fluid among postmenopausal women. *Menopause.* 2013 Dec;20(12):1275-9.