






Página del residente

Niveles de interleucina-17 e interleucina-33 en plasma y orina de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y enfermedad renal diabética

José Santiago Cortés-Guzmán  ^{1,2}, Juan Sebastián Suárez-Cano ¹, Carlos F. Narváez ¹,
Alejandro Pinzón-Tovar ^{1,2}

¹Universidad Surcolombiana, Neiva, (Huila), Colombia

²Departamento de Medicina Interna, Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo, Neiva, (Huila), Colombia

Cómo citar: Cortés Guzmán JS, Suárez Cano JS, Narváez CF, Pinzón Tovar A. Niveles de interleucina-17 e interleucina-33 en plasma y orina de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y enfermedad renal diabética. Rev Colomb Endocrinol Diabet Metab. 2023;10(4):e801. <https://doi.org/10.53853/encr.10.4.801>

Recibido: 04/Marzo/2023

Aceptado: 04/Junio/2023

Publicado: 29/Noviembre/2023

Resumen

Contexto: la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es una enfermedad prevalente que puede comprometer cualquier órgano. La enfermedad renal diabética (ERD) es una de las complicaciones de la DM2.

Objetivo: conocer las características sociodemográficas, clínicas, de laboratorio clínico y biomarcadores interleucina (IL)-17 e IL-33 en plasma y orina de nuestra población con DM2 y ERD, y encontrar si hay diferencias al comparar con pacientes sin ERD y sin DM2.

Metodología: en este estudio de corte transversal los datos se obtuvieron de las historias clínicas. Se midieron las IL-17 e IL-33 en plasma y orina mediante kits comerciales de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas.


Resultados: se incluyeron 62 pacientes con DM2, 23 pacientes con ERD, 39 pacientes sin ERD y 29 pacientes sin DM2. Aquellos con DM2 tienen mayores niveles en orina de IL-17 comparado con los que no tienen DM2 ($p < 0.001$). Los pacientes sin ERD presentan mayores niveles de IL-33 en plasma comparado con los que padecen ERD ($p = 0.0046$). En los pacientes con DM2 existe correlación positiva entre los niveles de IL-17 e IL-33 en orina. Los niveles de IL-33 en plasma presentaron un área bajo la curva de 0.74 para diferenciar entre pacientes con ERD y sin ERD.

Conclusiones: los niveles de IL-17 en orina son mayores en pacientes con DM2. Los niveles de IL-33 en plasma son mayores en pacientes sin ERD. El nivel de IL-33 en plasma podría ser útil para diferenciar casos de ERD.

Palabras clave: diabetes mellitus tipo 2, enfermedades renales, biomarcadores, citocinas, plasma, orina.

Destacados

- La prevalencia de la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) está aumentando rápidamente en todo el mundo y se estima que para el año 2035 habrá aproximadamente 590 millones de personas con DM2.
- La detección temprana y la corrección de los factores de riesgo modificables, junto con el uso potencial de los biomarcadores interleucina (IL)-17 e IL-33, podrían ayudar en la detección temprana de la ERD y reducir la tasa de deterioro de la función renal.
- El presente estudio nacional evaluó los niveles de IL-17 e IL-33 en pacientes con enfermedad renal diabética (ERD), sin ERD y sin diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Se encontró que los pacientes con DM2 presentan niveles elevados de IL-17 en la orina, mientras que los pacientes sin ERD tienen niveles más altos de IL-33 en plasma.
- Los niveles de IL-33 en plasma pueden ser útiles para diferenciar casos de ERD.

 **Correspondencia:** José Santiago Cortés Guzmán, calle 9 # 14-02, Facultad de Salud, Universidad Surcolombiana, Neiva (Huila), Colombia. Correo-e: jsancg@gmail.com

Levels of interleukin-17 and interleukin-33 in plasma and urine of patients with type 2 Diabetes Mellitus and diabetic kidney disease

Abstract

Context: Type 2 diabetes mellitus (DM2) is a prevalent disease that can affect various organs. Diabetic kidney disease (DKD) is one of the complications of DM2.

Objective: To understand the sociodemographic and clinical characteristics, clinical laboratory findings, and interleukin (IL)-17 and IL-33 biomarkers in plasma and urine of our population with DM2 and DKD, and to determine if there are differences compared to patients without DKD and without DM2.

Methodology: This cross-sectional study obtained data from medical records. IL-17 and IL-33 levels in plasma and urine were measured using commercially available enzyme-linked immunosorbent assay kits.

Results: The study included 62 patients with DM2: 23 patients with DKD, 39 patients without DKD, and 29 patients without DM2. Patients with DM2 had higher levels of IL-17 in urine compared to patients without DM2 ($p < 0.001$). Patients without DKD had higher levels of IL-33 in plasma compared to patients with DKD ($p = 0.0046$). In patients with DM2, there was a positive correlation between IL-17 and IL-33 levels in urine. The plasma levels of IL-33 had an area under the curve of 0.74 in distinguishing between patients with and without DKD.

Conclusions: IL-17 levels in urine are higher in patients with DM2. IL-33 levels in plasma are higher in patients without DKD. The level of IL-33 in plasma could be useful in differentiating cases of DKD.

Keywords: Type 2 Diabetes Mellitus, Kidney Diseases, Biomarkers, Cytokines, Plasma, Urine.

Highlights

- The prevalence of type 2 diabetes mellitus (DM2) is rapidly increasing worldwide, with an estimated 590 million people having DM2 by the year 2035.
- Early detection and correction of modifiable risk factors, along with the potential use of biomarkers interleukin (IL)-17 and IL-33, could aid in the early detection of DKD and reduce the rate of renal function deterioration.
- This national study assessed the levels of IL-17 and IL-33 in patients with Diabetic Kidney Disease (DKD), without DKD, and without type 2 diabetes mellitus (DM2). It was found that patients with DM2 have elevated levels of IL-17 in urine, while patients without DKD have higher levels of IL-33 in plasma.
- Plasma levels of IL-33 can be useful in differentiating cases of DKD.

Introducción

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) está aumentando rápidamente alrededor del mundo. Se estima que para el año 2035 haya aproximadamente 590 millones de personas con DM2 en todo el mundo. Es una de las principales causas de muerte en Estados Unidos (1). Se calcula que la prevalencia de DM2 en América Latina aumentará en 250 % en los próximos 20 años (2). Los pacientes con DM2 consumen alrededor de 6 % del costo en salud en América Latina y el Caribe (2). En Colombia, cerca del 8 % de personas sufren de DM2 (3, 4). La enfermedad renal diabética (ERD) es una de las complicaciones más importantes de la diabetes, se estima que aproximadamente 20-50 % de pacientes con DM2 desarrollan ERD (5, 6). En Colombia se desconoce la incidencia, prevalencia y la mortalidad de la ERD (3) la cual es la causa

más común de enfermedad renal crónica (ERC) (1). La ERC se define como una tasa de filtración glomerular estimada (TFG) persistentemente < 60 mL/min/1.73 m², albuminuria (relación albuminuria/creatinuria, ACR, ≥ 30 mg / g), u otros marcadores de daño renal, como hematuria o anomalías estructurales. En la mayoría de las personas, la ERC no se identifica como resultado de los síntomas, sino que suele diagnosticarse a través de pruebas de tamizaje rutinarias. La recomendación es que se haga una prueba de tamizaje anual de estimación de TFG o medición de ACR a los pacientes con DM2 desde su diagnóstico. La Sociedad Americana de Nefrología y la Fundación Nacional del Riñón sugieren estimar la TFG mediante la fórmula CKD-EPI 2021 (3, 5). Aun así, la disminución de la TFG suele detectarse en las fases moderada o grave de la ERC, por lo que los pacientes se pierden el periodo óptimo de tratamiento. La detección

precoz y la corrección de los factores de riesgo modificables pueden reducir la tasa de deterioro de la función renal.

Los biomarcadores son características que pueden reflejar un estado patológico de forma más temprana que una manifestación clínica (7). Usualmente, el biomarcador está alterado en los enfermos. Para poder clasificar a una persona como enferma o no enferma debe establecerse un punto de corte del biomarcador de modo que los pacientes con niveles de un lado del punto de corte sean enfermos y del otro sanos. Para evaluar la efectividad práctica de un biomarcador se puede usar la curva Receiver Operating Characteristic (ROC), una gráfica de sensibilidad contra 1-especificidad de cada posible punto de corte del biomarcador. El índice de Youden es el valor para punto de corte que mejor tiene balance entre sensibilidad y especificidad (8).

Hasta el momento se han identificado una serie de proteínas proinflamatorias características de la ERD, entre las que se encuentran la interleucina (IL)-17 y la IL-33, las cuales podrían tener un potencial uso en la detección temprana de ERD. Se ha propuesto que la progresión de la enfermedad renal está asociada a la activación sostenida de la vía IL-33/ST2. Por lo tanto, la vía IL-33/ST2 parece ser un importante mecanismo subyacente a la enfermedad fibrótica renal (9). Se ha descrito que la IL-17 media lesión de podocitos, expansión del mesangio y fibrosis renal dentro del desarrollo de ERD (10, 11).

Este estudio se planteó para conocer las características sociodemográficas, clínicas, paraclínicas y niveles de IL-17 e IL-33 en nuestra población con DM2 y ERD, así como para encontrar si había diferencias en comparación con pacientes sin ERD y sin DM2. Además, se quiso indagar si existía algún grado de correlación entre los niveles de IL-17 e IL-33 y los marcadores de función renal, también si los niveles de IL-17 e IL-33 podrían tener alguna utilidad diagnóstica.

Metodología

Diseño del estudio

Estudio observacional, analítico, de corte transversal, desarrollado con los pacientes de la

consulta externa de endocrinología de un hospital de tercer nivel de Neiva, Colombia.

Pacientes y muestras

El estudio fue aprobado según acta 010-003 del 16 de octubre de 2018 por el Comité de Ética Bioética e Investigación Local. Durante el periodo de reclutamiento, aproximadamente 1000 pacientes fueron a la consulta de endocrinología del hospital de referencia, se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia y se invitó a participar a los pacientes con DM2 de la consulta externa de endocrinología del HUHMP, así como también a aquellos que no tenían DM2. Los pacientes fueron divididos en grupos: los que tenían ERD fueron definidos por la presencia de diagnóstico de DM2 y alguno de los dos criterios para ERD: tasa de filtración glomerular estimada < 60 mL/min/1.73 m² o relación albuminuria/creatinuria (en adelante microalbuminuria) ≥ 30 mg/g (5). Los demás pacientes con DM2 que no cumplieron criterios para diagnóstico de ERD fueron asignados al grupo sin ERD. Los participantes que no tenían diagnóstico de DM2 fueron asignados al grupo sin DM2. Se incluyeron todos los pacientes que firmaron el consentimiento informado y se les tomó muestra de sangre y de orina. Se excluyeron aquellos a los que no se pudo tener acceso a la historia clínica o cuyas muestras fueron mal rotuladas. Los pacientes que aceptaron participar fueron redirigidos a las instalaciones del hospital local para la toma de muestras de sangre (4-6 mL), las cuales fueron realizadas por personal calificado a través de una venopunción; las muestras se recogieron en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, Greiner bio-one North America Inc., Ref 454021H, 4238 Capital Drive, Monroe, NC 28110, USA). También, se recolectaron las muestras de orina en los frascos recomendados para tal fin. Las muestras fueron centrifugadas a 300 x g, para luego recoger el sobrenadante y almacenarlo a -70°C hasta el momento de la medición de IL-17 e IL-33 en el Laboratorio de Infección e Inmunidad de la Facultad de Salud de la Universidad Surcolombiana.

Historia clínica

Se recolectó información de las historias clínicas registradas en el sistema del hospital de

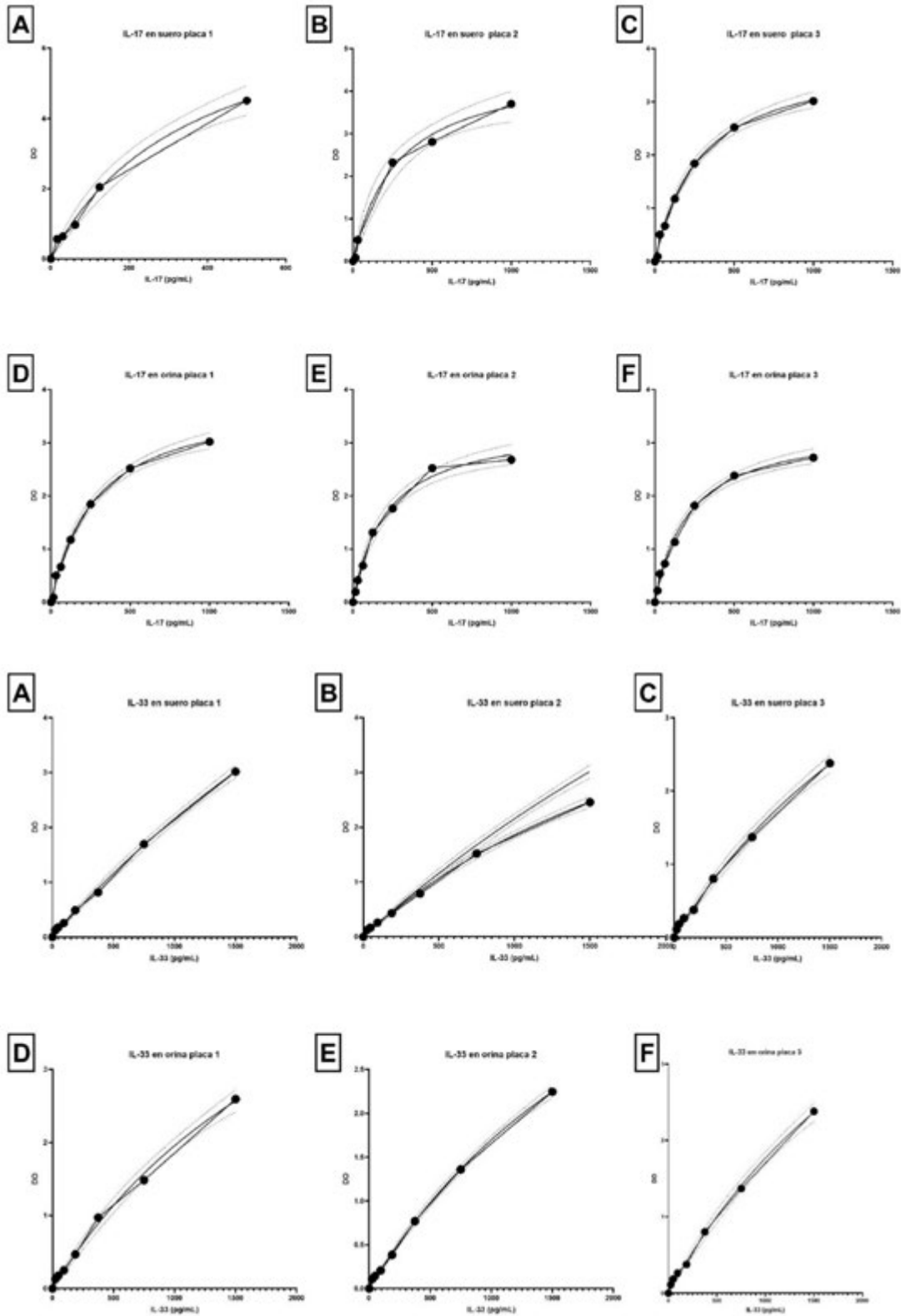
referencia. Se extrajeron datos de las variables sociodemográficas, como edad y género; también, información de variables clínicas, como peso, talla, antecedentes patológicos, tratamiento farmacológico previo, entre otros. Se recolectaron también datos sobre resultados de laboratorios registrados en la historia clínica: glucosa plasmática en ayunas (en adelante glucemia), colesterol sérico, triglicéridos séricos (TAG), colesterol de lipoproteína de alta densidad (HDL), colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL), creatinina sérica, hemoglobina glicada (HbA1c) y microalbuminuria (o albuminuria —cuando se use el término macroalbuminuria corresponderá a los casos con niveles ≥ 300 mg/g—). A partir de la creatinina sérica y el género se calculó la tasa de filtración glomerular utilizando la ecuación establecida por la National Kidney Foundation (CKD-EPI 2021).

Medición de IL-17 e IL-33

Para la detección de IL-17 e IL-33 en plasma y orina por ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA, por sus siglas en inglés) se emplearon el kit de ELISA (R&D Human IL-17 DuoSet ELISA, Cat: DYDY317 y R&D Human IL-33 DuoSet ELISA Cat: 3625B, McKinley Place NE, Minneapolis, MN 55413, USA), comercialmente disponibles, siguiendo las recomendaciones del fabricante. En placas de 96 pozos se adicionó el anticuerpo de captura. Luego de bloquear la placa, se adicionaron 100 μ l de la muestra pura de plasma/orina en duplicado; posteriormente, se agregó el anticuerpo de captura y, en pasos sucesivos, los reactivos del sistema de revelado. Para los experimentos de IL-17 se usó como anticuerpo de captura un anti-IL-17-humana de ratón y como anticuerpo de detección se usó un anti-IL-17-humana biotinilado de cabra, y, para los experimentos de IL-33, se utilizó como anticuerpo de captura un anti-IL-33-humana de cabra y como anticuerpo de detección se utilizó un anti-IL-33-humana biotinilado de conejo. Como sistema de revelado se utilizó una solución sustrato que mezcla peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y Tetrametilbencidina (TMB) en proporción 1:1, la cual se dejó actuar a temperatura ambiente, hasta que la intensidad de color de la dilución final de la curva estándar fuera dos veces la intensidad

del control negativo (solución diluyente). Se detuvo la reacción con ácido sulfúrico con concentración 2 N y, finalmente, la placa fue leída en espectrofotómetro Multiskan FC (Thermo) a 450 nm. Los resultados de densidades ópticas se corrigieron restando el promedio del blanco de cada experimento. La concentraciones de IL-17 e IL-33 fueron calculadas a partir de la interpolación a una la curva estándar con modelo de hipérbola, con 5–7 puntos de referencia empleando para ello el software GraphPad Prism 9.5.0 (GraphPad Prism, La Jolla, CA). La concentración inferior en la curva estándar del kit de la IL-17 era de 15.6 pg/mL y del kit de la IL-33 de 23.4 pg/mL. Los valores inferiores a estos fueron extrapolados según la curva estándar. Se incluyeron todos los experimentos en los que la variabilidad entre duplicados fue $< 10\%$ y el r^2 de las curvas estándar fue $> 99\%$ para asegurar la mayor precisión de los datos (Suplementaria 1). La extrapolación es un método que ofrece menor error que la imputación para reemplazar datos inferiores a los de la sensibilidad de un ensayo (12). Los valores extrapolados que estuvieron entre 0 y 0.05 pg/mL se muestran como < 0.05 .

Los datos obtenidos de los pacientes a partir de las historias clínicas y los niveles de IL-17 e IL-33 en plasma y orina medidos por ELISA fueron registrados en una base de datos en Microsoft® Excel® para Office 365 MSO versión 16.0.10730.202064 32 bits (Microsoft Headquarters One Microsoft Way Redmond, WA 98052) y, posteriormente, analizados con el software estadístico GraphPad Prism versión 9.5.0 (GraphPad Software 2365 Northside Dr. Suite 560 San Diego, CA 92108). Se realizó una prueba de normalidad de Kolmogórov–Smirnov. Los datos son expresados como mediana (mínimo–máximo) para las variables continuas y como frecuencia y proporciones para las variables categóricas. Las diferencias entre dos grupos, para las variables cuantitativas, fueron analizadas usando la prueba U de Mann–Whitney (MW) para las variables con distribución no normal. Para la comparación entre más de dos grupos se usó la prueba de Kruskal–Wallis (KW) para las variables con distribución no normal. Si la prueba de KW mostraba diferencias significativas estadísticamente, se aplicó la prueba de Dunn para comparaciones múltiples entre las



Suplementaria 1. Curvas estándar de IL-17 e IL-33.

Fuente: elaboración propia.

posibles parejas. Para las variables categóricas se usaron las pruebas de Chi cuadrado o test exacto de Fisher según fue pertinente. Se realizó un análisis de correlación mediante prueba de rho de Spearman entre las variables de función renal y niveles de IL. Como análisis exploratorio, por análisis Receiver Operating Characteristics (ROC) y cálculo del índice de Youden, se identificó el punto de corte óptimo para distinguir entre los grupos ERD y sin ERD mediante los niveles de IL-33 en plasma. De la curva ROC se expresa el área bajo la curva (AUC) (CI). Las variables con *missing data* > 30 % fueron excluidas del análisis. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Resultados

Desde junio de 2018 a junio de 2020 se invitó a los pacientes de la consulta de endocrinología del HUHMP a participar en el estudio (N=1,000). Durante el periodo de reclutamiento, 69 pacientes con DM2 y 29 sin DM2 aceptaron participar. Todos los participantes firmaron el formato de consentimiento informado. De los pacientes con DM2 se excluyeron 7 por imposibilidad de acceder a la historia clínica por motivos técnicos o por pérdida en las muestras de sangre y orina. Se incluyeron finalmente 62 pacientes con DM2, los cuales se clasificaron en pacientes con ERD (n=23) y sin ERD (n=39) (figura 1).

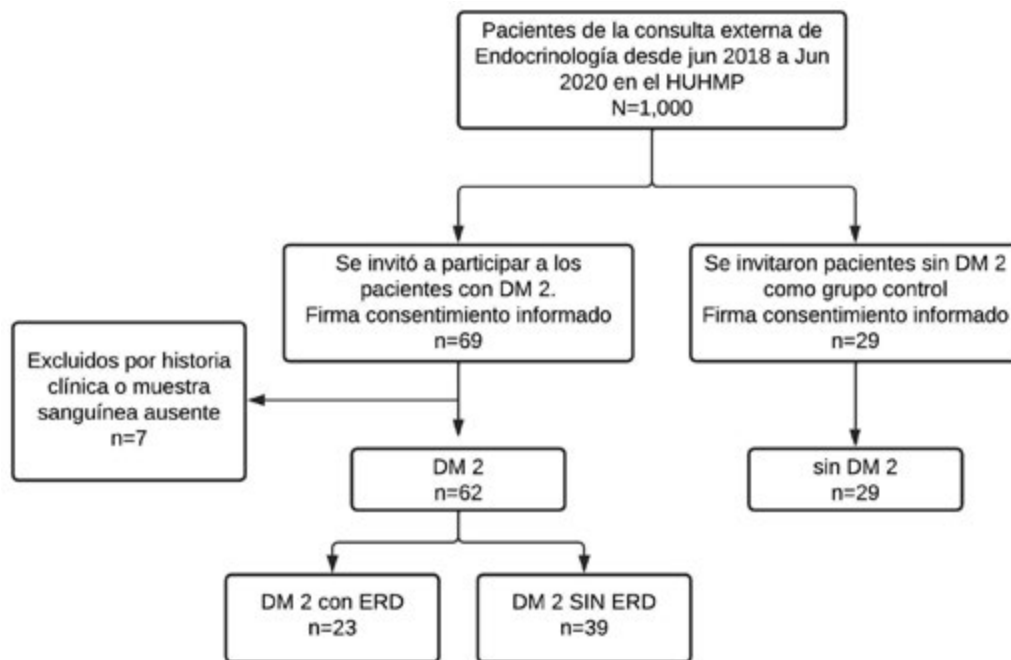


Figura 1. Flujograma del estudio. HUHMP: Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo. DM2: diabetes mellitus tipo 2. ERD: enfermedad renal diabética.

Fuente: elaboración propia.

Características sociodemográficas

En la Tabla 1 se encuentran las características sociodemográficas de los participantes. En el grupo sin DM2 había mayor proporción de

participantes femeninas que en los grupos de pacientes con DM2. La edad de los pacientes con ERD ($p < 0.0001$) y sin ERD ($p=0.0281$) fue mayor que la edad de los pacientes sin DM2.

Tabla 1. Características sociodemográficas

Variable	DM2, n = 62				sin DM2, n = 29		p
	ERD, n = 23		sin ERD, n = 39				
Género, Femenino ^o	14	60.87	23	58.97	28	96.55	0.0014*
Edad, años [†]	64	36–86	57	34–80	51	22–75	0.0001*
Peso, Kg [†]	68	51–112	75	45–122	69	41–107	0.4959
Talla, Cm [†]	158	143–173	159	148–180	157	152–163	0.4695
IMC, Kg/m2 [†]	27.27	19.68–45.2	27.94	20–42.6	31.4	23.2–40.2	0.2501

^oSe expresan: frecuencia, porcentaje; el valor de p corresponde a la prueba de Chi cuadrado.

[†] se expresan: mediana, mínimo–máximo; el valor de p corresponde a la prueba de Kruskal–Wallis. DM2: diabetes mellitus tipo 2. ERD: enfermedad renal diabética. IMC: índice de masa corporal.

Fuente: elaboración propia.

Comorbilidades

La comorbilidad más frecuente en pacientes con DM2 con ERD ($n=14$, 60 %) y sin ERD ($n=25$, 64 %) fue la hipertensión arterial; en el grupo de ERD, las siguientes comorbilidades más frecuentes fueron el hipotiroidismo ($n=6$, 26 %), la insuficiencia cardiaca ($n=4$, 17 %), la enfermedad pulmonar obstructiva crónica ($n=2$, 8 %), la enfermedad cerebrovascular ($n=2$, 8 %), la osteoporosis ($n=1$, 4 %) y el hipertiroidismo ($n=1$, 4 %). En el grupo de pacientes sin ERD, luego de la hipertensión, las más frecuentes fueron: el hipotiroidismo ($n=10$, 25 %), la enfermedad cerebrovascular ($n=4$, 10 %), la osteoporosis ($n=4$, 10 %) y el hipertiroidismo ($n=4$, 10 %). No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las frecuencias excepto en la frecuencia

de insuficiencia cardiaca congestiva, que fue mayor en el grupo ERD ($p=0.0159$). La variable de tiempo desde el diagnóstico de diabetes fue excluida del análisis por su alto *missing data*.

Características paraclínicas

Las características de los hallazgos de laboratorio de los grupos se muestran en la tabla 2. Se encontraron diferencias significativas entre los niveles de glucemia del grupo no DM comparado con los pacientes con ERD y sin ERD. Otras diferencias identificadas fueron un menor valor de creatinina sérica de los pacientes sin DM2 comparados con el grupo con ERD ($p=0.0277$). Solo cinco de los pacientes ERD fueron clasificados así por su TFG, los demás se asignaron a este grupo por su nivel de microalbuminuria.

Tabla 2. Características paraclínicas

Paraclínico [°]	DM2, n = 62				sin DM2, n = 29		p
	ERD, n = 23		sin ERD, n = 39				
COLT, mg/dL	170	116-299	195	106-283	180	135-322	0.2551
TAG, mg/dL	154	103-625	157	57-485	134	66-444	0.3689
LDL, mg/dL	82	33.8-219	105	43-176	111	61-197	0.2327
HDL, mg/dL	38	27-60	40	29-93	49	25-68	0.0946
Glucemia, mg/dL	140	88-355	147	88-437	90	69-111	<0.0001*
HBA1c, %	8.2	6-12.3	8.4	5.8-15	N.A.		0.6297 ^{°°}
SCr, mg/dL	0.8	0.4-2.7	0.8	0.4-1.37	0.7	0.4-1.1	0.0319*
MiAlb, mg/g	61	8.2-434	4.8	0-18	N.A.		<0.0001* ^{°°}
TFG, 1.73 m ² /mL/min	93.4	24-123	103	66-122	104	58-126	0.1065

[°]se expresan: mediana, mínimo-máximo.

DM2: diabetes mellitus tipo 2. ERD: enfermedad renal diabética. COLT: colesterol total. TAG: triglicéridos. LDL: colesterol de baja densidad. HDL: colesterol de alta densidad. HBA1c: hemoglobina glicada. SCr: creatinina en plasma. MiAlb: microalbuminuria. TFG: tasa de filtración glomerular calculada por CKD-EPI 2021. El valor de p corresponde a la prueba de Kruskal-Wallis.

^{°°}el valor de p corresponde a la prueba U de Mann-Whitney.

Fuente: elaboración propia.

Medicamentos

En orden, los medicamentos y grupos de medicamentos que recibían con mayor frecuencia los pacientes con ERD fueron: insulina basal (n=16, 69 %), metformina (n=13, 56 %), estatinas (n=11, 47 %), inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs)/antagonistas del receptor de angiotensina-2 (ARA-2) (n=11, 47 %), ácido acetil salicílico (n=10, n 43 %), calcio-antagonistas (n=6, 26 %), análogos del Glucagon-Like-Peptide-1 (aGLP-1) (n=5, 21 %), inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 (iDPP-4) (n=2, 8 %), inhibidores del cotransportador de sodio-glucosa-2 (iSGLT-2) (n=2, 8 %) y diuréticos (n=1, 4 %). No se encontraron diferencias significativas de la frecuencia de uso medicamentos entre los grupos sin ERD y con ERD.

Niveles de interleucinas-17 y 33 en plasma y orina

La tabla 3 muestra los valores de los niveles de IL-17 e IL-33 en plasma y orina. También se muestra el número de pacientes que tuvieron niveles detectables de cada IL en plasma y orina. No se encontró ninguna diferencia respecto a los niveles de IL-17 en plasma ni en la frecuencia de pacientes con niveles detectables (figura 2, A y B).

Sobre los niveles de IL-17 en orina, los niveles de los pacientes con ERD y sin ERD fueron mayores comparados con los valores de los pacientes sin DM2 (figura 2, C); no hubo diferencias en cuanto al número de pacientes con niveles detectables

Tabla 3. Niveles de interleucinas 17 y 33 en plasma y orina

Interleucinas	DM2, n = 62					sin DM2, n = 29		p
	ERD, n = 23		sin ERD, n = 39					
IL-17 (pg/mL) en plasma	Me, Mín-Máx	0.06	<0.05-0.22	<0.05	<0.05-1.02	<0.05	<0.05-1.39	0.9343 [·]
	n, %¶	15	65.22	23	58.97	16	55.17	0.7633 [¤]
IL-17 (pg/mL) en orina	Me, Mín-Máx	1	0.39-1.42	1.00	<0.05-2.88	0.47	<0.05-1.01	<0.0001* [·]
	n, %¶	23	100	37	94.87	26	89.65	0.2643 [¤]
IL-33 (pg/mL) en plasma	Me, Mín-Máx	<0.05	<0.05-12.83	1.59	<0.05-30.36	1.85	<0.05-29.43	0.0055* [·]
	n, %¶	8	34.78	31	79.48	18	62.07	0.0021* [¤]
IL-33 (pg/mL) en orina	Me, Mín-Máx	18.07	12.16-26.63	20.21	<0.05-33.15	19.54	<0.05-34.87	0.3060 [·]
	n, %¶	23	100	38	97.41	28	96.55	0.6865 [¤]

IL: interleucina. DM2: diabetes mellitus tipo 2. ERD: enfermedad renal diabética.
Me: Mediana. Mín-Máx: mínimo-máximo.

¶pacientes con niveles detectables.

·El valor de p corresponde a la prueba de Kruskal-Wallis.

¤El valor de p corresponde a la prueba de Chi cuadrado.

Fuente: elaboración propia

de IL-17 en orina entre los grupos (figura 2, D). Adicionalmente, se encontró que los pacientes con DM2 sin proteinuria y los pacientes con DM2 con microalbuminuria presentan mayores niveles de IL-17 en orina, comparado con los pacientes sin DM2 ($p < 0.0001$). No se encontró diferencia entre los niveles de IL-17 en orina de pacientes con ERD y macroalbuminuria y de los pacientes sin DM2 (suplementaria 2).

Los niveles de IL-33 en plasma fueron diferentes en magnitud y en frecuencia de detección: mayores en los pacientes sin DM2, comparados con los pacientes con ERD (figura 2, E); la proporción de pacientes con niveles detectables fue mayor en los pacientes sin ERD ($p=0.0009$, Odds ratio: 0.1376, intervalo de confianza 95 %: 0.0428-0.4236) y sin DM2

comparados con los de pacientes con ERD (figura 2, F). En los pacientes con ERD se encontró asociación entre tener niveles detectables de IL-33 en plasma y TFG < 60 1.73 mL/min ($p=0.0329$). No se encontró asociación entre niveles detectables de IL-33 en plasma y presencia de falla cardiaca como comorbilidad ($p=0.1028$), ni los niveles que se detectaron de aquellos con falla cardiaca fueron diferentes ($p=0.2501$).

Por último, respecto a los niveles de IL-33 en orina, no se encontró diferencia entre la magnitud de los niveles detectables ni en la frecuencia de pacientes con niveles detectables (figura 2, G y H). Al separar ERD según el estadio en ERC avanzada y ERC no avanzada ($p > 0.05$) no se encontraron diferencias adicionales.

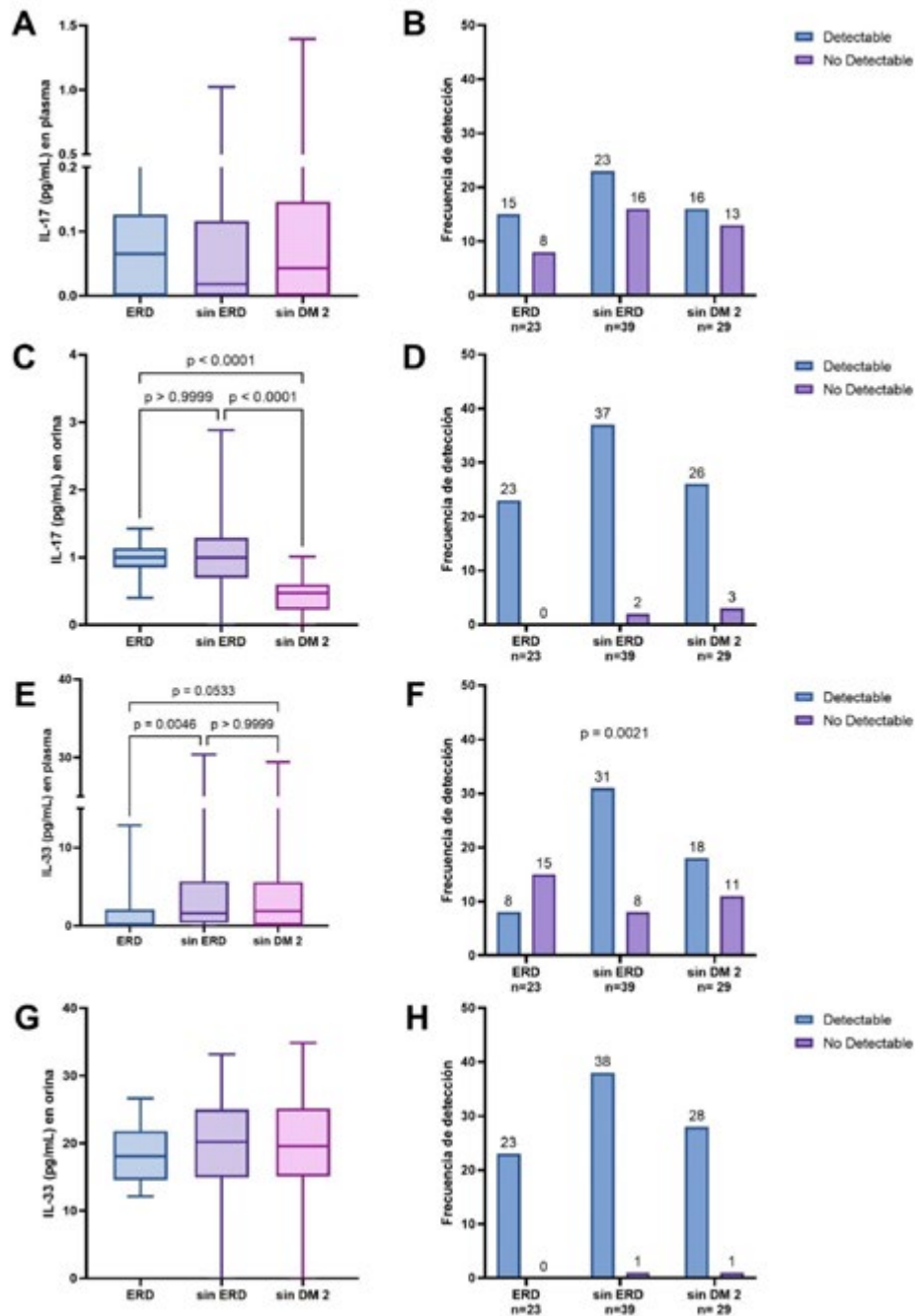
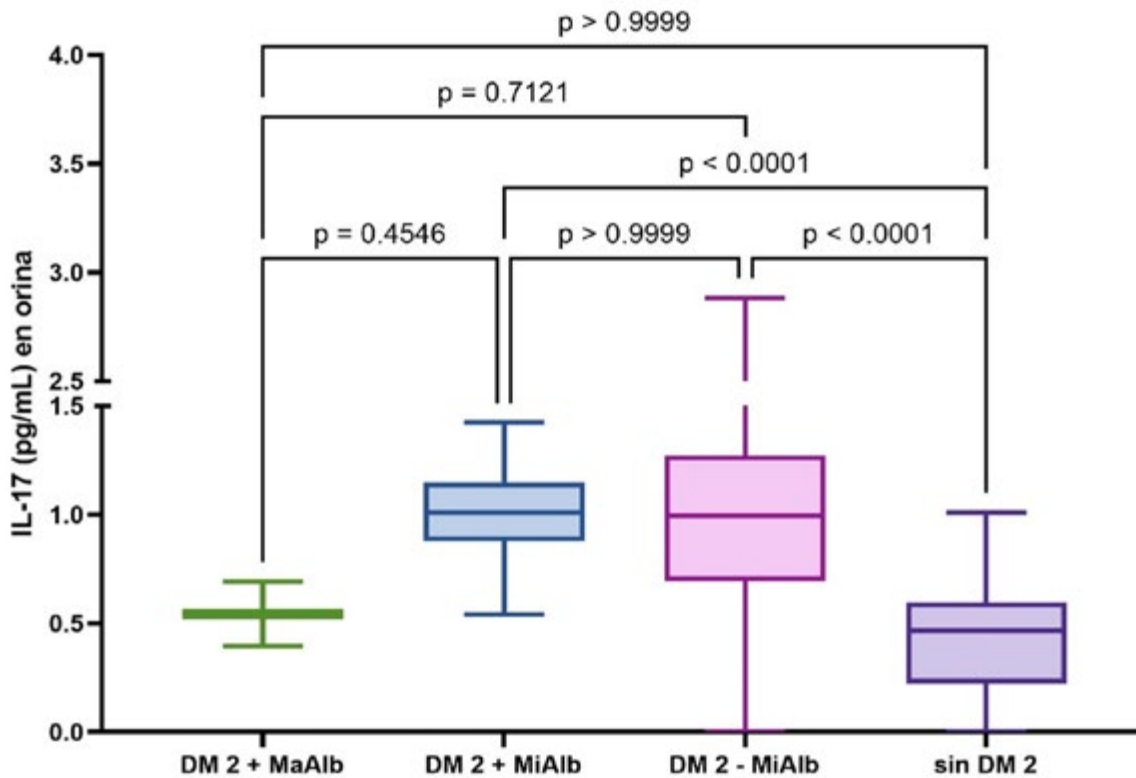


Figura 2. Diagramas de cajas y bigotes e histogramas de frecuencia de pacientes con niveles detectables de interleucinas (IL)-17 y 33 en plasma y orina.

IL: interleucina. DM2: diabetes mellitus tipo 2. ERD: enfermedad renal diabética. A y B, IL-17 en plasma. C y D, IL-17 en orina. E y F, IL-33 en plasma. G y H, IL-33 en orina. Los valores de p en los diagramas de cajas y bigotes corresponden a la prueba de comparaciones múltiples de Dunn en las comparaciones donde se encontraron diferencias en la prueba de Kruskal-Wallis. En los histogramas, los valores de p corresponden a la prueba de chi cuadrado. Solo se muestran los resultados de las pruebas de hipótesis en las que se encontraron diferencias significativas.

Fuente: elaboración propia.



Suplementaria 2.

Diagramas de cajas y bigotes e histogramas de los niveles de interleucina (IL)-17 en orina de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DM2) con macroalbuminuria (MaAlb), microalbuminuria (MiAlb), sin MiAlb y sin DM2. Los valores de p corresponden a la prueba de comparaciones múltiples de Dunn.

Fuente: elaboración propia.

Correlación entre marcadores de función renal y niveles de interleucinas

Se evaluó la correlación mediante la *rho* de Spearman en los grupos sin DM2 (figura 3, A), todos los pacientes con DM2 (figura 3, B), y divididos en ERD (figura 3, C) y sin ERD (figura 3, D). En los pacientes sin DM2 se encontró una correlación positiva entre los niveles de creatinina sérica y los niveles de IL-33 en plasma. En los pacientes con DM2 se encontró una correlación negativa entre los niveles de microalbuminuria y los niveles de IL-33 en plasma; además, se encontró una correlación positiva entre los niveles en orina de IL-17 e IL-33. Cuando se analizaron por separado los pacientes sin ERD y ERD, se encontró que la correlación positiva entre

los niveles en orina de IL-17 e IL-33 era mayor en este último grupo. En todos los grupos se encontró correlación negativa entre los niveles de creatinina sérica y la tasa de filtración glomerular, siendo mayor la correlación en pacientes con DM2 dentro de este grupo, en los pacientes ERD. No hubo correlación entre la microalbuminuria y los niveles de IL-17 o IL-33.

Rendimiento diagnóstico de los niveles de IL-33 en plasma

Por las diferencias encontradas entre pacientes con ERD y sin ERD se exploró el rendimiento diagnóstico de los niveles y frecuencia de detección de IL-33 en plasma. Basados en la frecuencia de detección de los niveles,

la sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos: positivo y negativo; ningún indicador de diagnóstico fue superior al 60 %. Explorando el rendimiento diagnóstico de los niveles de IL-33 en plasma se construyó una curva ROC (figura 4) con un AUC de 0.74 ($p=0.0012$). El punto de corte

con el mejor índice de Youden fue < 0.1585 pg/mL con sensibilidad de 73.9 % y especificidad de 79.4 %. La curva ROC con los niveles de IL-33 en plasma no tuvo un AUC aceptable para diferenciar pacientes con DM2 y sin DM2.

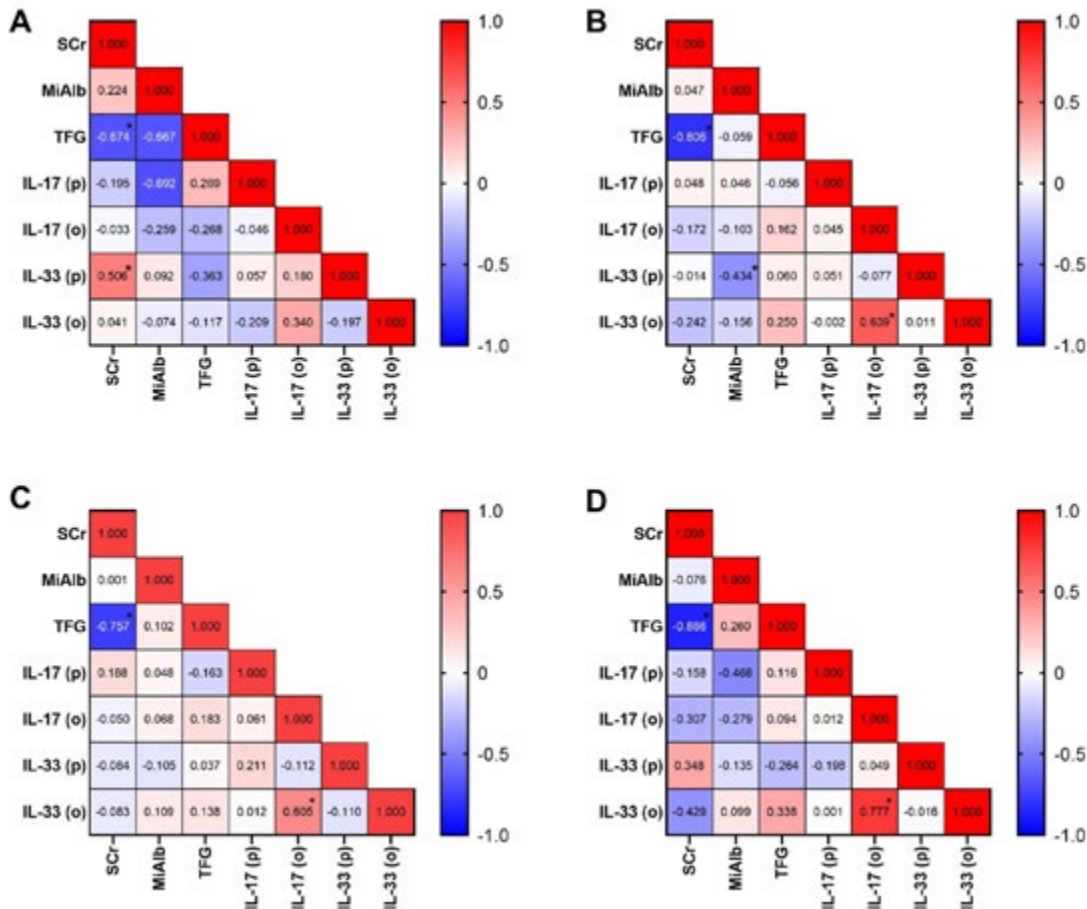


Figura 3. Matriz de correlaciones entre marcadores de función renal e interleucinas 17 y 33 en plasma y orina. Se muestra el valor de rho de Spearman. * $p < 0.05$.

DM2: diabetes mellitus tipo 2. ERD: enfermedad renal diabética. IL: interleucina. (p): en muestra de plasma. (o): en muestra de orina. A: en grupo sin DM2. B: pacientes con DM2. C: en grupo sin ERD. D: en grupo ERD. SCr: creatinina en plasma. MiAlb: microalbuminuria. TFG: tasa de filtración glomerular.

Fuente: elaboración propia.

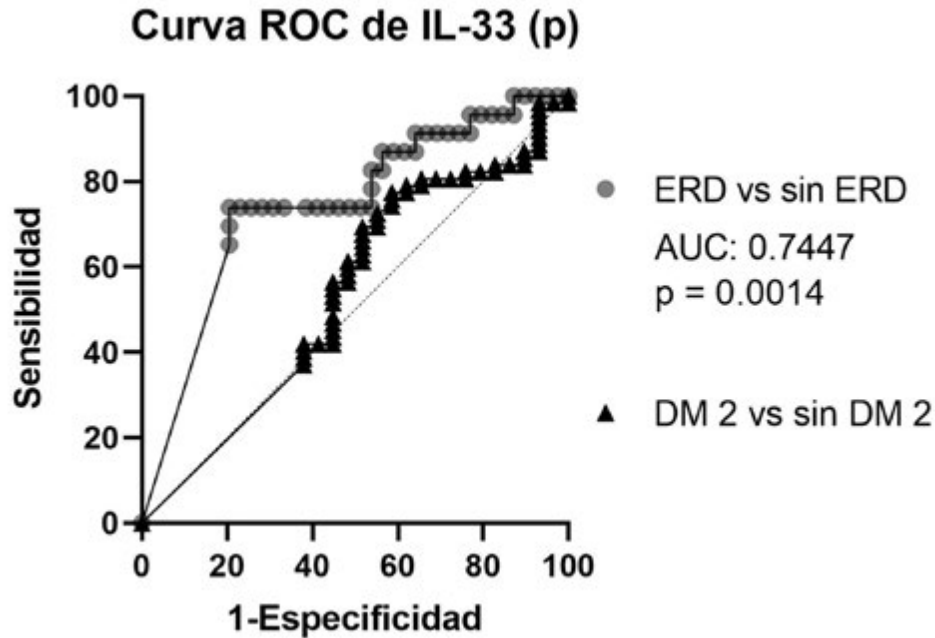


Figura 4. Curva Receiver Operator Characteristics de la interleucina-33 en plasma (p) para pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DM2) con enfermedad renal diabética (ERD) vs. sin enfermedad renal diabética.

AUC: área bajo la curva.

Fuente: elaboración propia.

Discusión

Este artículo representa el primer estudio a nivel nacional que evalúa los niveles de IL-17 e IL-33 en pacientes con ERD, sin ERD y sin DM2.

En investigaciones previas sobre caracterización de pacientes con DM2 en el país, se ha encontrado que la edad de los pacientes en promedio era de 60 años aproximadamente (2), similar al dato encontrado en nuestro grupo de pacientes con DM2. De igual forma, los pacientes con DM2 son con más frecuencia mujeres: alrededor de 60 % (2), dato que también es similar a lo que mostraron nuestros pacientes. La diferencia de edad encontrada entre pacientes con DM2 y sin DM2 es la esperada, pues es ya bien conocido que la edad es un factor de riesgo para el desarrollo de DM2 (3). En estudios de la India también se han reportado datos similares sobre la edad (13).

Sobre las comorbilidades, también encontramos datos similares a lo ya reportado en el país (2). La comorbilidad más frecuente de los pacientes con DM2 fue la hipertensión arterial, la cual se presenta en alrededor de 62 % de nuestros pacientes. El sobrepeso y la obesidad estuvieron presentes en al menos 50 % de nuestros pacientes, lo que también se ha reportado en estudios nacionales previos (2, 3). Lo mismo ocurre con el control de lípidos; un hecho a favor de nuestro estudio fue que las comorbilidades que pueden afectar los niveles de IL-33 (14) se encontraban balanceadas entre los pacientes con ERD y sin ERD.

Respecto al uso de medicamentos en pacientes con DM2, los estudios nacionales previos son de hace poco más de 10 años, por lo que era frecuente la formulación de sulfonilureas y metformina (2). La metformina

sigue apareciendo como medicamento usado en cerca de 50 % de los pacientes, mientras que, actualmente, no se encontraron pacientes usando sulfonilureas. En cerca de un 50 % de pacientes del estudio se encontró el uso de un iDPP4, aGLP-1 o iSGLT-2, medicamentos que se ha visto que pueden tener efectos antiinflamatorios en la ERD. Afortunadamente, no hubo diferencias entre los pacientes con ERD y sin ERD en cuanto a la frecuencia del uso de estos medicamentos, lo cual disminuye su efecto en las diferencias encontradas en cuanto a niveles de ILs.

Lo encontrado en los reportes de paraclínicos de los pacientes del estudio pone de manifiesto que la mayoría de pacientes no se encuentran con niveles en meta de HbA1c, lo que ha sido reportado también en otros estudios nacionales previos (2). De todos modos, también existen reportes de poblaciones con pacientes con DM2 y niveles de HbA1c en metas, como en un estudio reportado en 2020, realizado con pacientes de Armenia (3). En países como la India, también se ha reportado un alto porcentaje de pacientes con HbA1c fuera de metas (13).

En la práctica diaria local, no es frecuente que el personal médico en general, que atiende pacientes con DM2, haga uso rutinario de la medición de microalbuminuria para el seguimiento del compromiso renal de estos pacientes. Un hallazgo interesante de este estudio es que la mayoría de los pacientes que fueron clasificados con ERD no fueron clasificados así por su TFG, sino por su microalbuminuria, lo que resalta el papel importante que tiene la medición de microalbuminuria para la correcta identificación de pacientes con ERD. En otras palabras, de no haberse tenido en cuenta el criterio de microalbuminuria para la clasificación de los pacientes con ERD, la mayoría de estos hubiera sido clasificado como no ERD. En la práctica clínica esto puede afectar de forma negativa el ejercicio médico de aquellos que no hacen seguimiento a los niveles de microalbuminuria de los pacientes con DM2; por supuesto, es una práctica que priva a los pacientes de un manejo idóneo. No restamos valor al seguimiento de los niveles de creatinina sérica para la estimación de la TFG, pero sí hacemos énfasis en que también es necesario seguir los niveles de albuminuria.

Se ha descrito previamente que hay una población de células Th17 que infiltra el riñón en los pacientes con ERD, lo que produce aumento de IL-17 localmente (15). Nuestros resultados también soportan esta teoría, ya que se encontraron mayores niveles de IL-17 en la orina de pacientes con ERD, comparado con los pacientes sin DM2, igual que en otros estudios (8). De igual forma, encontramos que los niveles de IL-17 en orina son mayores en los pacientes con DM2 sin proteinuria y aquellos con microalbuminuria comparados con aquellos sin DM2. No se encontró diferencia entre los pacientes con ERD y macroalbuminuria y los pacientes sin DM2. Esto ha sido reportado antes, sugiriendo que temprano en la DM2, incluso en pacientes que no cumplen criterios para ERD, existe una expresión aumentada de IL-17, pero que es disminuida una vez se desarrolla una ERD más avanzada (10).

En otros estudios, se han encontrado diferencias entre pacientes sin DM2 y pacientes con DM2 y diversos grados de ERD respecto a los niveles de IL-17 circulantes, siendo mayores en los pacientes con enfermedad (16). En nuestro estudio no se encontraron estas diferencias de niveles en plasma.

El hecho de que hayamos identificado también mayores niveles de IL-17 en la orina de pacientes con DM2 pero sin ERD comparados con los niveles de pacientes sin DM2 sugiere que la producción aumentada de IL-17 localmente en el riñón precede el desarrollo de ERD. Sería interesante poder establecer el punto en el cual se empieza a aumentar la producción local de IL-17 y cuánto tiempo después de estos cambios se presenta la ERD. Además, sería interesante conocer si el uso de fármacos con efecto anti-IL17 pudiera retrasar el inicio de ERD en humanos, algo que ha sido demostrado en modelos murinos (10).

En nuestro estudio encontramos que los pacientes con ERD presentan menores niveles de IL-33 en plasma comparados con los niveles de pacientes sin ERD y muestran una tendencia a ser menores, también comparados con los niveles de pacientes sin DM2, lo que estaría acorde a los hallazgos previamente reportados que muestran que la expresión de ácidos ribonucleicos mensajeros de IL-33 está disminuida en los pacientes con

ERD cuando se compara con individuos sanos (16). En otros estudios también se ha encontrado la misma diferencia entre los niveles de IL-33 en plasma de pacientes sin DM2 y ERD; también, se han hallado menores niveles de IL-33 en pacientes con ERD, comparados con los pacientes con DM2 pero sin ERD (13). Aparte de esta similitud con este estudio realizado en India, es de interés notar que los niveles de IL-33 en plasma fueron mucho mayores que los encontrados en nuestro estudio, mientras que los mayores niveles de IL-33 en el estudio de India fueron alrededor de 348 pg/mL (13). En nuestro estudio, los mayores niveles fueron cerca de 19.54 pg/mL. En China, el nivel de IL-33 de pacientes sanos se ha reportado en 76.24 pg/mL (17). Esta diferencia podría hacer pensar que existe una expresión distinta de IL-33 en una variedad de poblaciones. Se ha reportado previamente que los pacientes sin DM2 presentan mayores niveles de IL-33 circulante que los pacientes con DM2 y una diferencia más grande con aquellos que presentan ERD.

Los biomarcadores de fibrosis, remodelado de la matriz e inflamación en falla cardíaca descritos incluyen al ST-2 y el sST2 (ST-2 soluble) que se puede medir en el plasma y se une a la IL-33 y anulan la vía IL-33/ST-2L (ST-2 ligando). El ST2 funciona como receptor para la IL-33 secretada por miocitos sometidos a tensión mecánica (18). La vía de señalización cardioprotectora IL-33/ST2L indica a los cardiomiocitos y células inmunes locales la presencia de lesiones ocasionadas por estrés miocárdico; además, controla e inhibe la hipertrofia de los cardiomiocitos y la fibrosis cardíaca (19). La producción aumentada de sST2 en los pacientes con falla cardíaca incluidos en el estudio podría estar relacionada con los bajos niveles detectados de IL-33 en los pacientes ERD, pues los cuatro pacientes con falla cardíaca estaban clasificados en el grupo ERD; sin embargo, no se encontró asociación ni diferencias significativas entre los pacientes con y sin falla cardíaca y los niveles detectables de IL-33.

En otros estudios se ha encontrado correlación positiva entre los niveles de IL-17 y los niveles de HbA1c en los pacientes con DM2 y compromiso renal (16); sin embargo, no hallamos esta correlación en nuestros resultados. En otros estudios se ha visto que los pacientes con ERD

presentan correlación positiva de los niveles de IL-17 con la albuminuria (20); no obstante, no encontramos este hallazgo en nuestra investigación. También, se ha analizado que hay una correlación negativa de IL-33 tanto con los niveles de HbA1c como con la microalbuminuria (11); sin embargo, estas no fueron encontradas en nuestro estudio. La medición simultánea de IL-17 y de IL-33 en plasma y orina no se ha encontrado en estudios previos, y, por esto, la correlación hallada entre los niveles de IL-17 e IL-33 en orina no ha sido previamente reportada.

Dentro de las debilidades de este trabajo se incluyen: la muestra, que no es representativa de toda la población para la estimación de la prevalencia de ERD y compromete la validez externa de los resultados. De todos modos, los datos sobre los niveles de IL-17 e IL-33 reportados en este estudio siguen siendo valiosos por la solidez de los métodos estadísticos utilizados y son congruentes con algunos reportes previos; además, es el primer trabajo de este tipo a nivel nacional. Al tener un componente retrospectivo, encontramos problemas con el *missing data*; particularmente, se identificó que no hay registro del tiempo desde el diagnóstico en los pacientes con DM2, un factor que es clave para determinar el riesgo cardiovascular de los mismos (5). En estudios previos se ha encontrado correlación entre los niveles de IL-17 o IL-33 y el tiempo de evolución de la DM2, pero por el inconveniente mencionado, no fue posible identificar si esta correlación también se presenta en nuestra población. Una posible solución para estas limitaciones podría ser el diseño de un estudio prospectivo, para evitar el *missing data*, y multicéntrico, para aumentar la muestra reclutada y mejorar la validez externa de los resultados.

Una situación muy retadora para el desarrollo de este trabajo fue el hecho de que la mayoría de los niveles de ILs estaban por debajo del límite de detección de los kits de ELISA utilizados, a pesar de que los DuoSet han demostrado ser kits útiles para la detección de estas IL (14). Esta situación se pudo sortear usando métodos de extrapolación basados en la curva estándar. No obstante, para futuros estudios en esta área podría ser útil usar otro método de diagnóstico más sensible (13), porque a pesar de que la r^2 de las curvas estándar

fue adecuada, no deja de ser una estimación que puede tener resultados que difieren de una medición precisa.

Es necesario mencionar que la utilidad diagnóstica de la IL-33 en plasma no se ha hecho antes en otros estudios. La utilidad que se expone en este trabajo es de manera exploratoria, teniendo en cuenta que el diseño principal del estudio no estaba encaminado hacia indagar el rendimiento diagnóstico de estos biomarcadores, sumado a que la mayoría de los valores de ILs que se identificaron aquí se encontraban por debajo del límite de detección de los kits de ELISA usados, por lo que la curva ROC puede estar sujeta a sesgos (8). No deja de ser interesante buscar en futuros estudios, con diseños de rendimiento diagnóstico más sólidos, el real rendimiento de estos biomarcadores.

Se recalca con esta investigación que es posible dentro de nuestras instituciones llevar a cabo trabajos en los que las ciencias clínicas y básicas se dan la mano para poder obtener buenos resultados. A pesar de ser un estudio con una muestra relativamente pequeña, es el primero de este tipo en nuestra región y el país, por lo que consideramos que los resultados son relevantes y servirán de base para el desarrollo de nuevas investigaciones que busquen complementar el conocimiento sobre ERD y la relación de los niveles IL con esta condición.

En conclusión, los niveles de IL-17 en orina son mayores en pacientes con DM2. Los niveles de IL-33 en plasma son mayores en pacientes sin ERD. El nivel de IL-33 en plasma podría ser útil para diferenciar casos de ERD. A pesar de las falencias, los resultados del estudio son importantes y resaltan la necesidad de realizar investigaciones de este tipo a nivel local. El presente trabajo representa la primera aproximación, a nivel nacional, para determinar los niveles de IL-17 e IL-33 en pacientes con ERD.

Contribuciones de los autores

José Santiago Cortés Guzmán: conceptualización, investigación, recursos, escritura (borrador original), escritura (revisión del borrador y revisión), visualización; Juan Sebastián Suárez Cano: conceptualización, investigación, recursos, escritura (revisión del borrador y revisión); Carlos F. Narváez: conceptualización, validación, escritura (revisión del borrador y revisión), supervisión; Alejandro Pinzón Tovar: conceptualización, validación, escritura (revisión del borrador y revisión), supervisión, administración del proyecto.

Declaración de fuentes de financiación

Los kits de ELISA utilizados durante la investigación fueron financiados, con rubro asignado para la investigación clínica, por la Asociación Colombiana de Endocrinología, Diabetes y Metabolismo. Los demás costos fueron autofinanciados.

Conflictos de interés

Los autores no presentan conflicto de intereses en relación con este trabajo.

Agradecimientos

Agradecemos a los médicos Gabriel Motta y Santiago Pinilla por su colaboración en la recolección de las muestras. Agradecemos, también, a la médica Sara Bolívar por su colaboración en la medición de las citocinas mientras prestaba su servicio social obligatorio en modalidad de investigación en el Laboratorio de Infección e Inmunidad de la Universidad Surcolombiana.

Referencias

- [1] Mima A. A narrative review of diabetic kidney disease: previous and current evidence-based therapeutic approaches. *Adv Ther.* 2022;39(8):3488–3500. <https://doi.org/10.1007/s12325-022-02223-0>
- [2] Villegas Perrasse A, Abad SB, Faciolince S, Hernández N, et al. El control de la diabetes mellitus y sus complicaciones en Medellín, Colombia, 2001–2003. *Rev Panam Salud Pública.* 2006;20(6):393–402. <https://doi.org/10.1590/S1020-49892006001100005>
- [3] Castañeda Espinosa L, Losada Alvarez LM, Serna Flórez J, Duque Valencia JL, Nieto Cárdenas OA. Prevalencia de enfermedad renal crónica en un población con diabetes tipo 2 de un programa de riesgo cardiovascular. *Rev Colomb Nefrol.* 2020;7(2):55–66. <https://doi.org/10.22265/acnef.7.2.481>
- [4] Vargas-Uricoechea H, Casas-Figueroa LÁ. An Epidemiologic Analysis of Diabetes in Colombia. *Ann Glob Health.* 2015;81(6):742–753. <https://doi.org/10.1016/j.aogh.2015.11.001>
- [5] de Boer IH, Khunti K, Sadusky T, Tuttle KR, et al. Diabetes management in chronic kidney disease: a consensus report by the American Diabetes Association (ADA) and Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Diabetes Care.* 2022;45(12):3075–3090. <https://doi.org/10.2337/dci22-0027>
- [6] Hoogeveen EK. The epidemiology of diabetic kidney disease. *Kidney Dial.* 2022;2(3):433–442. <https://doi.org/10.3390/kidneydial2030038>
- [7] Tan X-Y, Jing H-Y, Ma Y-R. Interleukin-33/ suppression of tumorigenicity 2 in renal fibrosis: emerging roles in prognosis and treatment. *Front Physiol.* 2022;12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.792897>
- [8] Mohamed R, Jayakumar C, Chen F, Fulton D, et al. Low-dose il-17 therapy prevents and reverses diabetic nephropathy, metabolic syndrome, and associated organ fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(3):745–765. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014111136>
- [9] Basile DP, Ullah MM, Collet JA, Mehrotra P. T helper 17 cells in the pathophysiology of acute and chronic kidney disease. *Kidney Res Clin Pract.* 2021;40(1):12–28. <https://doi.org/10.23876/jkrpcp.20.185>
- [10] Croghan CW, Egeghy PP. Methods of dealing with values below the limit of detection using SAS. Carolina del Norte: US-EPA, Research Triangle Park, NC. <https://analytics.ncsu.edu/sesug/2003/SD08-Croghan.pdf>
- [11] Anand G, Vasanthakumar R, Mohan V, Babu S, Aravindhan V. Increased IL-12 and decreased IL-33 serum levels are associated with increased Th1 and suppressed Th2 cytokine profile in patients with diabetic nephropathy (CURES-134). *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(11):8008–8015. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4270517/>
- [12] Erfurt S, Hoffmeister M, Oess S, Asmus K, et al. Serum IL-33 as a biomarker in different diseases: useful parameter or much need for clarification? *J Circ Biomarkers.* 2021;10(1):20–25. <https://doi.org/10.33393/jcb.2021.2327>
- [13] Nazarian A, Hejazian SM, Ahmadian E, Vahed SZ, et al. IL-17A rs2275913 gene polymorphism in patients with diabetic nephropathy. *Immunopathol Persa.* 2022:e29320. <https://doi.org/10.34172/ipp.2022.29320>
- [14] Mahmoud B, Abdel-Moneim A, Negeem Z, Nabil A. The relationship between B-cell lymphoma 2, interleukin-1 β , interleukin-17, and interleukin-33 and the development of diabetic nephropathy. *Mol Biol Rep.* 2022;49:3803–3809. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07221-7>
- [15] Tang H, Liu N, Feng X, Yang Y, et al. Circulating levels of IL-33 are elevated by obesity and positively correlated with metabolic disorders in Chinese adults. <http://revistaendocrino.org/index.php/rcedm>

- J Transl Med. 2021;19:52. <https://doi.org/10.1186/s12967-021-02711-x>
- [16] Zhang Y, Bauersachs J, Langer HF. Immune mechanisms in heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2017;19(11):1379–1389. <https://doi.org/10.1002/ejhf.942>
- [17] Biasucci LM, Maino A, Grimaldi MC, Cappannoli L, Aspromonte N. Novel biomarkers in heart failure: new insight in pathophysiology and clinical perspective. *J Clin Med.* 2021;10(13):2771. <https://doi.org/10.3390/jcm10132771>
- [18] Zhang C, Xiao C, Wang P, Xu W, et al. The alteration of Th1/Th2/Th17/Treg paradigm in patients with type 2 diabetes mellitus: relationship with diabetic nephropathy. *Hum Immunol.* 2014;75(4):289–296. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2014.02.007>
- [19] Ruopp MD, Perkins NJ, Whitcomb BW, Schisterman EF. Youden index and optimal cut-point estimated from observations affected by a lower limit of detection. *Biom J.* 2008;50(3):419–430. <https://doi.org/10.1002/bimj.200710415>