



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

BIOMEDICINA

**PARTICIPACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T Y B DE
MÉDULA ÓSEA EN EL DESARROLLO DE OSTEOPATÍA EN UN
MODELO MURINO DE DIABETES MELLITUS TIPO 2**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

SAÚL ERNESTO CIFUENTES MENDIOLA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. ANA LILIA GARCÍA HERNÁNDEZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dra. LETICIA MORENO FIERROS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

Dra. MARÍA CRISTINA VELASQUILLO MARTÍNEZ
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOMEDICINA

**PARTICIPACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T Y B DE
MÉDULA ÓSEA EN EL DESARROLLO DE OSTEOPATÍA EN UN
MODELO MURINO DE DIABETES MELLITUS TIPO 2**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

SAÚL ERNESTO CIFUENTES MENDIOLA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. ANA LILIA GARCÍA HERNÁNDEZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dra. LETICIA MORENO FIERROS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM
Dra. MARÍA CRISTINA VELASQUILLO MARTÍNEZ
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO, 2022

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

OFICIO CPCB/580/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **09 de mayo de 2022** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del estudiante **CIFUENTES MENDIOLA SAÚL ERNESTO** con número de cuenta **308003279** con la tesis titulada **“Participación de la activación de linfocitos T y B de médula ósea en el desarrollo de osteopatía en un modelo murino de diabetes mellitus tipo 2.”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. ANA LILIA GARCÍA HERNÁNDEZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN
Vocal: DR. MARCO ANTONIO ÁLVAREZ PÉREZ
Vocal: DR. JOSÉ LUIS MARAVILLAS MONTERO
Vocal: DR. MARTHA ASUNCIÓN SÁNCHEZ RODRÍGUEZ
Secretario: DRA. MARÍA CRISTINA VELASQUILLO MARTÍNEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 17 de junio de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Unidad de Posgrado, Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por haberme permitido realizar mis estudios de doctorado y brindarme una formación de calidad.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por aceptarme dentro del programa de becas para la realización de mis estudios de posgrado.

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (UNAM-DGAPA-PAPIIT) por el financiamiento para la realización de este trabajo con número de proyecto: IN21122.

Investigación realizada gracias al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECyT) por el financiamiento para la realización de este trabajo con número de proyecto: FICDTEM-2021-07

A la Dra. Ana Lilia García Hernández por dirigir mi trabajo de tesis, guiarme en mi desarrollo académico y profesional y brindarme una formación de calidad como futuro investigador.

A la Dra. Leticia Moreno Fierros y a la Dra. María Cristina Velasquillo Martínez, miembros de mi comité tutorial por el apoyo y sus valiosas contribuciones para el desarrollo, ejecución y conclusión del presente trabajo de investigación y por sus valiosas contribuciones en mi formación académica.

ÍNDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. <i>El tejido óseo</i>	3
1.2. <i>Diabetes mellitus tipo 2</i>	4
1.3. <i>Alteraciones inmunológicas en la DMT2</i>	5
1.3.1. <i>El sistema inmune y la resistencia a la insulina</i>	6
1.3.2. <i>El sistema inmune y la deficiencia de insulina</i>	7
1.4. <i>Osteopatía diabética</i>	7
2. ANTECEDENTES	9
3. HIPÓTESIS.....	11
4. OBJETIVOS	11
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	12
6. MATERIAL Y MÉTODOS	13
6.1. <i>Animales</i>	13
6.2. <i>Inducción de diabetes tipo 2</i>	13
6.3. <i>Inhibición de la activación de linfocitos</i>	14
6.4. <i>Determinación del perfil de citocinas en suero</i>	15
6.5. <i>Evaluación de las poblaciones de linfocitos y células presentadoras de antígeno</i>	15
6.6. <i>Cuantificación de TNF-α, RANK-L, IL-17 y proteínas carboniladas en el tejido óseo</i>	17
6.7. <i>Análisis de la microarquitectura ósea</i>	17
6.8. <i>Análisis de las propiedades biomecánicas óseas</i>	19
6.9. <i>Análisis histológico</i>	19
6.10. <i>Análisis estadístico</i>	20
7. RESULTADOS	21
7.1. <i>Los linfocitos T activados participan en el desarrollo de DMT2</i>	21
7.2. <i>La activación de los linfocitos T induce inflamación sistémica</i>	23
7.3. <i>La DMT2 incrementa la activación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en sangre periférica</i>	24
7.4. <i>La DMT2 incrementa la activación de los linfocitos T CD4⁺ inflamatorios y disminuye las poblaciones de Tregs en médula ósea</i>	28

7.5. La activación de los linfocitos T en la DMT2 induce el incremento de TNF-α y RANK-L en hueso.....	32
7.6. La activación de los linfocitos T CD4⁺ en la DMT2 induce una mala calidad ósea.....	33
7.7. La activación de los linfocitos T CD4⁺ disminuye el número de osteoblastos e incrementa el número de osteoclastos en la DMT2.....	36
7.8. El incremento en la activación de linfocitos T CD4⁺ en médula ósea conduce a un microambiente proinflamatorio en el hueso, mala calidad ósea y resistencia a la insulina en la DMT2.....	38
8. DISCUSIÓN	42
9. CONCLUSIONES	46
10. PERSPECTIVAS	47
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
ANEXO 1: ARTÍCULO REQUISITO	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrategia experimental.	12
Figura 2. Estrategia de selección para las poblaciones celulares de leucocitos de sangre periférica y médula ósea por citometría de flujo.	16
Figura 3. Selección de las regiones anatómicas y aplicación de ROI para el análisis por μ CT.	18
Figura 4. Los ratones con DMT2 desarrollaron obesidad central y resistencia a la insulina	21
Figura 5. Los linfocitos T activados participan en desarrollo de hiperglucemia y resistencia a la insulina.	22
Figura 6. Los linfocitos T activados participan en el desarrollo de inflamación sistémica.	23
Figura 7. La DMT2 incrementa el porcentaje de los linfocitos T CD8+ en sangre periférica.	25
Figura 8. La DMT2 induce la activación de los linfocitos CD4+ y CD8+ en sangre periférica.	26
Figura 9. No existen diferencias en las poblaciones de células presentadoras de antígeno de sangre periférica entre los grupos experimentales.	27
Figura 10. La DMT2 incrementa el porcentaje de linfocitos CD4+ en médula ósea.	29
Figura 11. La DMT2 induce la activación de linfocitos CD4+, incrementa la subpoblación de linfocitos Th17/TNF- α + y disminuye la subpoblación de linfocitos Tregs en médula ósea.	30
Figura 12. La DMT2 incrementa la expresión de MHCII en monocitos CD11b+ en la médula ósea femoral	31
Figura 13. La activación de los linfocitos T por la DMT2 induce una mayor concentración de TNF- α y RANK-L en hueso	32
Figura 14. La activación de los linfocitos CD4+ provocada por la DMT2 disminuye la densidad mineral ósea, incrementa la porosidad del hueso trabecular y reduce la resistencia ósea a la fractura.	34
Figura 15. La activación de los linfocitos CD4+ por la DMT2 reduce el número de células ALP+ e incrementa el número de células TRAP+ en el endostio.	37
Figura 16. La activación de los linfocitos T CD4 de médula ósea se correlaciona con alteraciones óseas y resistencia a la insulina en ratones con DMT2.	39
Figura 17. Correlación múltiple de Pearson entre todas las variables analizadas.	41

ABREVIATURAS

AGE's: productos finales de glicación avanzada

ALP: fosfatasa alcalina

B. área: área ósea

BM. área: área de la médula ósea

BMP: proteína morfogenética ósea

BSP: sialoproteína ósea

BV: volumen óseo

CD: cúmulo de diferenciación

Col1: colágena tipo 1

Conn. density: densidad de conectividad

Ct. Th.: grosor del hueso cortical

CTLA4-Ig: proteína de fusión entre el dominio extracelular del antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos y el dominio Fc de la inmunoglobulina G humana

DMT2: diabetes mellitus tipo 2

FGF: factor de crecimiento fibroblástico

FoxP3: proteína P3 de la caja Forkhead

G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos

GLUT4: transportador de glucosa 4

HAP: hidroxapatita

HIF-1 α : factor inducible por hipoxia 1 α

h-IgG: inmunoglobulina G de humano

HOMA-IR: modelo homeostático para la evaluación de la resistencia a la insulina

Ig: inmunoglobulina

IGF: factor de crecimiento similar a la insulina

IL: interleucina

INF- γ : interferón γ

ip-GTT: prueba intraperitoneal de tolerancia a la glucosa

ip-ITT: prueba intraperitoneal de tolerancia a la insulina

IRS-1: sustrato del receptor de insulina 1

MCP-1: proteína 1 quimioatrayente de monocitos

M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos

MG-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos-granulocitos

MHC-II: complejo mayor de histocompatibilidad clase II

MIF: factor inhibidor de la migración de macrófagos

MIP-1: proteína inflamatoria de macrófagos

MMP-9: metaloproteinasa 9 de matriz

NF- κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B

OCN: osteocalcina

OPG: osteoprotegerina

PBS: amortiguador de fosfatos salino

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas

PFA: paraformaldehído

RANK: receptor activador para el factor nuclear κ B

RANK-L: ligando del receptor activador para el factor nuclear κ B

RI: resistencia a la insulina

SDF-1: factor 1 derivado de células estromales (CXCL-12)

SMI: índice del modelo de estructura

SOCS: supresor de la señalización de citocinas

SZC: estreptozotocina

TA: tejido adiposo

Tb. Sp.: separación de las trabéculas

Tb. Th.: grosor de las trabéculas

Tb.N.: número de trabéculas

TGF- β : factor de crecimiento transformante β

TNF- α : factor de necrosis tumoral α

TRAP: fosfatasa acida resistente al tartrato

Tregs: linfocitos T reguladores

TV: volumen total

μ CT: microtomografía computarizada

RESUMEN

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) incrementa el riesgo de fracturas óseas; sin embargo, aún no se comprende por completo la fisiopatología de la fragilidad ósea diabética. El desarrollo de un microambiente inflamatorio en el hueso se ha propuesto como un mecanismo importante debido a que induce una reabsorción ósea descontrolada, una formación ósea inadecuada y, en consecuencia, huesos más porosos. Proponemos que el incremento en la activación de los linfocitos en la médula ósea provoca un microambiente proinflamatorio en el hueso y fragilidad ósea en la DMT2. Utilizamos ratones macho C57BL/6 a los que les indujimos DMT2 mediante la combinación de una dieta hipercalórica rica en carbohidratos y bajas dosis de estreptozotocina. En los ratones con DMT2 inhibimos la activación sistémica de los linfocitos a través de la administración de una proteína que fusiona el dominio extracelular del antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos y el dominio Fc de la inmunoglobulina G humana (CTLA4-Ig). Analizamos los efectos de la DMT2 o del CTLA4-Ig en las poblaciones de linfocitos y células presentadoras de antígeno en sangre periférica y médula ósea femoral; su efecto sobre el metabolismo glucolítico, la concentración de citocinas en sangre y hueso, la microarquitectura, las propiedades biomecánicas del fémur, y el número de osteoblastos y osteoclastos en el endostio del fémur. Para comprender los mecanismos relacionados con la activación de los linfocitos realizamos un análisis de correlación múltiple de Pearson entre todas las variables. Los resultados demostraron que el CTLA4-Ig disminuyó la activación de los linfocitos T CD4⁺ en la médula ósea femoral, lo cual a su vez disminuyó la concentración de TNF- α y RANK-L en el hueso, mejoró notablemente la microarquitectura y las propiedades biomecánicas del fémur, aumentó la cantidad de osteoblastos y redujo la actividad osteoclástica en comparación con los ratones con DMT2 que no recibieron el inhibidor. De forma interesante, observamos que el incremento en la concentración de glucosa en sangre y la resistencia a la insulina están relacionados con el aumento de la activación de los linfocitos T CD4⁺ en la médula ósea. Concluimos que el incremento en la activación de los linfocitos T CD4⁺ en la médula ósea provocan una mala calidad ósea y resistencia a la insulina en la DMT2.

ABSTRACT

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) causes an increased risk of bone fractures. However, the pathophysiology of diabetic bone fragility is not completely understood. It has been proposed that an inflammatory microenvironment in bone could be a major mechanism by inducing uncontrolled bone resorption, inadequate bone formation and consequently more porous bones. We propose that activated lymphocytes in the bone marrow cause a pro-inflammatory microenvironment in bone, and cause bone fragility in T2DM. We induced T2DM in C57BL/6 male mice through a hypercaloric diet rich in carbohydrates and low doses of streptozocin. In T2DM mice we inhibited systemic activation of T-cells with a fusion protein between the extracellular domain of Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 and the Fc domain of human immunoglobulin G (CTLA4-Ig). We analyzed the effects of T2DM or CTLA4-Ig in lymphocyte cell subsets and antigen-presenting cells in peripheral blood and femoral bone marrow; and their effect on the metabolic phenotype, blood and bone cytokine concentration, femoral bone microarchitecture and biomechanical properties, and the number of osteoblast-like cells in the femoral endosteum. We performed a Pearson multiple correlation analysis between all variables to understand the global mechanism. Results demonstrated that CTLA4-Ig decreased the number of activated CD4⁺ T-cells in the femoral bone marrow and consequently decreased TNF- α and RANK-L concentration in bone, notably improved femoral bone microarchitecture and biomechanical properties, increased the number of osteoblast-like cells, and reduces osteoclastic activity compared to T2DM mice that did not receive the inhibitor. Interestingly, we observed that blood glucose levels and insulin resistance may be related to the increase in activated CD4⁺ T-cells in the bone marrow. We conclude that bone marrow activated CD4⁺ T-cells cause poor bone quality and insulin resistance in T2DM.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *El tejido óseo*

El hueso es un órgano compuesto de tejido conectivo mineralizado y altamente dinámico que está en un proceso constante de remodelación (1). Cumple múltiples funciones que incluyen la locomoción, el soporte, la protección de los órganos vitales, la hematopoyesis, la respuesta inmune, el metabolismo mineral y el metabolismo energético (2–4).

En los humanos el hueso se divide en hueso cortical o denso y hueso trabecular o esponjoso. Ambos tipos de tejido óseo están constituidos por una parte orgánica (endostio y periostio), conformada por células específicas del hueso como los osteoblastos, osteocitos, osteoclastos y células del revestimiento; y una gran variedad de proteínas de las que destacan por su participación en la formación de la matriz mineral la colágena tipo I (Col1), y proteínas no colágenas como sialoproteína ósea (BSP), osteocalcina (OCN), y proteína morfogenética ósea (BMP) que conforman la matriz extracelular orgánica (1,4,5). Esta matriz orgánica se combina con una matriz inorgánica mineralizada que le confiere rigidez y dureza, compuesta en su mayoría por cristales de hidroxiapatita (HAP: $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$) (4).

Las constantes fuerzas de carga y descarga que soportan los huesos inducen una reparación constante del tejido denominada remodelado óseo, que se basa en la acción de las poblaciones de células de resorción (osteoclastos), y formación (osteoblastos), con el fin de reemplazar la matriz mineral deteriorada por hueso nuevo y de esta manera asegurar la integridad biomecánica del esqueleto y la regulación de la homeostasis del calcio y del fósforo (6). Este proceso está altamente regulado por factores locales y sistémicos, y un desequilibrio conduce a la pérdida ósea acelerada o síndromes de compresión (7).

El proceso de remodelado óseo es regulado principalmente a través de la vía RANK-L/RANK/OPG en donde los osteoblastos y osteocitos promueven la diferenciación de los osteoclastos a través de la expresión del ligando del receptor activador del factor nuclear $\text{NF-}\kappa\beta$ (RANK-L), que al unirse a su receptor en el precursor de los osteoclastos activa su maduración y diferenciación. Por otro lado, estas células también secretan osteoprotegerina (OPG) la cual impide que el RANK-L se una a su receptor bloqueando la diferenciación de los osteoclastos (7). La pérdida en el balance en la producción de OPG y RANK-L contribuye al desarrollo de enfermedades óseas como la osteoporosis (8).

En condiciones de salud, el remodelado óseo tiene una duración de aproximadamente 200 días hasta la formación completa de matriz osteoide, y aproximadamente el 20% del esqueleto es reemplazado cada año (7). El remodelado óseo consta de cinco etapas: activación, reabsorción, invasión o reversión, formación y quiescencia, y ocurre dentro de estructuras anatómicas temporales denominadas unidades multicelulares básicas (BMU), que se encuentran rodeadas por células del revestimiento óseo para crear un

microambiente especializado que permite la función de los osteoblastos (formación ósea) y osteoclastos (resorción ósea) (9).

La primera etapa del remodelado óseo es la activación que comienza con un estímulo que puede ser mecánico, físico u hormonal que estimulan la secreción de interleucina (IL) -6, IL-1 β , RANK-L, el factor de crecimiento insulínico (IGF), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), y el factor estimulante de colonias de monocitos y granulocitos (MG-CSF) por parte de osteoblastos y osteocitos para inducir la retracción de las células del revestimiento y el reclutamiento y activación de los osteoclastos (10).

Una vez que los osteoclastos están activados se adhieren a la matriz mineral ósea formando un área de sellado en donde secretan hidrogeniones (H⁺) e iones de Cl⁻ que facilitan la disolución del mineral y crea las condiciones de pH ideales para la acción de las enzimas lisosomales como catepsina K, la fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP), y metaloproteinasa-9 de matriz (MMP-9) que degradan la matriz orgánica (1). La resorción resulta en la formación de cavidades llamadas lagunas de "Howship" en la superficie ósea y los osteoclastos al finalizar su función sufren apoptosis (9).

Durante la resorción ósea, se liberan factores de crecimiento como el IGF, el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), BMP, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), los cuales se encuentran almacenados en la matriz osteoide o son secretados por los osteoclastos e inducen la maduración de los pre-osteoblastos (1).

Posteriormente ocurre una invasión de células mononucleares de tipo macrofágico que limpian la cavidad de remodelado fagocitando los restos celulares y minerales y formando la línea de cementación sobre la que se depositará el hueso nuevo (9).

Una vez que los osteoblastos se han diferenciado por la acción de los factores de crecimiento, comienzan a sintetizar una matriz orgánica constituida principalmente por Col1, proteoglicanos (decorina), OCN y BSP, las cuales son altamente afines al calcio y se encargan de nuclear las moléculas de fosfato de calcio para formar y fijar la HAP a la matriz orgánica. Conforme los osteoblastos realizan estas funciones, inhiben la actividad osteoclástica por medio de la liberación de OPG (7,9).

Cuando la síntesis de la matriz osteoide finaliza, alrededor de la mitad de los osteoblastos se transforman en células del revestimiento o bien, pueden quedar enterrados en el hueso transformándose en osteocitos que controlan la formación de hueso y el metabolismo del fosfato (7).

1.2. *Diabetes mellitus tipo 2*

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), es una enfermedad metabólica multifactorial caracterizada por hiperglucemia, intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina (RI) y

por la disminución en la secreción de insulina (11). La DMT2 tiene una prevalencia y tasa de mortalidad alta debido a que hasta el año 2021, había alrededor de 537 millones de personas diagnosticadas con DMT2 y se reportaron 6.7 millones de muertes en el mismo año (12)

El consumo de dietas hipercalóricas, el envejecimiento y la inactividad física provocan el aumento de mediadores inflamatorios y la activación del sistema inmune innato y adaptativo que contribuyen al daño progresivo de las células β pancreáticas, el desarrollo de RI, y la secreción deteriorada de insulina, lo que deriva en hiperglucemia crónica (11).

La hiperglucemia se desarrolla por la RI en hígado, músculo esquelético y tejido adiposo (TA) (13). La RI provoca un aumento en la demanda de insulina que deriva en la disfunción y apoptosis de las células β del páncreas y finalmente en la hiperglucemia crónica. Además, se desarrollan alteraciones en el metabolismo de proteínas, lípidos y carbohidratos, y el incremento de la gluconeogénesis hepática lo que favorece el incremento en los niveles de glucosa (13).

La hiperglucemia crónica provoca estrés oxidativo, acumulación de productos finales de glicación avanzada (AGE's), dislipidemia, inflamación crónica de bajo grado y disfunción inmunológica a nivel sistémico (11,14), lo que conduce al desarrollo de complicaciones macro y microvasculares como la cardiomiopatía, la neuropatía periférica, la nefropatía, el hígado graso no alcohólico, afecciones de la cavidad oral y osteopatías que disminuyen la calidad de vida e incrementan la tasa de mortalidad (15–19).

1.3. *Alteraciones inmunológicas en la DMT2*

La activación del sistema inmune y la desregulación en la red de citocinas se han propuesto como un vínculo entre la obesidad y el desarrollo de DMT2, debido a que provocan la disminución de la sensibilidad a la insulina, exacerbando los mecanismos glucotóxicos y lipotóxicos asociados a la RI, y favorecen la apoptosis de las células β del páncreas (20).

El estado inflamatorio crónico en la DMT2 se asocia principalmente a la hipertrofia del TA, que provoca hipoxia y necrosis en los adipocitos, la producción de la proteína quimioatrayente de macrófagos 1 (MCP-1) y la consecuente migración de monocitos (20); además, la hipoxia induce la activación del factor inducible por hipoxia α (HIF- α), que

estimula la polarización de macrófagos hacia un perfil proinflamatorio, activa al factor nuclear kappa B (NF- κ B), e incrementa la producción de citocinas como el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), la IL-1, IL-6 y el TNF- α en adipocitos y macrófagos residentes del TA (21).

El TA en la obesidad produce el factor derivado de células estromales 1 (SDF-1) y MCP-1, que induce la migración de linfocitos Th1 productores de interferón gamma (IFN- γ), lo que propicia el incremento de macrófagos en el TA en ratones y humanos (22).

En explantes de TA visceral se ha observado la presencia de linfocitos Th17 productores de IL-1 β , IL-6 e IL-17 (23), y una disminución de linfocitos T reguladores (Tregs) (20), y en pacientes con DMT2 se ha observado un incremento de las poblaciones de linfocitos Th1 y Th17 efectoras con una disminución de Tregs en circulación (24).

1.3.1. El sistema inmune y la resistencia a la insulina

El incremento de TNF- α , la IL-1 β y la IL-6 en la DMT2, inhiben la autofosforilación del receptor de insulina; inducen la fosforilación en residuos de serina del sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1), y disminuyen la activación de AKT, provocando que no se active la cascada de señalización de la insulina, una disminución de la translocación de GLUT-4 y la síntesis proteica e incrementando la apoptosis en músculo esquelético, hígado y TA (25). Los efectos de dichas citocinas sobre la señalización de insulina están mediados por la activación de NF- κ B, JNK y del supresor de la señalización de citocinas (SOCS) 1/3, que incrementa la fosforilación en serina e induce la ubiquitinación y posterior degradación del IRS-1, además de promover la s-nitrosilación de Akt por la liberación de óxido nítrico (26).

Además, el incremento de TNF- α , IL-1 β e IL-6, y el exceso de nutrientes en la dieta favorecen una mayor producción de adipocinas inflamatorias (26), como la lipocalina 2 y la resistina que inducen RI, incrementan la producción de TNF- α e IL-6, y disminuyen la síntesis de adipocinas antiinflamatorias como la adiponectina, leptina, apelina, y el factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21). Provocando la desregulación del apetito, la sensibilidad a la insulina y la entrada de glucosa a las células, que conduce a la hiperglicemia crónica (25).

1.3.2. El sistema inmune y la deficiencia de insulina

El sistema inmune puede regular la función endocrina de los islotes pancreáticos. En páncreas de ratón, las células mesenquimales producen IL-33, que a su vez estimula la secreción de IL-13 por parte de los linfocitos innatos, induciendo la síntesis de ácido retinoico en macrófagos y células dendríticas, lo que a su vez incrementa la producción de insulina (27). Cabe destacar que los macrófagos residentes del páncreas endocrino expresan marcadores de macrófagos proinflamatorios M1 y una producción continua de IL-1 β y TNF- α , que en estados de homeostasis parecen regular la producción de insulina (28).

Sin embargo, en el curso de la DMT2 hay un incremento patológico en el número de macrófagos M1 en los islotes pancreáticos, lo que conduce a inflamación del tejido, disminución en la secreción de insulina y apoptosis de las células β (29,30). Este infiltrado de macrófagos se debe a que en el páncreas hay un incremento en la concentración de IL-6, IL-8, quimiocina KC, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), la proteína inflamatoria de macrófagos 1 (MIP-1), TNF- α y MCP-1 (29).

De hecho, en ratones con DMT2 que generaron anticuerpos contra IL-1 β por inmunización, se observó una reducción en la apoptosis, mayor proliferación de las células β y secreción de insulina, y se demostró que los macrófagos M1 infiltrados en el páncreas incrementan su secreción de IL-1 β y activan el inflammasoma NLRP3 (31).

1.4. Osteopatía diabética

La fragilidad ósea es la alteración más frecuente en la DMT2. Los pacientes con DMT2 tienen un incremento en la densidad mineral comparado con las personas sin diabetes, pero con huesos más frágiles y mayor incidencia de fracturas (32).

Las alteraciones en el hueso asociadas a la DMT2 se deben principalmente a la hiperglucemia (33). Las concentraciones elevadas de glucosa promueven la glicación de la Col1, lo cual inhibe la diferenciación osteoblástica y modifica la microarquitectura y las propiedades biomecánicas del hueso. Además, la hiperglucemia incrementa la resorción ósea al aumentar la producción de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6, RANK-L y TNF- α (32).

La hiperglucemia provoca un incremento en la concentración de especies reactivas de oxígeno que inhiben la actividad osteoblástica, lo que se refleja en la reducción de los

depósitos de minerales y la formación ósea (34). También activan la fosfolipasa C que promueve la liberación de calcio a la matriz extracelular, lo que se ha relacionado con una disminución de la calidad de los cristales de HAP (35).

Además, el aumento en el número y disfunción de los adipocitos de la médula ósea en la DMT2 se asocia directamente con una menor densidad mineral, fragilidad de los huesos y osteoporosis (36). En concordancia, una disminución en la cantidad de adipocitos después del baipás gástrico aumenta la densidad mineral ósea en pacientes obesos con y sin DMT2 (37). Estudios en modelos experimentales de DMT2 han demostrado una asociación entre el alto contenido de adipocitos y una mayor porosidad del hueso trabecular (38), indicando que el aumento de tejido adiposo no solo disminuye la densidad ósea sino que altera su microarquitectura. El aumento de la fragilidad de los huesos asociada a la adiposidad de la médula ósea se debe a una menor diferenciación de las células mesenquimales hacia osteoblastos y una mayor diferenciación hacia adipocitos (38). Los adipocitos producen RANK-L (39) y el FGF21 (40), que son inductores de la resorción ósea y están asociados con una mala formación y una baja calidad ósea.

Otro factor que induce una disminución en la formación de cristales de HAP, en la relación calcio/fosfato y en el IGF-1 es la deficiencia de insulina, lo que podría contribuir al daño óseo (41).

El microambiente oxidativo, la lipotoxicidad y la glucotoxicidad afectan disminuyen la formación ósea al aumentar la translocación del factor de transcripción NF- κ B al núcleo, promoviendo la secreción de citocinas proinflamatorias como IL-17, TNF- α e IL-6 en la células osteoides y de la médula ósea (36,42), lo que a su vez favorece la diferenciación adipogénica, la resorción, la disfunción de los osteoblastos y la mala calidad de los cristales de hidroxiapatita (43,44).

2. ANTECEDENTES

La DMT2 causa complicaciones óseas como osteopenia y osteoporosis (45). Las personas con T2DM tienen un incremento en el riesgo de fracturas, principalmente en cadera, muñeca, pies y columna vertebral, esto a pesar de tener una densidad mineral ósea igual o mayor que las personas sanas (46). Por lo tanto, la mala calidad del hueso puede ser responsable de la fragilidad ósea en la diabetes.

Aunque la fisiopatología de la osteopatía diabética no se comprende completamente, el desarrollo de un microambiente proinflamatorio en el hueso podría ser uno de los mecanismos principales. Se ha observado un incremento en la concentración de IL-10 y de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-3, IL-6 y TNF- α en médula ósea de ratones con diabetes tipo 1 (47), y en biopsias de médula ósea de pacientes con DMT2 (48). El incremento de estas citocinas reduce la diferenciación de los osteoblastos y la formación de matriz mineral, estimula la resorción ósea desordenada (47), y disminuye la calidad de los cristales de hidroxiapatita (49), conduciendo a huesos más porosos y frágiles.

El microambiente proinflamatorio en el hueso diabético puede inducir la migración de linfocitos activados a la médula ósea. Las personas con DMT2 desarrollan inflamación crónica de bajo grado (50,51), con un incremento en las poblaciones de linfocitos Th1 y Th17 activados y una disminución de linfocitos Tregs en sangre periférica, lo que conduce a una pobre resolución de la inflamación sistémica (24). Esta condición es interesante debido a que los linfocitos activados pueden migrar a la médula ósea a través de gradiente quimiotáctico mediado por SDF-1, el cual se sobre expresa en el estroma de la médula ósea en la DMT2 (48,52).

Además, en modelos experimentales de obesidad e hiperglucemia crónica, se ha observado una pérdida de la inmunosupresión en el estroma de la médula ósea (48,53), junto con una mayor secreción de RANK-L y TNF- α estimulada por los linfocitos (54). Por lo tanto, es posible que los linfocitos activados que migran a la médula ósea mantengan su capacidad efectora, perjudicando la homeostasis del remodelado óseo.

De hecho, en modelos experimentales de osteoporosis no diabética los linfocitos T y B activados en médula ósea secretan TNF- α y RANK-L, provocando un incremento en la resorción y fragilidad ósea (55–57). Además, en ratones con osteoporosis la inhibición de la activación de los linfocitos T con la proteína CTLA4-Ig (Abatacept), la cual fusiona el

dominio extracelular del antígeno citotóxico 4 de linfocitos T (CTLA-4), con el dominio Fc de una inmunoglobulina G de humano (h-IgG), disminuye la producción de TNF- α por parte de los linfocitos T de médula ósea, disminuye la resorción ósea e incrementa la densidad mineral en ratones con osteoporosis (57). Sin embargo, hasta donde sabemos, no se ha estudiado la participación de los linfocitos activados en el desarrollo de la enfermedad ósea en la DMT2.

Estos hallazgos sugieren que los linfocitos inflamatorios activados en la DMT2 pueden migrar a la médula ósea y secretar citocinas proinflamatorias que causan una mala calidad ósea. En este trabajo nos centramos en determinar si la inhibición de la activación de células T en la médula ósea mejora la calidad ósea en ratones con DMT2.

3. HIPÓTESIS

La porosidad y fragilidad ósea en la DMT2 son provocadas por el microambiente proinflamatorio en el tejido óseo en el que participan la activación de linfocitos T y B de médula ósea

4. OBJETIVOS

General:

Determinar la participación de los linfocitos T y B activados de médula ósea en el microambiente de la médula ósea, el desbalance del remodelado óseo, las alteraciones microestructurales y la fragilidad ósea en ratones con DMT2.

Particulares:

Analizar si la inhibición de la activación de linfocitos T en ratones con DMT2, mejora la salud ósea a través de determinar:

- 1 El perfil glucémico y las características somatométricas.
- 2 El establecimiento de inflamación sistémica.
- 3 La activación de los linfocitos T y B en médula ósea y sangre periférica.
- 4 Las concentraciones de RANK-L, TNF- α e IL-17 en el tejido óseo.
- 5 La densidad mineral y la microarquitectura ósea.
- 6 La resistencia ósea a la fractura.
- 7 Las poblaciones de osteoblastos (ALP⁺) y osteoclastos (TRAP⁺).

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

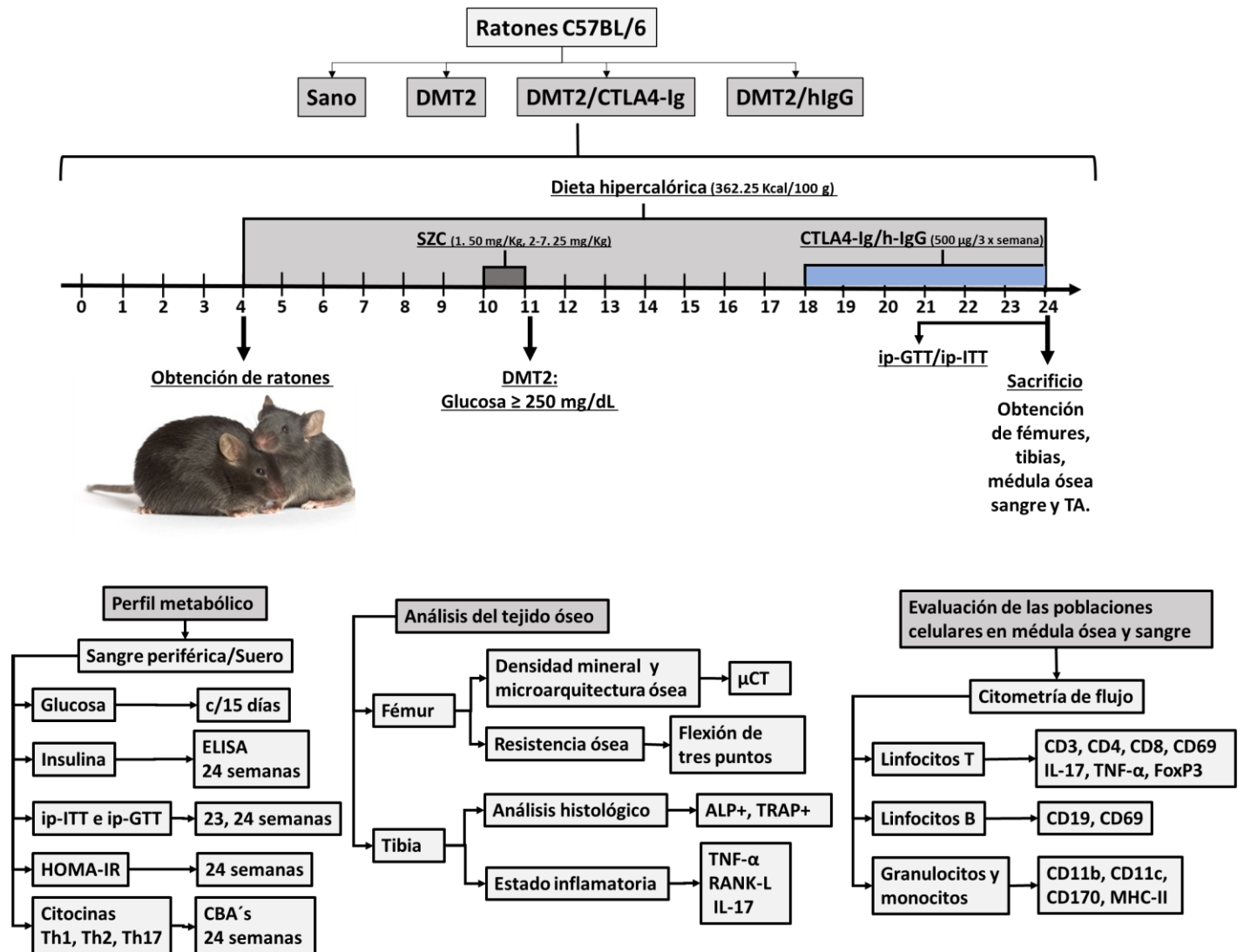


Figura 1. Estrategia experimental. En el panel superior se esquematiza la estrategia experimental utilizada para la inducción de DMT2 y la inhibición de la activación de los linfocitos; la línea de tiempo representa semanas de edad de los ratones. En el panel inferior se esquematiza un resumen de las determinaciones que realizamos para evaluar el establecimiento de DMT2 y el efecto del inhibidor de la activación de los linfocitos sobre el metabolismo glucolítico, la calidad ósea y las poblaciones de células inmunes en sangre periférica y médula ósea **SZC**: estrptozotocina; **TA**: tejido adiposo; **ip-ITT**: prueba intraperitoneal de tolerancia a la insulina; **ip-GTT**: prueba intraperitoneal de tolerancia a la glucosa; **HOMA-IR**: índice de resistencia a la insulina; **μ CT**: microtomografía computarizada; **ALP**: fosfatasa alcalina; **TRAP**: fosfatasa acida resistente al tartrato.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. *Animales*

Utilizamos ratones C57BL/6 macho de 4 semanas de edad adquiridos del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional (IPN, México). Los ratones se mantuvieron en un ciclo luz/oscuridad de 12 horas con acceso libre a agua y alimento. Todos los experimentos en los ratones se realizaron bajo las recomendaciones de la norma estándar mexicana NOM-062-ZOO-1999 y de acuerdo con los estándares del comité de ética de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM CE/FESI/092021/1415. Los ratones de la misma camada se dividieron al azar en cuatro grupos experimentales: control, DMT2, DMT2/CTLA4-Ig, y DMT2/h-IgG. Para garantizar suficiente poder estadístico en cada experimento, hubo al menos 6 animales en cada grupo (los números exactos para cada experimento se indican en las leyendas de las figuras). A las 24 semanas de edad, sacrificamos a los ratones por sobredosis de anestesia y obtuvimos sangre periférica por punción cardiaca, suero sanguíneo por centrifugación, ambos fémures, ambas tibias y el tejido adiposo visceral.

6.2. *Inducción de diabetes tipo 2*

La DMT2 se indujo a través de una dieta hipercalórica rica en carbohidratos diseñada y elaborada en el laboratorio (3.63 kcal/g, 65% carbohidratos, 17% lípidos, 18 proteínas; Tabla 1), que fue mantenida durante todo el experimento. A las 10 semanas de edad se indujo una deficiencia parcial en la secreción de insulina por la administración de dosis bajas de estreptozotocina (SZC, Sigma-Aldrich #S0130), por 7 días consecutivos (50 mg/kg de peso en el día 1 y 25 mg/kg peso del día 2 al 7) (58). Consideramos diabéticos a los ratones cuando alcanzaron una concentración de glucosa sanguínea por encima de 250 mg/dL (58). Diariamente medimos el peso corporal y el consumo de alimento y semanalmente medimos la talla y la circunferencia abdominal.

Cuantificamos la concentración de glucosa en sangre con un glucómetro Accu-Check (OneTouch Select Plus), cada 15 días después de un ayuno matutino de 6 horas (8:00 am–2:00 pm) (59). Evaluamos la resistencia a la insulina a través de pruebas de tolerancia a la insulina y a la glucosa a las 23-24 semanas de edad con 5 días de separación entre cada una. Para ambas pruebas los ratones se sometieron a un ayuno matutino de 6 horas (8:00 am–2:00 pm). La prueba de tolerancia a la glucosa (ip-GTT) se realizó mediante la

administración de una inyección intraperitoneal de D-glucosa (1 g/kg de peso; Macron fine chemicals, #491212) y cuantificamos los niveles de glucosa en sangre cada 15 minutos durante 90 minutos. Para la prueba de tolerancia a la insulina (ip-ITT), administramos una inyección intraperitoneal de insulina aspártica (Novo Nordisk México, S.A. de C.V.) (0.5 U/kg de peso) y medimos la concentración de glucosa cada 15 minutos durante 90 minutos.

La concentración sérica de insulina se determinó con el kit comercial "Mouse insulín ELISA kit" (ThermoScientific, #EMINS), y calculamos el modelo homeostático para la evaluación de la resistencia a la insulina (HOMA-IR) como el nivel de glucosa en sangre multiplicado por el nivel de insulina sérica dividido por 22.5 (60).

Tabla 1. Contenido dietético.

	Dieta hipercalórica (100 g)	Dieta estándar (100 g)
Kcal	363	100
Contenido de proteínas (g)	17.47	18.6
Contenido de lípidos (g)	28.3	6.2
Contenido de carbohidratos (g)	55.5	44.2

6.3. *Inhibición de la activación de linfocitos*

Inhibimos la activación de los linfocitos con la proteína de fusión CTLA4-Ig (Abatacept, Ohrencia, Bristol Myers) en el grupo DMT2/CTLA4-Ig. El CTLA4-Ig se une a las moléculas co-estimuladoras en las células presentadoras de antígeno causando la anergia de los linfocitos. Utilizamos IgG de humano (h-IgG; Sigma, #I4506) como control isotipo en el grupo DMT2/h-IgG debido a que el CTLA4-Ig contiene la fracción Fc de una inmunoglobulina G de humano. El CTLA4-Ig y la h-IgG fueron resuspendidos en amortiguador de fosfatos salino (PBS) 1X y ambos tratamientos se administraron por vía intraperitoneal a una dosis de 500 µg/50 µL por ratón a partir de las 18 semanas de edad, tres veces por semana hasta el sacrificio (57).

6.4. *Determinación del perfil de citocinas en suero*

Cuantificamos las concentraciones séricas de IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17A e IL-10 a las 24 semanas de edad con el kit comercial "BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit" (BD Biosciences, n.º 560485), según las instrucciones del fabricante en un citómetro de flujo FACS Aria III (BD)

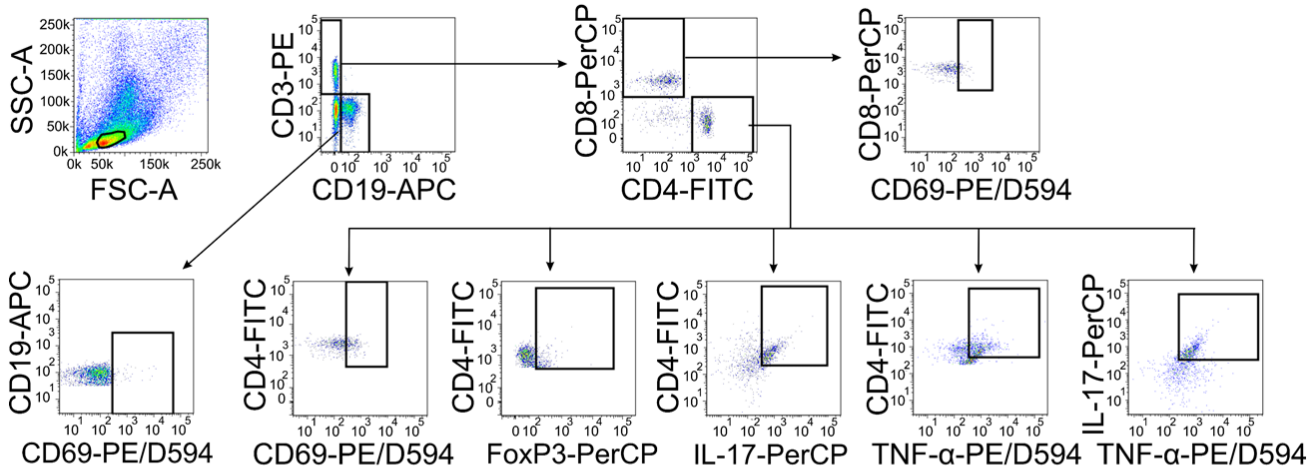
6.5. *Evaluación de las poblaciones de linfocitos y células presentadoras de antígeno*

Para el análisis de las poblaciones de linfocitos se obtuvieron leucocitos de sangre periférica y explantes de médula ósea del fémur izquierdo (61). Los leucocitos obtenidos de la médula ósea y sangre periférica se tiñeron con anticuerpos acoplados a fluorocromos para identificar las subpoblaciones de linfocitos T. (CD3-PE (Ebioscience, #12-0031-83); CD4-FITC (Biolegend, #100406); and CD8-PerCP (Biolegend, #140418), linfocitos B (CD19-APC; Biolegend, #115512), y utilizamos CD69-PE/Dazzle 594 (Biolegend, #104536) como marcador de activación de linfocitos. Para las células presentadoras de antígeno utilizamos los anticuerpos CD11b-APCCy7 (Biolegend, #101226) y MHCII-PerCP (Biolegend, #107612), y para eosinófilos utilizamos el anticuerpo CD170-PE.

Para evaluar la producción de TNF- α e IL-17, y la expresión de FoxP3 en los linfocitos T CD4, cultivamos a las células en DMEM-HG (Sigma-Aldrich, #D1152) suplementado con 10% de suero fetal de bovino a 37 °C en una atmósfera con 5% CO₂ por 4 h. Inhibimos el tránsito vesicular con brefeldina (3 μ g/mL; Sigma-Aldrich, #B7651) e indujimos la activación de los linfocitos con PMA (50 ng/mL; Sigma-Aldrich, #P1585) e ionomicina (500 ng/mL; Sigma-Aldrich, #I0634). Realizamos la tinción de superficie con los anticuerpos CD3-FITC y CD4-PE. Posteriormente permeabilizamos las membranas celulares con amortiguador de permeabilización (0.1% saponina, 0.1% azida de sodio y 1% de suero fetal bovino en PBS 1X, pH 7.2), seguido de una tinción intracelular con los siguientes anticuerpos: FoxP3-PerCP (BD-biosciences, #563902), IL17-PerCP (Biolegend, #506944), and TNF- α -PE/Dazzle 594 (Biolegend, #506346).

Todas las células fueron fijadas con 1% de paraformaldehído (PFA), en PBS 1X, y capturamos 50,000 eventos en un citómetro de flujo FACS Aria III (BD), con el software FACSDiva. El análisis de datos los realizamos utilizando el software FlowJo software v.10.6.2. La estrategia de selección de poblaciones se resume en la figura 2.

a) Estrategia de selección de poblaciones de linfocitos



b) Estrategia de selección de poblaciones de células presentadoras de antígeno

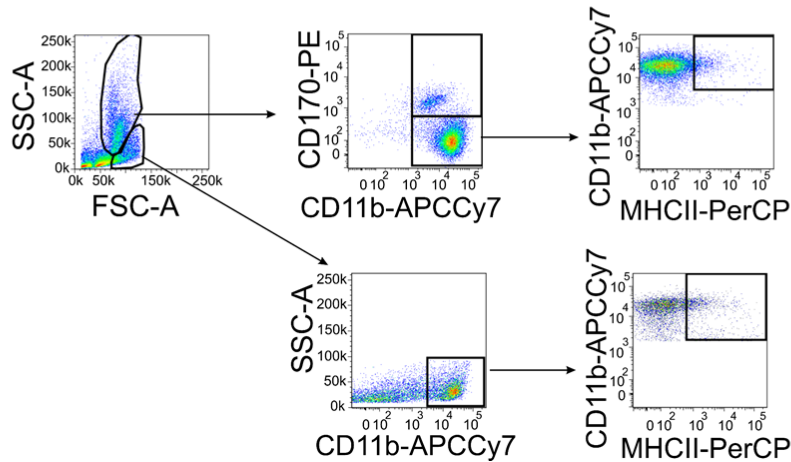


Figura 2. Estrategia de selección para las poblaciones celulares de leucocitos de sangre periférica y médula ósea por citometría de flujo. (a) Selección de linfocitos. Los leucocitos totales se seleccionaron primero en un gráfico de dispersión frontal (FS)/dispersión lateral (SS) y luego se seleccionaron para células CD3⁺ (PE: ficoeritrina) y CD19⁺ (APC: alofocianina). Después se seleccionaron las células dobles positivas CD19⁺/CD69⁺ (PE/D594: ficoeritrina/dazzle 594). Posteriormente la población de células CD3⁺ se seleccionó para CD8⁺ (PerCP: peridina-clorofila), y CD4⁺ (FITC: fluoresceína isocianato). Se seleccionó la población celular doble positiva CD8⁺/CD69⁺. La población celular CD4⁺ fue seleccionada para las subpoblaciones de interés como células dobles positivas CD4/CD69, células FoxP3⁺ (PerCP), células IL-17⁺ (PerCP), o células TNF- α ⁺. (b) Selección de células presentadoras de antígeno y eosinófilos. Los leucocitos totales se seleccionaron primero en un gráfico de dispersión frontal (FS)/dispersión lateral (SS) y luego se seleccionaron para las poblaciones de granulocitos y monocitos. La subpoblación de granulocitos fue seleccionada para células CD11b⁺ (APCCy7: alofocianina cianina 7) y células dobles positivas CD11b/CD170 (eosinófilos). Las células CD11b⁺ fueron después seleccionadas para células MHCII⁺ (PerCP) (granulocitos presentadores de antígeno). La población de monocitos fue después seleccionada como la dispersión lateral (SS)/ células CD11b⁺, y después seleccionamos las células MHCII⁺ (monocitos presentadores de antígeno).

6.6. *Cuantificación de TNF- α , RANK-L, IL-17 y proteínas carboniladas en el tejido óseo*

Pulverizamos completamente la tibia izquierda (médula ósea y hueso) sin la fracción articular en nitrógeno líquido y extrajimos las proteínas con 6 M de cloruro de guanidina en amortiguador de Tris 100 mM (62). Posteriormente las proteínas extraídas se precipitaron con acetona, se rehidrataron con amortiguador RIPA y se congelaron a -80 °C hasta su utilización. Cuantificamos la concentración de proteínas con el método BCA de Pierce (Thermo Scientific, #23225), y determinamos la concentración de TNF- α con el kit comercial "Murine TNF- α Standard TMB ELISA Development Kit" (Peprotech, #900-T54), la concentración de RANK-L con el kit comercial "Murine sRANK ligand Mini ABTS ELISA Development Kit" (Peprotech, #900-M233), la concentración de IL-17A con el kit comercial "Murine IL-17A Standard ABTS ELISA Development Kit" (Peprotech, #900-K392), y la concentración de las proteínas carboniladas con el kit comercial "Protein carbonyl content assay kit" (Sigma-Aldrich, #MAK094).

6.7. *Análisis de la microarquitectura ósea*

Una vez obtenido el fémur derecho, lo congelamos en PBS a -20°C hasta su utilización (63–65). Para determinar la microarquitectura ósea, realizamos un análisis de microtomografía computarizada (μ CT) de acuerdo a lo descrito por Fallon et al. (65). Las imágenes de microtomografía de rayos X fueron obtenidas en un microtomógrafo de sobremesa construido en el Instituto de Física, UNAM a una resolución de 34 μ m/píxel. El sistema se basa en un tubo de rayos X de ánodo de tungsteno Apogee XTG5011 de Oxford Instruments que tiene un tamaño de punto focal nominal de 35 μ m, acoplado a un detector de panel plano Rad-icon Shad-o-Box 2048 (Teledyne DALSA Inc.). Las imágenes de proyección se adquirieron a 50 kVp, 1 mA con un tiempo de integración de 500 ms por cuadro, órbita de 360 grados en pasos de 1 grado. Las imágenes se corrigieron por falta de uniformidad de campo plano, píxeles muertos y ruido oscuro. La reconstrucción tomográfica se realizó utilizando el algoritmo Feldkamp-Davis-Kress y un filtro Hamming con una frecuencia de corte de 0,7 utilizando un programa desarrollado internamente escrito en MATLAB Versión 2020a (The MathWorks, Inc.). Todo el procesamiento posterior y la visualización en 3D se realizaron utilizando los programas de código abierto ImageJ y OsiriX. Se tomaron imágenes transaxiales del total del fémur (\pm 450 cortes). Las imágenes fueron analizadas con el programa de código abierto BoneJ de ImageJ de acuerdo a lo

descrito previamente (66). El procedimiento de segmentación fue consistente entre todos los escaneos por tipo de hueso (umbrales globales y un filtro Gaussiano para suprimir el ruido de la imagen, $\sigma=0.3$). Para el análisis, dividimos las fracciones anatómicas del fémur en epífisis distal (70 cortes), metáfisis distal (35 cortes), y diáfisis (210 cortes), usando un administrador de ROI (Fig. 3). En la epífisis y metáfisis distal se analizó el volumen de la fracción ósea (BV/TV), la separación trabecular (Tb. Sp), el grosor trabecular (Tb. Th), el número de trabéculas (Tb. N), la densidad de conectividad ($1/\text{mm}^3$), y el índice del modelo de estructura (SMI). En la epífisis se analizó el área del hueso cortical (B. área), el área de la médula ósea (BM. área), el área total y el grosor cortical (Ct. Th).

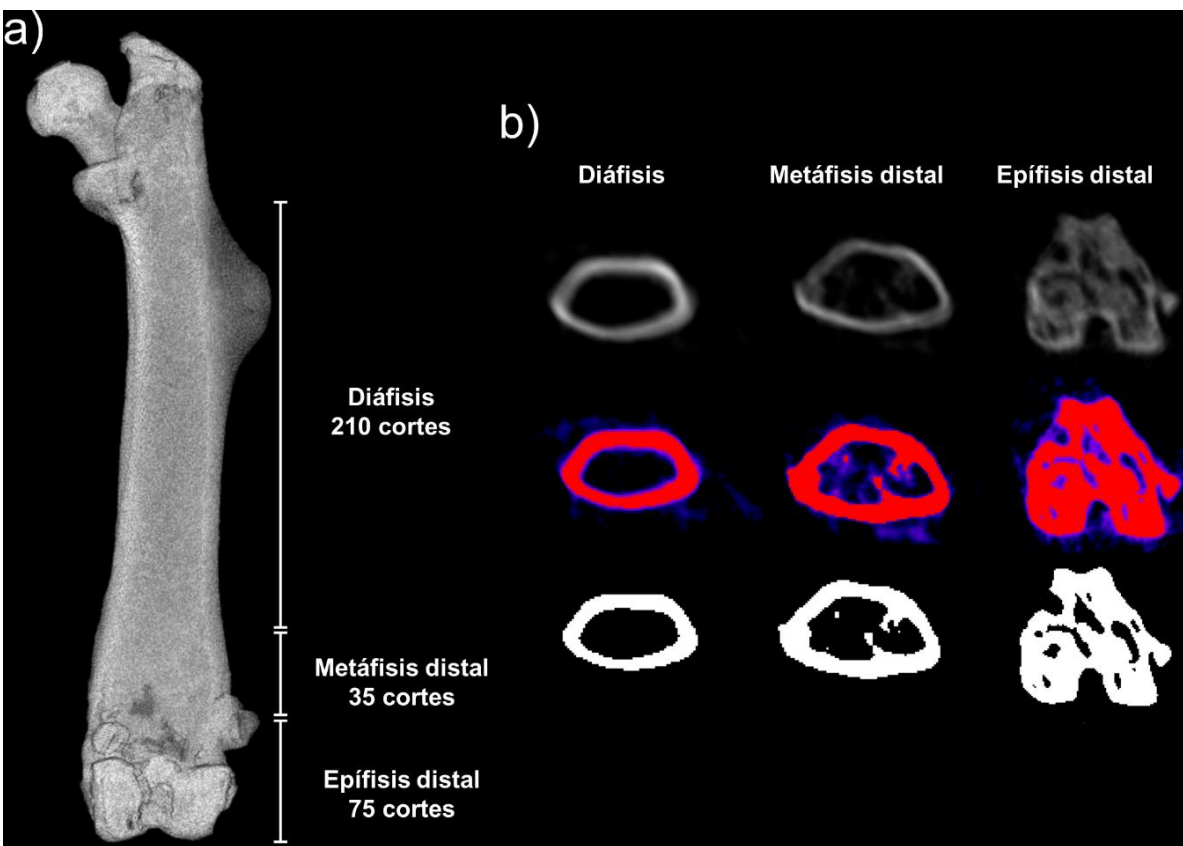


Figura 3. Selección de las regiones anatómicas y aplicación de ROI para el análisis por μCT . (a) Selección de las regiones anatómicas en el fémur (epífisis distal, metáfisis distal y diáfisis) para el análisis de la microarquitectura ósea por μCT . (b) Aplicación del filtro para la eliminación del ruido de fondo global y la binarización de las secciones que conforman cada región anatómica del hueso.

6.8. *Análisis de las propiedades biomecánicas óseas*

Después del análisis por μ CT, se utilizó un dispositivo de flexión de tres puntos. Este sistema es una versión de bajo costo, suministrado y fabricado por el Departamento de Bioelectrónica del Centro de Investigación y Estudios Avanzados CINVESTAV, IPN, México. Este dispositivo contiene sensores Arduino para medir y registrar la fuerza de carga y un sistema de torque para controlar la velocidad y la presión con una red inalámbrica. La punta aplicó una fuerza hacia abajo en el medio de diáfisis del fémur y la manivela presionó lentamente a una velocidad de 1.74 mm/minuto hasta que alcanzó el punto de fractura. Una interfaz gráfica de MATLAB 2020a MathWorks® contiene y genera las variables de la biomecánica de los huesos como la carga (Newtons, N), el desplazamiento total (mm), la fuerza/desplazamiento (N/mm), la energía post-rendimiento al fallo (mJ), el punto de fractura (N), la fuerza máxima (N), el límite de elasticidad (N, utilizando un desplazamiento de 0,015 mm paralelo a la curva de rigidez), el módulo elástico (MPa) definido como la fuerza causante de una deformación irreversible, el esfuerzo de fluencia (MPa) definido como el esfuerzo máximo antes de la deformación irreversible, y el estrés final (MPa), de acuerdo con reportes previos (67). Calculamos el momento de inercia mínimo (I_{min}), y la distancia perpendicular desde el centro del fémur al periostio (c) en los cortes de la diáfisis media (20 cortes) obtenidos de μ CT con el programa de código abierto BoneJ de ImageJ.

6.9. *Análisis histológico*

La tibia derecha se fijó con PFA al 4% y se descalcificó con una solución de EDTA al 10% durante 3 semanas a 37°C, y luego se deshidrató, se aclaró en xilol y se incluyó en parafina (68). Obtuvimos cortes histológicos longitudinales (5 μ m) en un microtomo. Para analizar las poblaciones de osteoblastos, se identificaron células ALP⁺ en el endostio por histoquímica de acuerdo con el método reportado por Miao y Scutt (69). Para analizar las poblaciones de osteoclastos, identificamos las células positivas para la fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP) mediante inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo primario anti-TRAP (1:100) (Santa Cruz biotechnology #sc28204), y un anticuerpo secundario anti-conejo IgG (H+L) conjugado con peroxidasa (1:500) (Invitrogen #31460). La inmunoreactividad fue evidenciada con el sustrato diaminobencidina (DAB, Roche #11718096001). En ambos casos, se tomaron dos micrografías de la epífisis y metáfisis de la tibia por corte histológico por triplicado para cada ratón, con un aumento de 40X en un microscopio invertido (Zeiss AX100, Germany), y todas las células positivas se cuantificaron

en el endostio dentro de todo el campo visible con el programa de código abierto ImageJ.

Análisis estadístico

La distribución de los datos se determinó con las pruebas de normalidad de Dágostino-Pearson, Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov de acuerdo con tamaño de la muestra. Las diferencias significativas entre los grupos experimentales se determinaron mediante un análisis de varianza (ANOVA), seguido de una post-hoc de Tukey, utilizando el programa GraphPad Prism 9. Las diferencias estadísticas se consideraron significativas con una $p \leq 0.05$. Para analizar la asociación entre la activación de los linfocitos de sangre periférica y médula ósea con los parámetros metabólicos, inmunológicos y de la calidad ósea, normalizamos los datos con la media de cada variable, de tal manera que a la media de todos los datos de cada variable se le asignó un valor de 1, los valores menores a la media tuvieron un valor <1 y los valores por encima de la media un valor >1 . Con los valores normalizados de cada parámetro, construimos un mapa de calor y calculamos los coeficientes de correlación mediante el análisis de correlación múltiple de Pearson en el programa GraphPad Prism 9. Se consideró significancia estadística con una $p \leq 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1. Los linfocitos T activados participan en el desarrollo de DMT2

Para monitorear el desarrollo de DMT2, analizamos parámetros somatométricos, las concentraciones de glucosa en sangre, la insulina sérica y la resistencia a la insulina. Los ratones en los grupos DMT2, DMT2/CTLA4-Ig y DMT2/h-IgG desarrollaron obesidad central al mostrar un incremento dependiente del tiempo en el peso corporal, la circunferencia abdominal y un mayor porcentaje de tejido adiposo visceral en comparación con ratones sanos (Fig. 4).

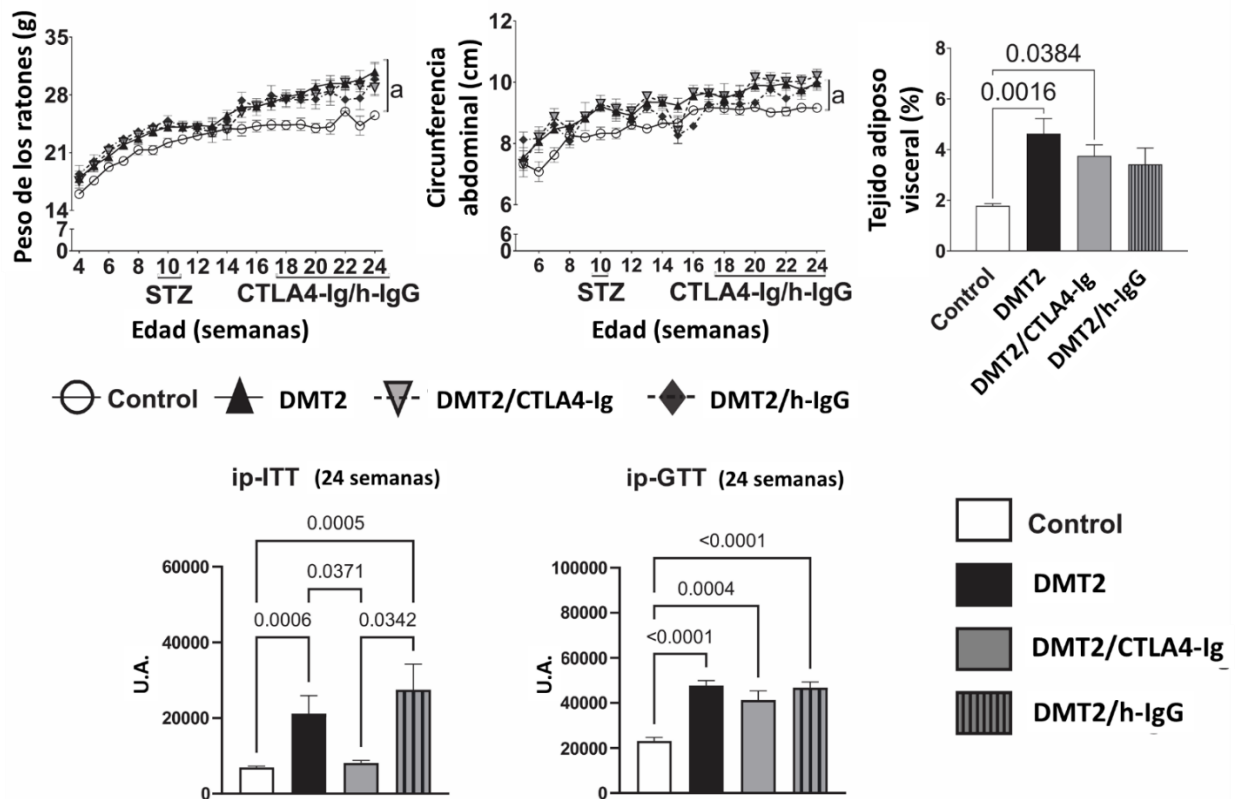


Figura 4. Los ratones con DMT2 desarrollaron obesidad central y resistencia a la insulina. Resultados del peso corporal, circunferencia abdominal, porcentaje de grasa visceral y área bajo la curva de las pruebas de tolerancia a la insulina y glucosa a las 24 semanas de edad en los diferentes grupos experimentales. Los gráficos representan la media \pm EEM. ^a p<0.05 vs. control. Las llaves indican el valor de p. n=10. **U.A:** unidades arbitrarias.

Los grupos DMT2 y DMT2/h-IgG desarrollaron hiperglucemia (≥ 350 mg/dL) (Fig. 5 a), intolerancia a la glucosa (Fig. 5 b y Fig. 4), menor sensibilidad a la insulina (Fig. 5 c y Fig. 4), menor concentración de insulina en suero (Fig. 5d) y un incremento en el índice HOMA-IR (Fig. 5 e), en comparación con los ratones sanos a las 24 semanas de edad, lo que indica el establecimiento de DMT2. Contrario a esto, la administración de CTLA4-Ig disminuyó los niveles de glucosa en sangre (≤ 200 mg/dL) (Fig. 5 a), mejoró la sensibilidad a la insulina (Fig. 5 c y Fig. 4) y redujo el índice HOMA-IR (Fig. 5 e) en los ratones diabéticos. Sin embargo, no previno la intolerancia a la glucosa (Fig 5b).

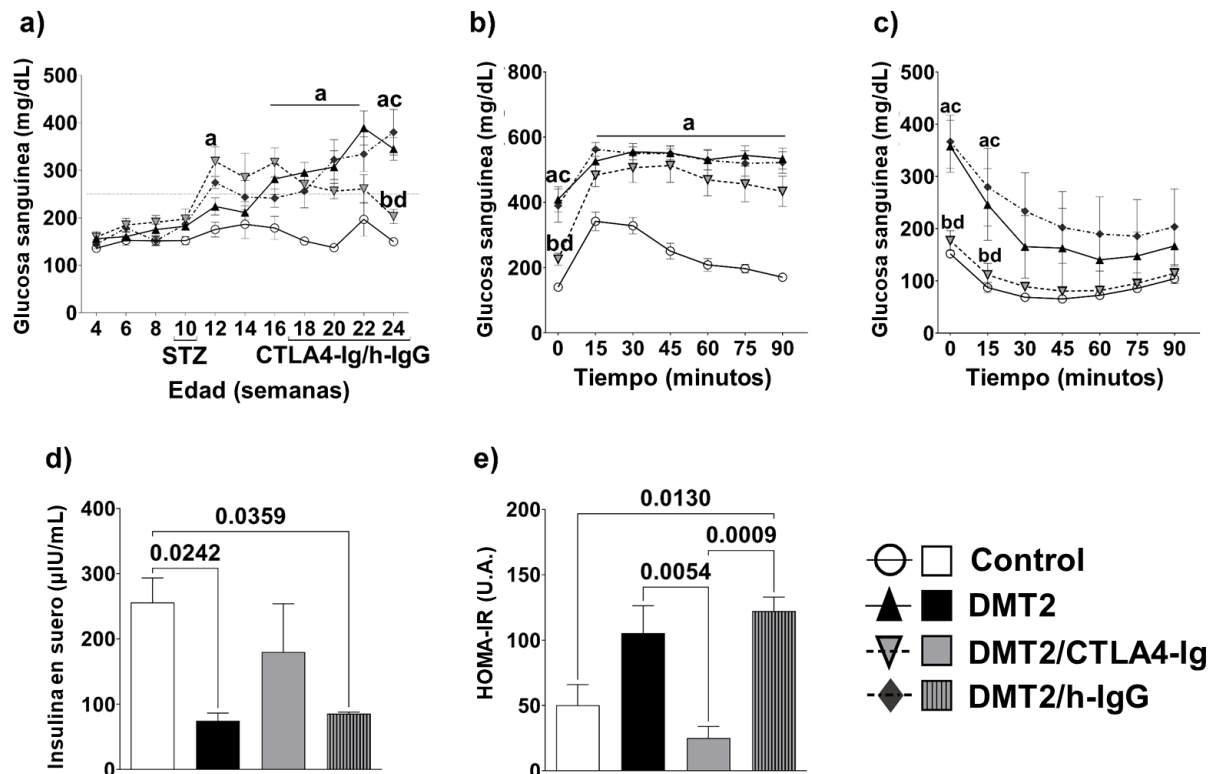


Figura 5. Los linfocitos T activados participan en desarrollo de hiperglucemia y resistencia a la insulina. Indujimos DMT2 en ratones macho C57BL/6 mediante la combinación de una dieta hipercalórica y dosis bajas de estreptozotocina. Analizamos el fenotipo metabólico en los diferentes grupos experimentales: (a) Concentración de glucosa en sangre n=10 por grupo. (b) Prueba de tolerancia a la glucosa (ip-GTT) a las 24 semanas de edad n=10 por grupo. (c) Prueba de tolerancia a la insulina (ip-ITT) a las 24 semanas de edad n=10 por grupo. (d) Concentración de insulina en suero a las 24 semanas de edad n=6 por grupo. (e) Índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR) a las 24 semanas de edad n=6 por grupo. Los gráficos representan la media \pm EEM. ^a $p \leq 0.05$ vs. control, ^b $p \leq 0.05$ vs. DMT2, ^c $p \leq 0.05$ vs. DMT2/CTLA4-Ig and ^d $p \leq 0.05$ vs. DMT2/h-IgG. Las llaves indican el valor de p.

7.2. La activación de los linfocitos T induce inflamación sistémica

Determinamos las concentraciones séricas de citocinas Th1, Th2 y Th17 a las 24 semanas de edad. El grupo DMT2 tuvo un incremento significativo en la concentración de TNF- α e IL-6 y una disminución en la IL-10 en comparación con los ratones sanos (Fig. 6 a–c). Por el contrario, la administración de CTLA4-Ig redujo la concentración de TNF- α e IL-6 y aumentó la concentración de IL-10 en comparación con los ratones de los grupos DMT2 y DMT2/h-IgG (Fig. 6 a–c). No hubo diferencias significativas en las concentraciones de IL-2, IL-17A e INF- γ (Fig. 6 d–e).

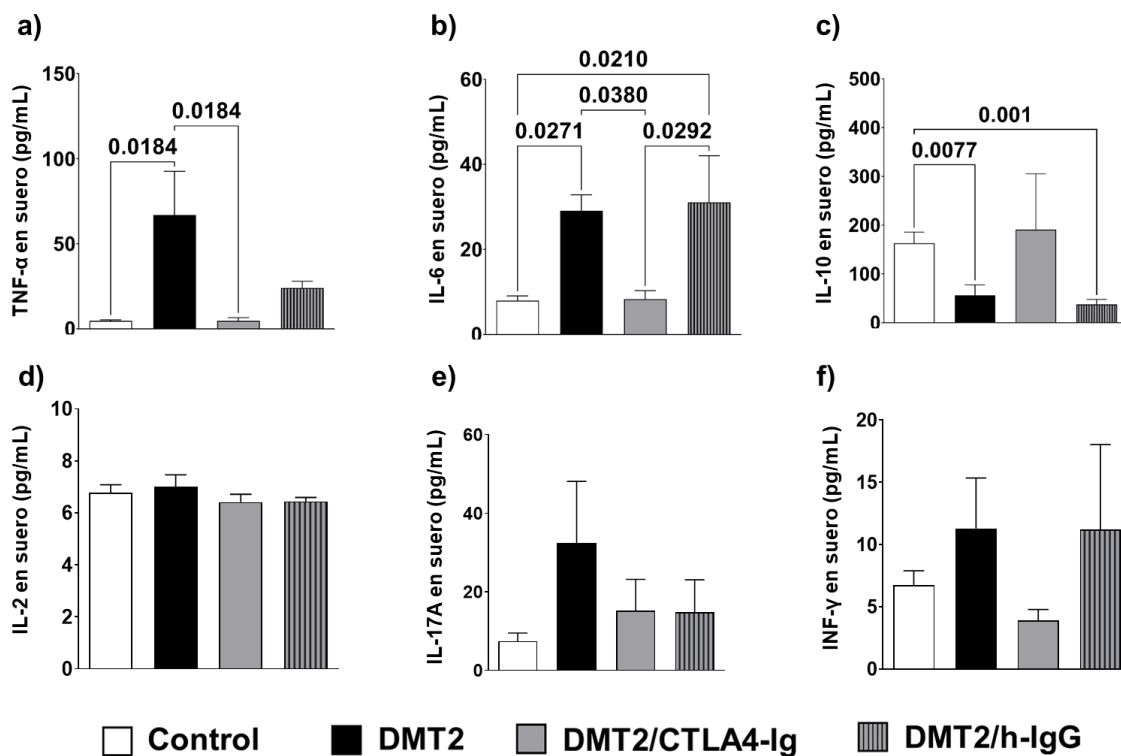


Figura 6. Los linfocitos T activados participan en el desarrollo de inflamación sistémica. Analizamos el perfil de citocinas en el suero de los diferentes grupos experimentales a las 24 semanas de edad. (a) Concentración de TNF- α , n=6 por grupo. (b) Concentración de IL-6, n=6 por grupo. (c) Concentración de IL-10, n=6 por grupo. (d) Concentración de IL-2, n=6 por grupo. (e) Concentración de IL-17A, n=6 por grupo. (f) Concentración de INF- γ , n=6 por grupo. Los gráficos representan la media \pm EEM. Las llaves indican el valor de p.

7.3. *La DMT2 incrementa la activación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en sangre periférica*

Para determinar las poblaciones celulares que podrían estar promoviendo la inflamación sistémica y comprender las alteraciones inmunológicas a nivel sistémico, realizamos un análisis por citometría de flujo de sangre periférica a las 24 semanas de edad.

Observamos que el grupo DMT2 tenía el mismo porcentaje de linfocitos T CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺ y linfocitos B CD19⁺ que el grupo de control (Fig.7). Sin embargo, hubo un aumento en la expresión del marcador de activación CD69 en los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (Fig. 8 a). No hubo diferencias significativas en el porcentaje linfocitos CD4⁺ productores de TNF- α (Th17), pero hubo una disminución en la subpoblación de células FoxP3⁺ en comparación con los ratones control (Fig. 8 b).

La administración de CTLA4-Ig en los ratones diabéticos redujo la cantidad de células T CD8⁺ (Fig. 7) y disminuyó la expresión de CD69 en los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ (Fig. 8 a). El control isotipo se comportó similar al grupo DMT2, al mostrar un aumento en la activación de las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, aunque tuvo un aumento significativo en el porcentaje de células Th17 en comparación con los otros grupos (Fig. 7 y Fig. 8). No encontramos diferencias significativas en las células presentadoras de antígeno entre los cuatro grupos (Fig. 9 b y c).

Sangre periférica

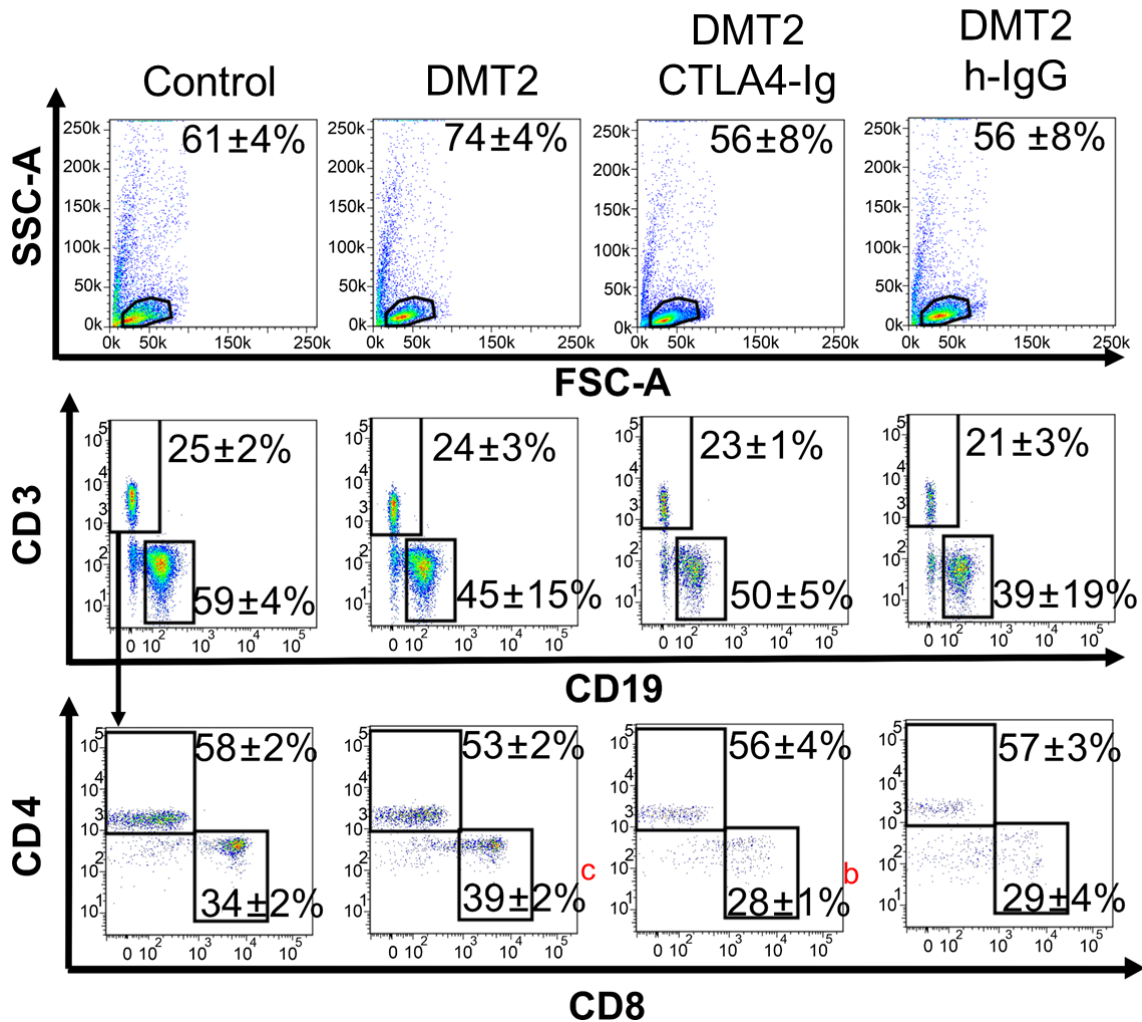


Figura 7. La DMT2 incrementa el porcentaje de los linfocitos T CD8+ en sangre periférica. Resultados del análisis de las poblaciones celulares de linfocitos T y B en sangre periférica. Se muestran diagramas de puntos representativos del análisis de citometría de flujo de las poblaciones de linfocitos. Los valores representan las medias ± EEM. ^a p ≤ 0.05% vs. control, ^b p ≤ 0.05% vs. DMT2, ^c p ≤ 0.05% vs. DMT2/CTLA4-Ig and ^d p ≤ 0.05% vs. DMT2/h-IgG. n=6.

Sangre periférica

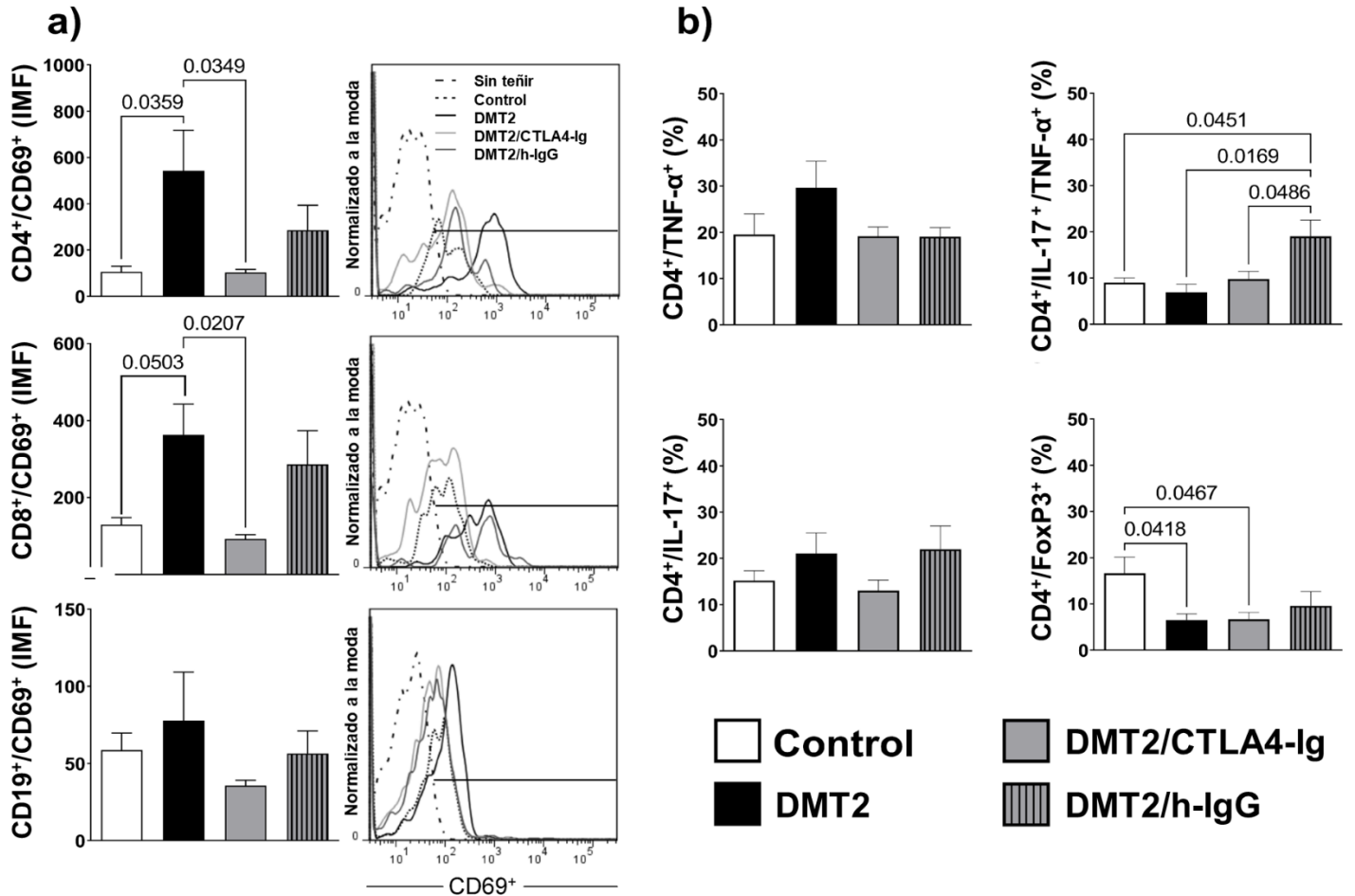


Figura 8. La DMT2 induce la activación de los linfocitos CD4+ y CD8+ en sangre periférica. A las 24 semanas de edad, obtuvimos leucocitos de sangre periférica y realizamos un análisis de las poblaciones de linfocitos por citometría de flujo. (a) Intensidad media de fluorescencia (IMF) del marcador de activación CD69 en linfocitos T y B. (b) Subpoblaciones de linfocitos Th17 y Tregs (FoxP3). Los gráficos representan la media ± EEM. Las llaves representan el valor de p. n=6.

Sangre periférica

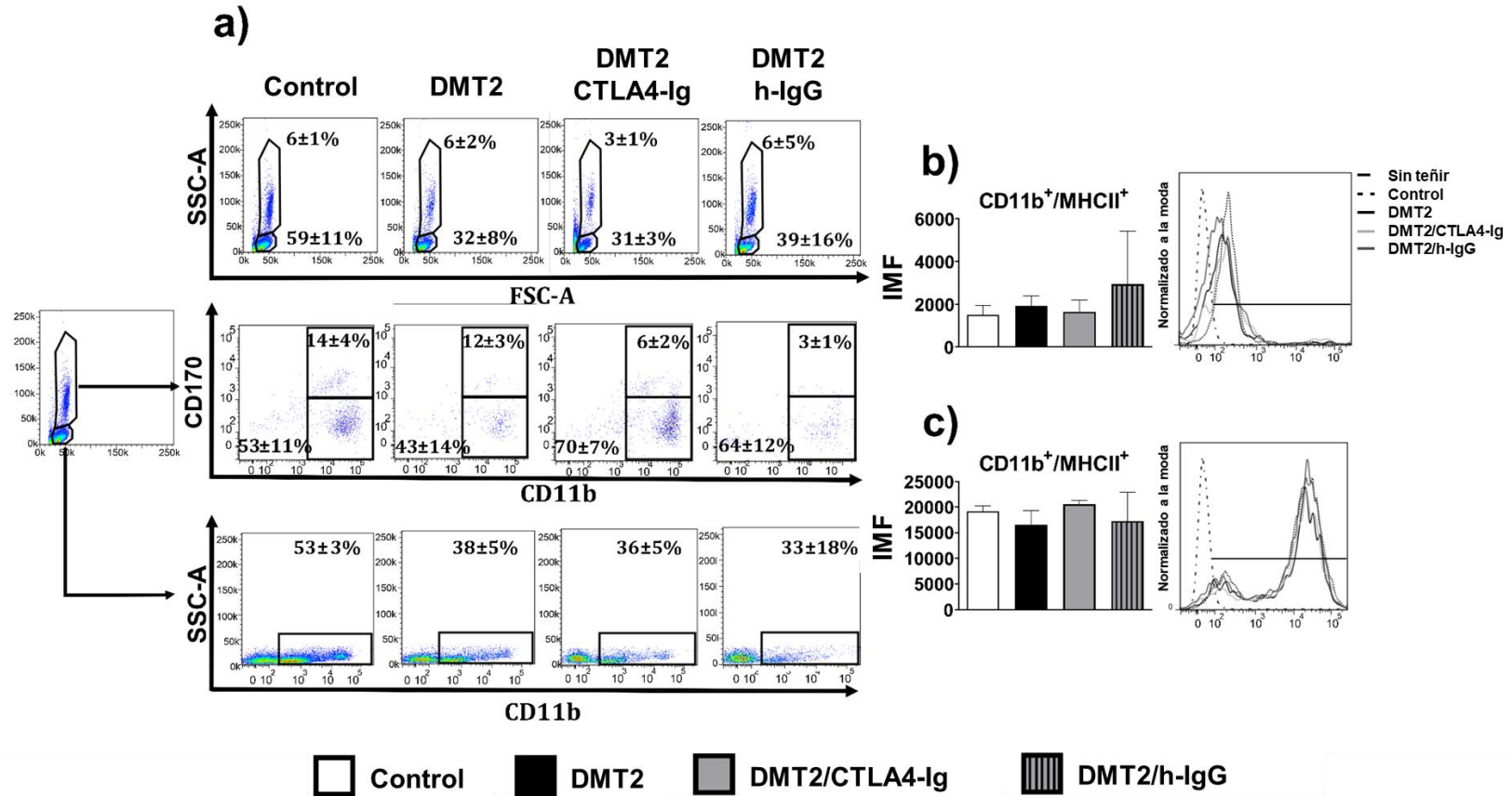


Figura 9. No existen diferencias en las poblaciones de células presentadoras de antígeno de sangre periférica entre los grupos experimentales. (a) Gráficos de puntos representativos del análisis de citometría de flujo para eosinófilos y las subpoblaciones de células presentadoras de antígeno en sangre periférica. (b) Intensidad media de fluorescencia (IMF) de la expresión de MHCII en granulocitos CD11b⁺ (c) IMF de la expresión de MHCII en monocitos CD11b⁺. Los gráficos representan la media ± EEM. Las llaves representan el valor de p. n=6.

7.4. La DMT2 incrementa la activación de los linfocitos T CD4⁺ inflamatorios y disminuye las poblaciones de Tregs en médula ósea

Para identificar la posible participación de los linfocitos en la generación de un microambiente proinflamatorio en el hueso y el desarrollo de la osteopatía diabética, analizamos la presencia de linfocitos activados y células presentadoras de antígeno en la médula ósea a las 24 semanas de edad.

El grupo DMT2 mostró un aumento de los linfocitos T CD4⁺ en comparación con el grupo control (Fig. 10). Además, los ratones de este grupo tuvieron una mayor expresión de CD69 solo en los linfocitos T CD4⁺ (Fig. 11 a), un aumento en la subpoblación de linfocitos Th17 secretores de TNF- α y una disminución en la subpoblación de células FoxP3⁺ en comparación con los ratones sanos (Fig. 10 b). Observamos un aumento en la expresión de MHC-II en monocitos y granulocitos CD11b⁺ (Fig. 12 b y c).

Los ratones en el grupo DMT2/CTLA4-Ig tuvieron una reducción en la población de linfocitos CD4⁺ (Fig. 10), una disminución en la expresión de CD69 en los linfocitos CD4⁺ (Fig. 11 a), una disminución en la subpoblación de linfocitos Th17 secretores de TNF- α y un aumento de la subpoblación de células FoxP3⁺ en comparación con el grupo DMT2 (Fig. 11 b). El CTLA4-Ig redujo la expresión de MHC-II en los monocitos CD11b⁺ (Fig. 12 c). El control de isotipo se comportó de manera similar a los ratones diabéticos sin el inhibidor (Fig. 10, 11 y 12).

Médula ósea

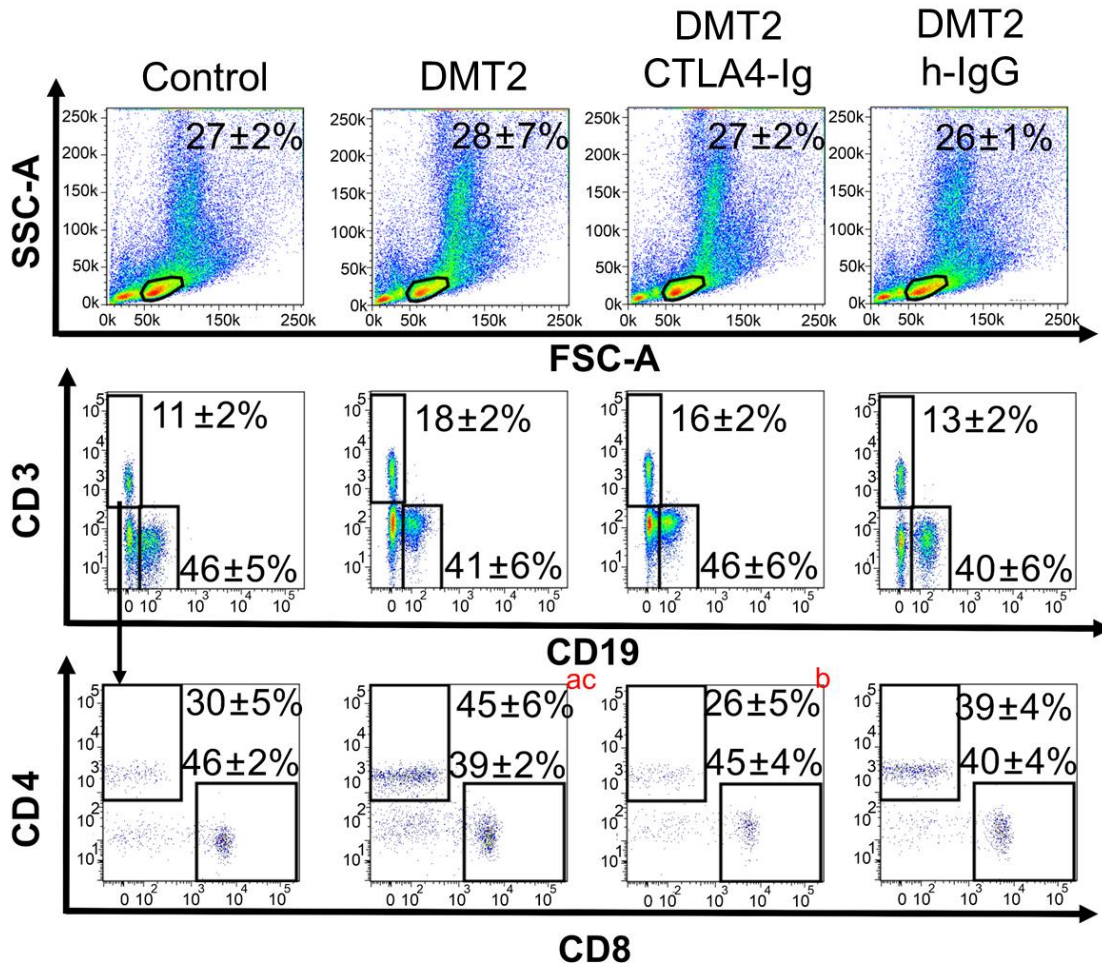


Figura 10. La DMT2 incrementa el porcentaje de linfocitos CD4⁺ en médula ósea. Resultados del análisis de las poblaciones celulares de linfocitos T y B en la médula ósea del fémur. Se muestran diagramas de puntos representativos del análisis de citometría de flujo de las poblaciones de linfocitos. Los valores representan la media del porcentaje ± EEM. ^a p ≤ 0.05% vs. control, ^b p ≤ 0.05% vs. DMT2, ^c p ≤ 0.05% vs. DMT2/CTLA4-Ig and ^d p ≤ 0.05% vs. DMT2/h-IgG. n=6.

Médula ósea

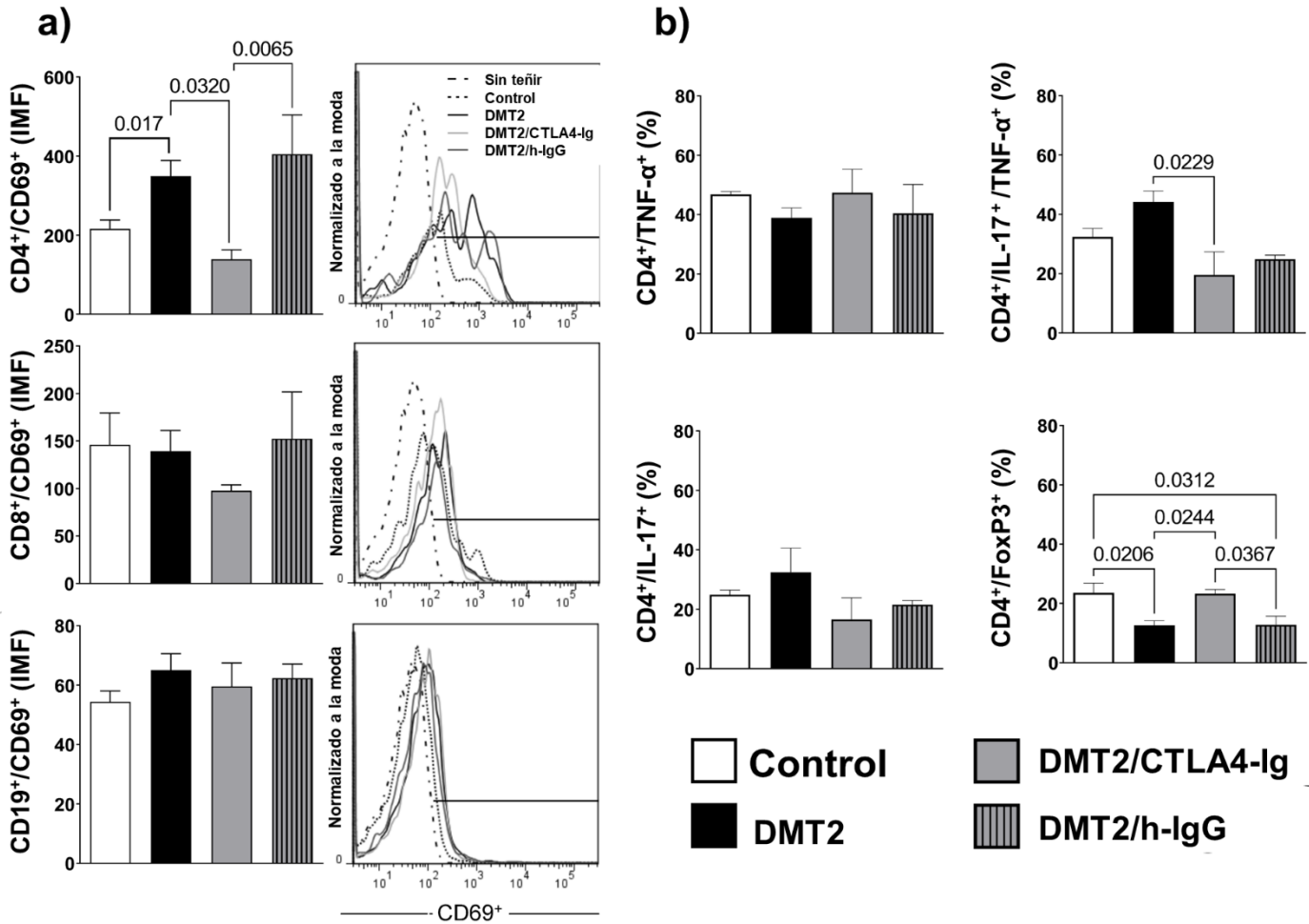


Figura 11. La DMT2 induce la activación de linfocitos CD4+, incrementa la subpoblación de linfocitos Th17/TNF-α+ y disminuye la subpoblación de linfocitos Tregs en médula ósea. A las 24 semanas de edad, obtuvimos los leucocitos a partir del explante de la médula ósea femoral y realizamos un análisis de las poblaciones de linfocitos por citometría de flujo. (a) Intensidad media de fluorescencia del marcador de activación CD69 en linfocitos T y B. (b) subpoblaciones de linfocitos Th17 y Tregs (FoxP3). Los gráficos representan la media ± EEM. Las llaves representan el valor de p. n=6.

Médula ósea

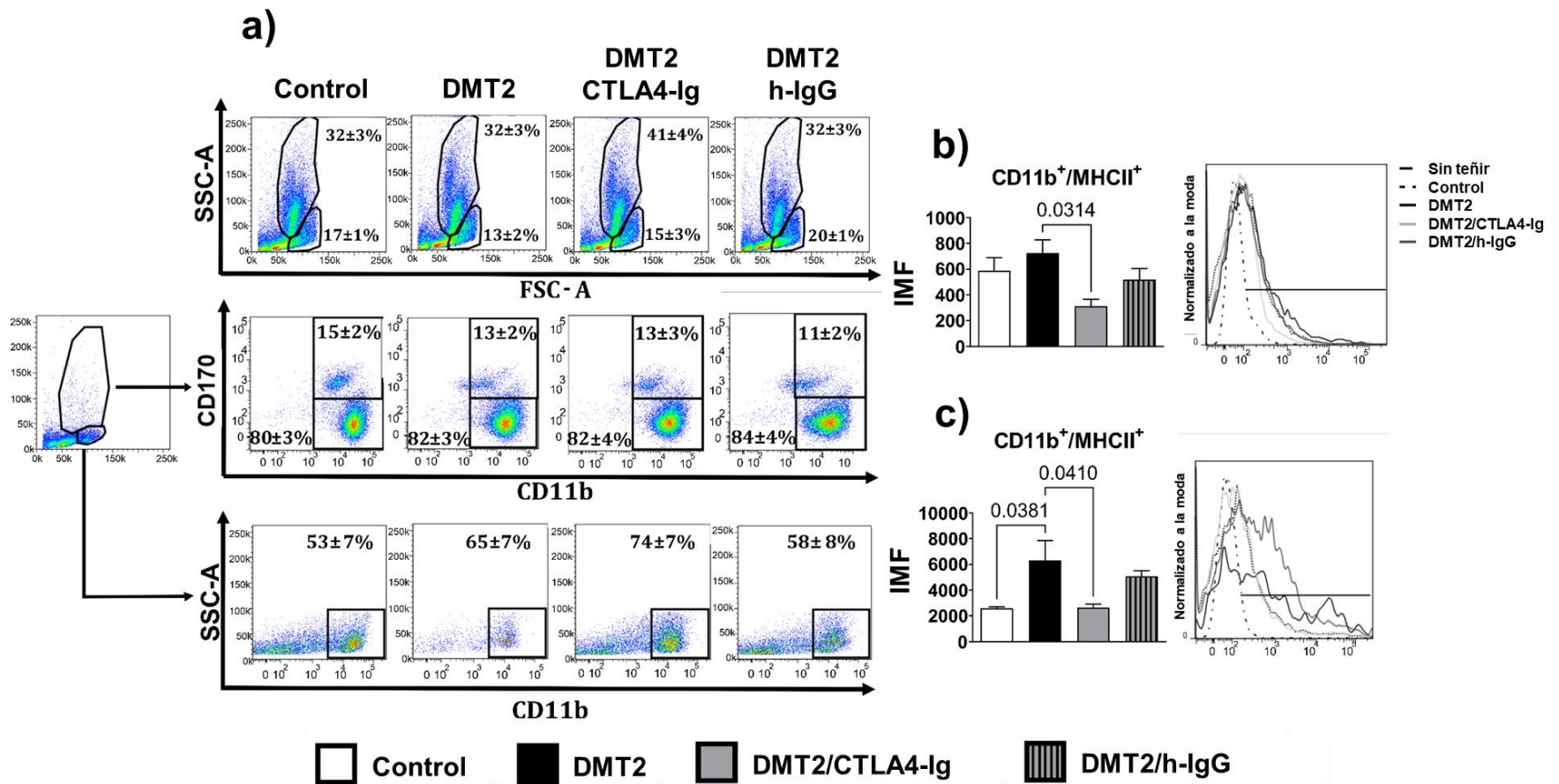


Figura 12. La DMT2 incrementa la expresión de MHCII en monocitos CD11b+ en la médula ósea femoral. (a) Gráficos de puntos representativos del análisis de citometría de flujo para eosinófilos y las subpoblaciones de células presentadoras de antígeno en sangre periférica. (b) Intensidad media de fluorescencia de la expresión de MHCII en granulocitos CD11b+ (c) Intensidad media de fluorescencia de la expresión de MHCII en monocitos CD11b+. Los gráficos representan la media ± EEM. Las llaves representan el valor de p. n=6.

7.5. La activación de los linfocitos T en la DMT2 induce el incremento de TNF- α y RANK-L en hueso

Para determinar si la activación de los linfocitos T causada por la DMT2 induce un microambiente inflamatorio y daño oxidativo en las proteínas del hueso, cuantificamos la concentración de TNF- α , RANK-L, IL-17 y proteínas carboniladas en el extracto proteico de la tibia a las 24 semanas de edad.

Los ratones del grupo DMT2 mostraron un aumento significativo de TNF- α y RANK-L en comparación con los ratones sanos, mientras que los ratones del grupo DMT2/CTLA4-Ig mostraron una reducción en los niveles de ambas citocinas en comparación con los ratones diabéticos sin el inhibidor (Fig. 13). No se observaron diferencias en las concentraciones de IL-17 y proteínas carboniladas entre los cuatro grupos.

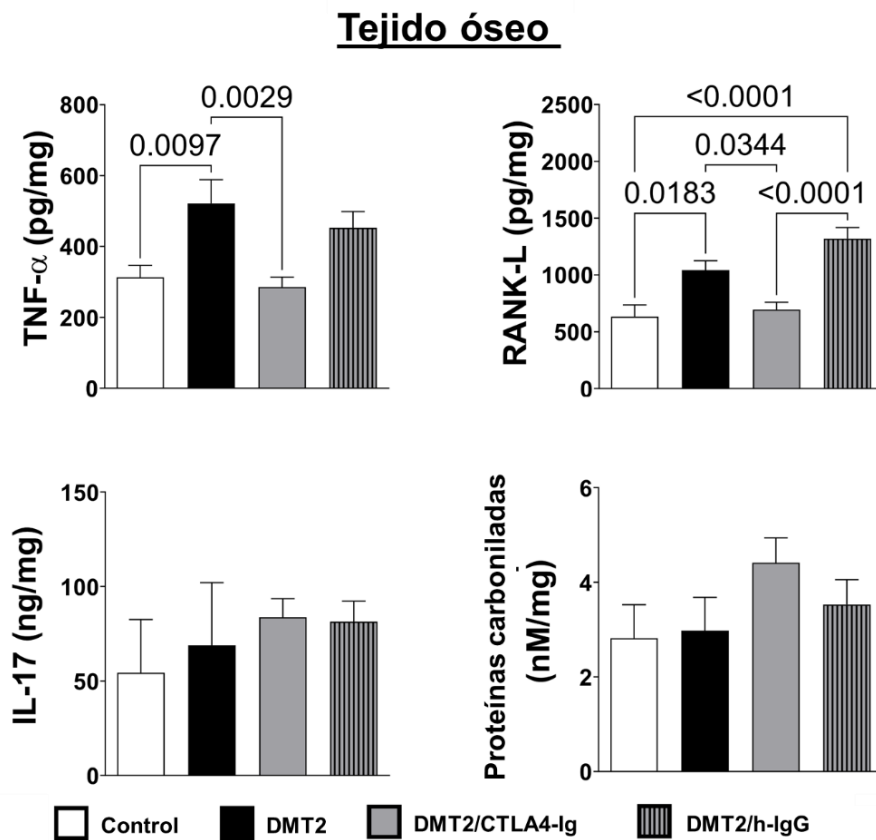


Figura 13. La activación de los linfocitos T por la DMT2 induce una mayor concentración de TNF- α y RANK-L en hueso. Resultados de la cuantificación de TNF- α (n=10 por grupo), RANK-L (n=8 por grupo), IL-17 (n=6 por grupo), y proteínas carboniladas (n=5 por grupo) en el extracto proteico de las tibias obtenidos por ensayos de ELISA o pruebas colorimétricas. Los gráficos muestran la media \pm EEM. Las llaves indican el valor de p.

7.6. *La activación de los linfocitos T CD4⁺ en la DMT2 disminuye la calidad ósea*

Una vez que observamos que los ratones diabéticos tratados con CTLA4-Ig tenían una disminución en la activación de linfocitos T CD4⁺ y en las concentraciones de TNF- α y RANK-L en el hueso, analizamos la microarquitectura ósea por μ CT y las propiedades biomecánicas óseas en los fémures de los ratones a las 24 semanas de edad.

Los ratones del grupo DMT2 mostraron un hueso trabecular más poroso con una disminución del volumen óseo (BV/TV) y un aumento de la separación trabecular (Th. Sp) en la epífisis distal y la metáfisis; además, los ratones con DMT2 tenían una disminución en el área de la superficie ósea en la epífisis y una menor densidad de conectividad en la metáfisis (Fig. 14 a, c, d y Tabla 2). Los ratones del grupo DMT2 también mostraron una disminución significativa en el grosor cortical de la diáfisis con una mayor área de médula ósea (Fig. 14 a, b y Tabla 2), lo que indica huesos menos densos y más porosos en comparación con los ratones sanos. Además, los ratones en el grupo DMT2 mostraron una disminución en la resistencia a la fractura, es decir, en la tensión máxima, el módulo elástico, el límite elástico (Fig. 14 e), la rigidez, la carga máxima y el trabajo hasta la fractura (Tabla 2), lo que indica un aumento en fragilidad ósea en comparación con los ratones del grupo de control.

Los ratones del grupo DMT2/CTLA4-Ig mostraron una red trabecular más compleja con un hueso trabecular menos poroso evidenciado por un aumento en el volumen óseo y una disminución en la separación trabecular en la epífisis distal y la metáfisis, con un aumento en la superficie ósea en la epífisis y una mayor densidad de conectividad en la metáfisis en comparación con los ratones en el grupo DMT2 (Fig. 14 a, c, d y Tabla 2). Los ratones de este grupo tenían un hueso cortical más grueso en la diáfisis y una disminución en el área de la médula ósea (Fig. 14 a y b), lo que indica una mayor densidad ósea en comparación con los ratones diabéticos no tratados. Además, la inhibición de la activación de las células T aumentó el estrés máximo, la tensión de fluencia (Fig. 14 e), la carga de fluencia, la carga máxima, el desplazamiento posterior a la fluencia y el trabajo hasta la fractura (Tabla 2), lo que indica que la activación de las células T CD4⁺ altera las propiedades biomecánicas óseas y causa fragilidad ósea en ratones con DMT2. El grupo DMT2/h-IgG mostró un comportamiento similar al grupo DMT2 en los parámetros estructurales y biomecánicos del hueso (Fig. 14 a-e y Tabla 2).

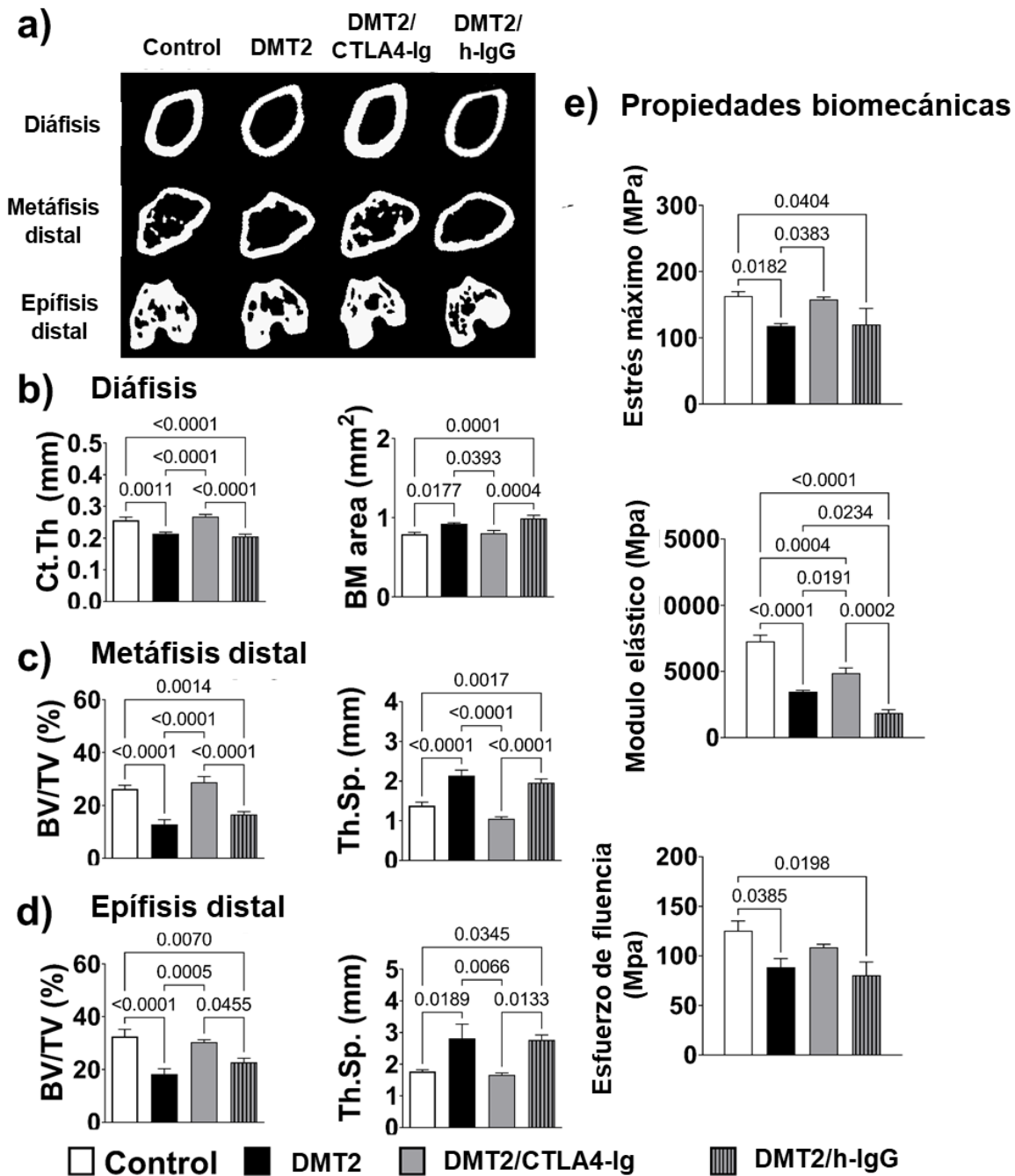


Figura 14. La activación de los linfocitos CD4⁺ provocada por la DMT2 disminuye la densidad mineral ósea, incrementa la porosidad del hueso trabecular y reduce la resistencia ósea a la fractura. Análisis de la microarquitectura ósea y la resistencia a la fractura en el fémur de los diferentes grupos experimentales. (a) Imágenes transaxiales representativas obtenidas por microtomografía computarizada (μ CT) de las diáfisis y las epífisis y metáfisis distales del fémur (b) resultados del grosor del hueso cortical (Ct. Th.) y el área de la médula ósea en la diáfisis del fémur (n=10 por grupo). (c) Resultados del volumen óseo (BV/TV) y la separación trabecular (Tb.sp.) en la metáfisis distal del fémur (n=10 por grupo). (d) Resultados del volumen óseo (BV/TV) y la separación trabecular (Tb.sp.) en la epífisis distal del fémur (n=10 por grupo). (e) Propiedades biomecánicas óseas del fémur obtenidas por ensayos de flexión de tres puntos (n=6 por grupo). Los gráficos representan la media \pm EEM. Las llaves indican el valor de p.

Tabla 2. Microarquitectura ósea y características biomecánicas del fémur.

Análisis de la microarquitectura ósea del fémur				
	Control	DMT2	DMT2/CTLA4-Ig	DMT2/h-IgG
Epífisis distal				
BV/TV (%)	32.47 ± 2.681	18.24 ± 1.99****	30.34 ± 0.94###	22.71 ± 1.57** &
BS/TV (mm ²)	6.90 ± 0.98	4.03 ± 0.77*	5.20 ± 0.26	6.14 ± 0.72
Tb. Sp. (mm)	1.78 ± 0.05	2.82 ± 0.44*	1.67 ± 0.06##	2.76 ± 0.16* &
Tb. Th. (mm)	0.37 ± 0.01	0.37 ± 0.01	0.37 ± 0.004	0.35 ± 0.01
Tb. N. (1/mm)	2.34 ± 0.41	1.28 ± 0.32	2.17 ± 0.24	2.13 ± 0.40
Conn. density (mm ⁻³)	0.58 ± 0.09	0.61 ± 0.12	0.88 ± 0.13	0.84 ± 0.16
SMI	1.70 ± 0.08	1.60 ± 0.18	1.40 ± 0.12	1.60 ± 0.10
Metáfisis distal				
BV/TV (%)	26.21 ± 1.41	12.81 ± 1.78****	28.73 ± 2.17#####	16.60 ± 1.07** &&&&
BS/TV (mm ²)	14.30 ± 4.27	10.30 ± 1.93	17.90 ± 5.45	9 ± 1.21
Tb. Sp. (mm)	1.38 ± 0.09	2.13 ± 0.14****	1.05 ± 0.047#####	1.96 ± 0.10** &&&&
Tb. Th. (mm)	0.28 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.29 ± 0.02	0.26 ± 0.01
Tb. N. (1/mm)	14.48 ± 4.28	5.47 ± 1.46	16.17 ± 5.28	5.26 ± 1.55
Conn. density (mm ⁻³)	0.49 ± 0.05	0.30 ± 0.07****	1.60 ± 0.15#####	0.42 ± 0.10&&&&
SMI	2.80 ± 0.16	3 ± 0.07	2.80 ± 0.18	3.10 ± 0.10
Diáfisis				
Área total (mm ²)	1.90 ± 0.11	2 ± 0.03	2 ± 0.01	2.1 ± 0.06
BM área (mm ²)	0.79 ± 0.02	0.92 ± 0.01*	0.80 ± 0.04#	0.99 ± 0.04*** &&&
B. área (mm ²)	1.20 ± 0.07	1.10 ± 0.02	1.20 ± 0.04	1.1 ± 0.03
Ct. Th. (mm)	0.26 ± 0.01	0.21 ± 0.005**	0.27 ± 0.007#####	0.21 ± 0.007**** &&&&
Análisis de las propiedades biomecánicas y materiales del fémur				
Imin	0.34 ± 0.02	0.43 ± 0.02	0.42 ± 0.004	0.48 ± 0.07*
Rigidez (N/mm)	193.90 ± 23.23	98.45 ± 4.98**	120.20 ± 4.55**	60.37 ± 14.70*** &
Rendimiento de carga (N)	27.60 ± 0.82	23.30 ± 1.88	29.50 ± 0.43#	25 ± 1.07
Fuerza máxima (N)	39.40 ± 1.17	33.60 ± 0.91**	41.90 ± 0.48###	36.80 ± 1.83&
Desplazamiento post rendimiento (mm)	0.59 ± 0.02	0.55 ± 0.09	0.78 ± 0.04#	0.76 ± 0.06
Trabajo de fractura (Nmm)	40.20 ± 0.93	34.70 ± 1.53*	41.80 ± 0.49##	34.70 ± 1.58* &&
Modulo elástico (MPa)	7269 ± 465.70	3462 ± 105.40****	4864 ± 389.10*** #	1861 ± 236.80**** # &&&
Esfuerzo de fluencia (MPa)	125.30 ± 9.90	88.60 ± 8.80*	108.70 ± 3	80.56 ± 13.20*
Estrés máximo (MPa)	163.10 ± 6.70	118 ± 3.50*	157.80 ± 3.60#	120.20 ± 24.16*

*P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01, *** P ≤ 0.001, ****P ≤ 0.0001 vs. control; #P ≤ 0.05, ##P ≤ 0.01, ###P ≤ 0.001, ####P ≤ 0.0001 vs. DMT2; &P ≤ 0.05, &&P ≤ 0.01, &&&P ≤ 0.001, &&&&P ≤ 0.0001 vs. DMT2/CTLA4-Ig. **BV**: volumen óseo; **TV**: volumen total; **Tb.**: trabecular; **Sp.**: separación; **Th.**: grosor; **N.**: numero; **Conn**: conectividad; **SMI**: índice de modelado estructural; **Imin**: inercia mínima.

7.7. La activación de los linfocitos T CD4⁺ disminuye el número de osteoblastos e incrementa el número de osteoclastos en la DMT2

Para determinar el mecanismo por el cual la activación de las células T conduce a alteraciones en la microarquitectura ósea y las propiedades biomecánicas, analizamos el número de células positivas para fosfatasa alcalina y el número de células positivas para TRAP en el endostio a las 24 semanas de edad. Estos parámetros permiten conocer el estado del remodelado óseo a través de la actividad de los osteoblastos y osteoclastos.

Observamos que el grupo DMT2 tenía menos células ALP⁺ (osteoblastos) con un aumento de células TRAP⁺ (osteoclastos) comparado con los ratones sanos. Por el contrario, el grupo DMT2/CTLA4-Ig mostró un aumento de células ALP⁺ y una disminución del número de osteoclastos TRAP⁺ en comparación con el grupo DMT2. El control de isotipo se comportó como los ratones diabéticos sin el inhibidor (Fig. 15).

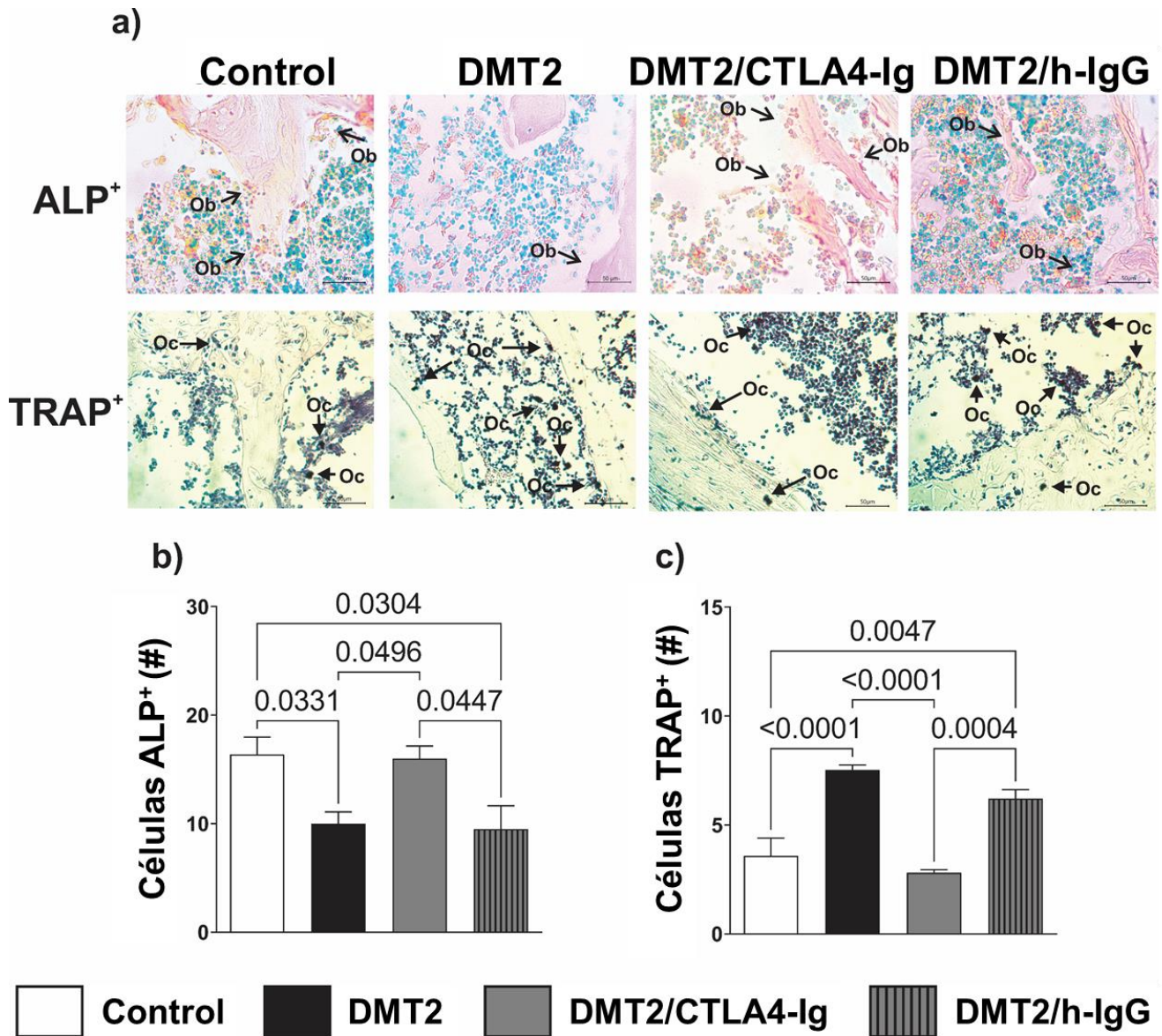


Figura 15. La activación de los linfocitos CD4⁺ por la DMT2 reduce el número de células ALP⁺ e incrementa el número de células TRAP⁺ en el endostio. Resultados de la evaluación de la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) obtenida por histoquímica y de la expresión de la fosfatasa acida resistente al tartrato (TRAP) obtenido por inmunohistoquímica en las células del endostio de la tibia. (a) Micrografías representativas de los cortes histológicos teñidos con “Fast red” que indica las células con actividad ALP y “Vector methyl green” que tiñe ácidos nucleicos y micrografías representativas de la tinción de TRAP por IHC. Las flechas indican las áreas con presencia de células similares a osteoblastos (ALP⁺) o similares a osteoclastos (TRAP⁺) en el endostio. Barras = 50 μ m. (b) Resultados de la cuantificación del número de células positivas para ALP en el endostio (n=6 por grupo). (c) Resultados de la cuantificación del número de células positivas para TRAP (n=6 por grupo). Los gráficos representan la media \pm SEM. las llaves indican el valor de p.

7.8. El incremento en la activación de linfocitos T CD4⁺ en médula ósea conduce a un microambiente proinflamatorio en el hueso, mala calidad ósea y resistencia a la insulina en la DMT2

Una vez que observamos que la activación de las células T aumenta la resistencia a la insulina y la inflamación sistémica y local, y reduce la calidad ósea, decidimos realizar un mapa de calor con todas las variables analizadas para visualizar las características de los grupos experimentales. Observamos que el grupo DMT2 tenía una huella diferente en comparación con el grupo de control en los parámetros metabólicos (Fig. 16 a), inmunes (Fig. 16 b, d, y e) y en las características estructurales y biomecánicas del hueso (Fig. 16 f). Estas características son causadas por la activación de las células T porque el grupo DMT2/CTLA4-Ig tuvo una huella similar al grupo de control, lo que indica que la activación de las células T causa alteraciones metabólicas, inmunitarias y óseas en ratones con DMT2. Es importante señalar que el grupo isotipo tuvo una huella similar al grupo DMT2, lo que indica que la inhibición de la activación de las células T es responsable de los efectos que observamos en el grupo de DMT2/CTLA4-Ig.

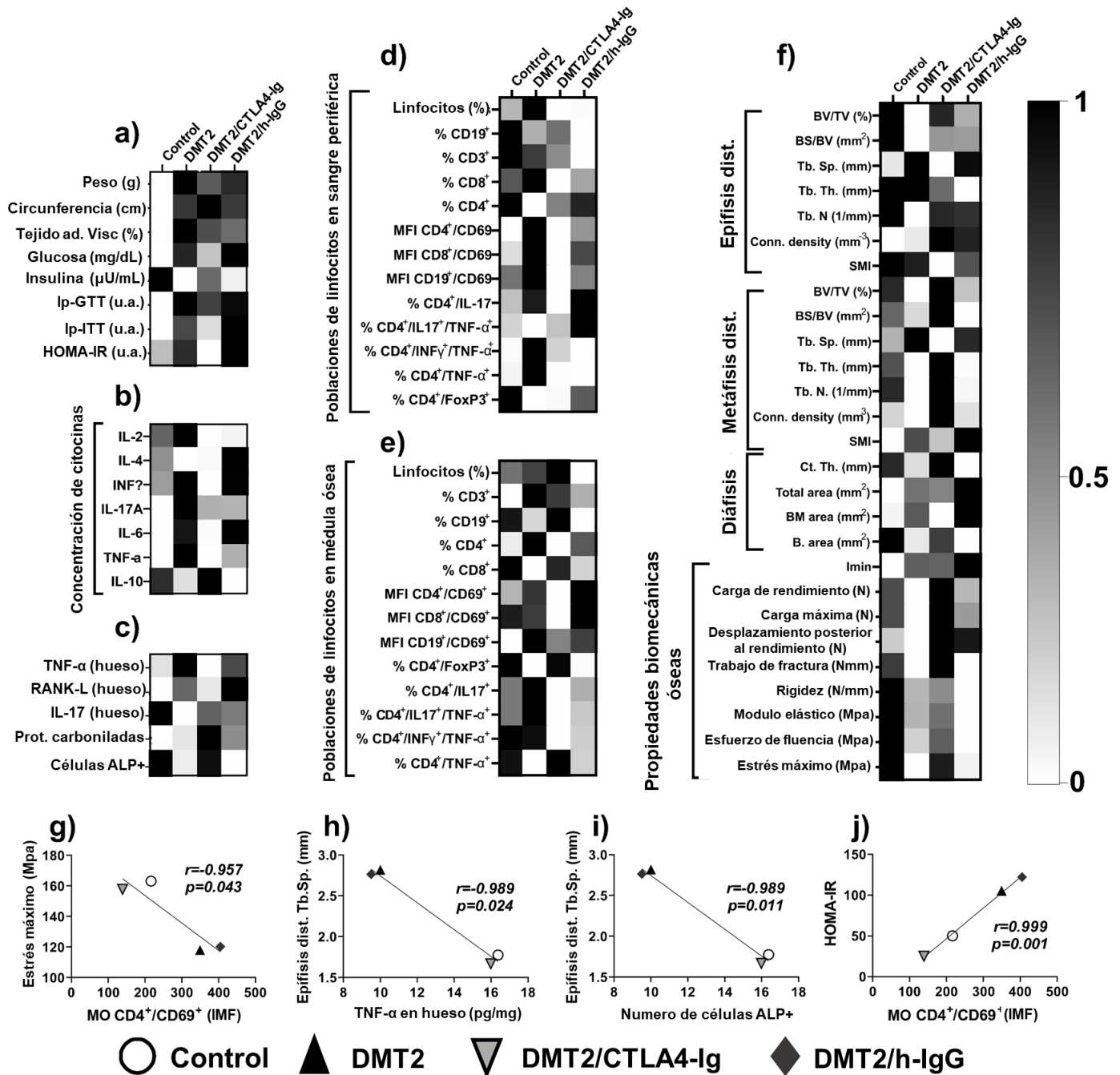


Figura 16. La activación de los linfocitos T CD4 de médula ósea se correlaciona con alteraciones óseas y resistencia a la insulina en ratones con DMT2. (a-f) mapas de calor con los parámetros metabólicos, inmunológicos y de calidad ósea, que muestran que los ratones diabéticos tienen un aumento en los parámetros determinantes para desarrollar DMT2 y fragilidad ósea en comparación con los ratones sanos; mientras que la administración de CTLA4-Ig a los ratones diabéticos provocó un comportamiento similar a los ratones del grupo control. Correlación de Pearson entre: (g) la activación de los linfocitos T CD4⁺ de médula ósea y el estrés máximo, (h) la concentración de TNF-α en hueso y la separación trabecular en la epifisis distal (Th. Sp), (i) el número de células ALP⁺ en el endostio y la separación trabecular en la epifisis distal (Th. Sp), (j) la activación de los linfocitos T CD4⁺ de médula ósea y el índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR).

Realizamos un análisis de correlación múltiple de Pearson con los valores medios de cada grupo experimental con el objetivo de determinar estadísticamente que población de linfocitos T (sangre periférica o médula ósea) induce las alteraciones observadas en el grupo DMT2 (Fig. 17). Los resultados mostraron que los linfocitos T CD4⁺ activados de sangre periférica se correlacionaron negativamente con el BV/TV de la epífisis distal ($r=-0.96$, $p=0.04$), y se correlacionó positivamente con la concentración de TNF- α en hueso ($r=0.958$, $p=0.042$), y la población de linfocitos T CD4⁺ de médula ósea ($r=0.973$, $p=0.027$). Los linfocitos CD8⁺ activados de sangre periférica se correlacionaron positivamente con la activación de los linfocitos CD4⁺ de sangre periférica ($r=0.954$, $p=0.046$), el porcentaje de linfocitos CD4⁺ de médula ósea ($r=0.997$, $p=0.003$), la concentración de TNF- α en hueso ($r=0.9999$, $p=0.0001$), y con la separación trabecular en la epífisis distal ($r=0.976$, $p=0.024$); y se correlacionaron negativamente con el porcentaje de linfocitos CD8⁺ de médula ósea ($r=-0.996$, $p=0.004$), con la subpoblación de linfocitos FoxP3⁺ ($r=-0.963$, $p=0.037$), y la subpoblación de linfocitos CD4⁺/TNF- α ⁺ de médula ósea ($r=-0.993$, $p=0.007$).

Además, observamos una correlación negativa entre las células T CD4⁺ activadas de médula ósea con la IL-10 sérica ($r=-0.99$, $p=0.01$), los linfocitos B CD19⁺ ($r=-0.98$, $p=0.02$), la superficie ósea de la metáfisis distal ($r=-0.993$, $p=0.007$), el grosor trabecular ($r=-0.98$, $p=0.02$), el número de trabéculas ($r=-0.967$, $p=0.033$), el grosor cortical ($r=-0.988$, $p=0.012$), el trabajo de fractura ($r=-0.98$, $p=0.02$) (Fig. 17) y el estrés final ($r=-0.957$, $p=0.043$) (Fig. 17 y 16 g), y una correlación positiva con el HOMA-IR ($r=0.999$, $p=0.001$) (Fig. 16 j), la IL-6 de suero ($r=0.954$, $p=0.003$), la subpoblación de linfocitos Th17 de sangre periférica ($r=0.993$, $p=0.007$), la separación trabecular de la epífisis distal ($r=0.957$, $p=0.043$), la separación trabecular de la metáfisis distal ($r=0.95$, $p=0.05$), y el área de la médula ósea ($r=0.969$, $p=0.031$) (Fig. 17). Las concentraciones de TNF- α en hueso se correlacionaron negativamente con la separación trabecular de la epífisis distal ($r=-0.989$, $p=0.024$) (Fig. 16 h), y la separación trabecular fue correlacionada negativamente con el número de osteoblastos ($r=-0.989$, $p=0.011$) (Fig. 16 i).

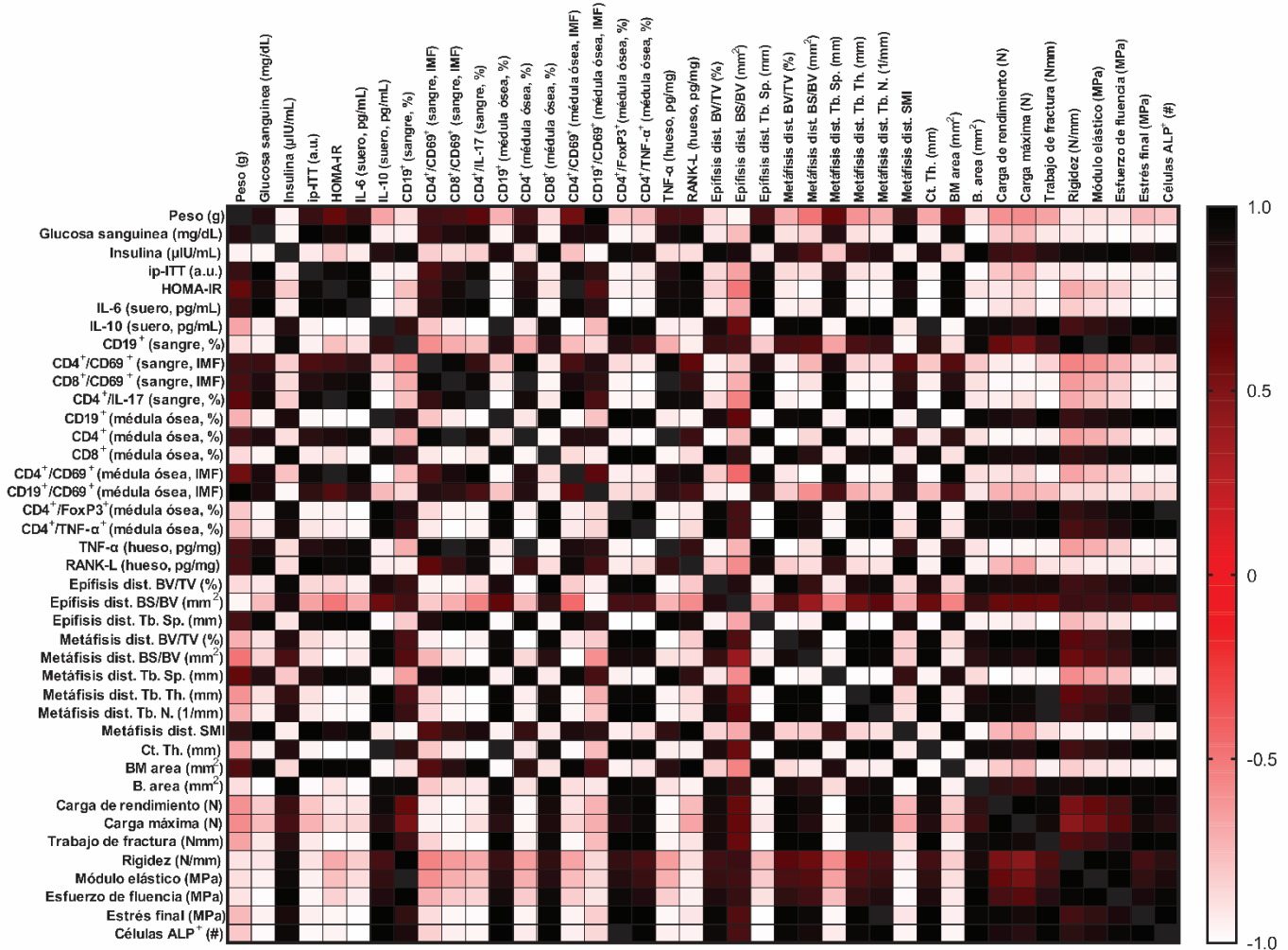


Figura 17. Correlación múltiple de Pearson entre todas las variables analizadas. Se muestra un mapa de correlación múltiple de Pearson. Los cuadrados negros indican una correlación positiva, los cuadrados blancos indican una correlación negativa y los cuadrados rojos indican que no hay correlación entre las variables.

8. DISCUSIÓN

En este estudio, encontramos por primera vez que la activación de los linfocitos T CD4⁺ de la médula ósea en la DMT2 inducen una calidad ósea deficiente que se correlaciona con la inflamación sistémica y del tejido óseo y la resistencia a la insulina.

Nuestro modelo tenía las principales características clínicas de la DMT2 (70), tales como la obesidad central, la resistencia a la insulina, la hiperglucemia, la disminución de las concentraciones de insulina sérica y la inflamación sistémica. Además, encontramos en sangre periférica un aumento en la activación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ que es consistente con lo observado en pacientes con DMT2 (24,71). La administración de h-IgG a ratones diabéticos provocó un aumento en el subconjunto de células Th17/TNF- α , contrario a lo informado en otros estudios en los que la administración de h-IgG no tiene efectos inmunológicos en ratones (72–74). Sin embargo, los efectos de h-IgG en esta subpoblación celular son independientes de la DMT2 porque solo encontramos diferencias entre ambos grupos en este parámetro inmunológico.

Observamos un aumento de linfocitos T CD4⁺ proinflamatorios activados en la médula ósea de los ratones diabéticos, lo que coincide con los recientes hallazgos de Santopaolo et al., quienes observaron un aumento de células T CD4⁺ activadas en la médula ósea de pacientes con DMT2 (75).

El desarrollo de DMT2 en nuestro modelo depende de la activación de los linfocitos T, debido a que la administración de CTLA4-Ig disminuyó la resistencia a la insulina y aumentó la sensibilidad a la insulina y, en consecuencia, redujo los niveles de glucosa en sangre en ratones con DMT2.

Es posible que los linfocitos T activados favorezcan el desarrollo de DMT2 al aumentar las concentraciones séricas de TNF- α e IL-6, debido a que observamos que el CTLA4-Ig disminuyó la concentración de ambas citocinas, y el TNF- α y la IL-6 inducen resistencia a la insulina al inhibir la autofosforilación del receptor de insulina e inducir la fosforilación en los residuos de serina del sustrato 1 del receptor de insulina (IRS-1) (76,77). Además, estos resultados son consistentes con los informados por Moraes-Vieiria et al. (78), quienes observaron que la administración de CTLA4-Ig en ratones diabéticos RPB4-Ox reduce la resistencia a la insulina y la hiperglucemia y mejora el metabolismo de la glucosa al reducir la inflamación en el tejido adiposo. Sin embargo, en otro estudio el

CTLA4-Ig no mejoró la sensibilidad a la insulina en ratones diabéticos (79). Estas discrepancias pueden deberse a las diferencias en la dosis de CTLA4-Ig, en donde el uso de 500 µg por ratón es beneficioso para la salud metabólica, como lo encontramos nosotros y Moraes-Vieira et al. Sin embargo, los tres estudios coinciden en que las células T activadas juegan un papel esencial en la fisiopatología de la DMT2 y sugerimos que el CTLA4-Ig es una estrategia terapéutica atractiva para las enfermedades metabólicas. Además, nuestros hallazgos contribuyen a la hipótesis anterior que sugiere que las alteraciones inmunitarias en la médula ósea en la DMT2 tienen un impacto directo en la resistencia a la insulina y la salud metabólica (80), por lo que podría ser interesante investigar los efectos de CTLA4-Ig en la vía de la insulina. Por lo tanto, la modulación de las poblaciones de células T CD4⁺ y su activación en la médula ósea puede ser un objetivo terapéutico prometedor para el tratamiento de la DMT2 ya que además, no se han informado efectos secundarios graves con el uso de CTLA4-Ig en otras enfermedades (81,82), aunque su seguridad no ha sido comprobada en la DMT2.

A pesar de nuestros hallazgos, no conocemos el mecanismo que subyace al aumento de los linfocitos T CD4⁺ activados en la médula ósea en la DMT2. Creemos que migran por circulación sanguínea a la médula ósea. Se ha demostrado que las células T activadas circulantes pueden migrar a la médula ósea (83,84) en respuesta al gradiente quimiotáctico de CXCL12 (52), quimiocina que se ha visto incrementada en el estroma de la médula ósea en respuesta a la hiperglucemia (48,85); además, recientemente se encontraron concentraciones más altas de otras quimiocinas receptoras como CCL19 y CXCL10/11 en la médula ósea de pacientes con DMT2 (75). Los linfocitos T CD4⁺ activados favorecen el microambiente inflamatorio de la médula ósea, incluido el nicho endostial, lo que afecta negativamente a la calidad ósea. Alternativamente, en nuestro modelo, el aumento en la activación de las células T CD4⁺ de la médula ósea puede deberse a la presentación del antígeno, ya que observamos un aumento de MHCII en células CD11b⁺ en la médula ósea. En ratonas ovariectomizadas, el microambiente proinflamatorio en la médula ósea induce la activación de las células T por parte de las células presentadoras de antígeno (75). Por lo tanto, es posible que la migración de los linfocitos T CD4⁺ activados hacia la médula ósea y la activación por presentación de antígeno *in situ* esté ocurriendo en nuestros ratones con DMT2.

Demostramos que en la DMT2 el aumento en la activación de los linfocitos T CD4⁺ en médula ósea provoca una mala calidad ósea. El tratamiento con CTLA4-Ig aumentó la

densidad ósea y la resistencia a la fractura y disminuyó la porosidad del hueso trabecular. Además, encontramos una correlación positiva entre la activación de las células T CD4⁺ de la médula ósea con la separación trabecular y la fragilidad ósea. Interesantemente, observamos que el CTLA4-Ig aumentó el porcentaje de células Tregs, lo que se correlacionó positivamente con la densidad ósea y negativamente con los parámetros de separación trabecular y fragilidad ósea. Se debe considerar que no encontramos ninguna correlación entre las poblaciones de células T CD4⁺ de sangre periférica y los parámetros de calidad ósea. Esto indica que la alteración en las poblaciones de células T CD4⁺ en la médula ósea conduce a una mala calidad ósea en la DMT2. Estos resultados indican que la activación de las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ en la médula ósea conduce a huesos más frágiles al inducir un microambiente inflamatorio en el hueso. Queda la pregunta de si los ratones viejos con DMT2 responderían a CTLA-4 como lo observamos en nuestro modelo.

Observamos que los ratones diabéticos tratados con CTLA4-Ig tenían una disminución en el porcentaje de células T CD4⁺ productoras de TNF- α e IL-17, y una menor concentración de TNF- α y RANK-L en el extracto proteico óseo. El aumento de TNF- α e IL-17 induce una sobreproducción de RANK-L, que a su vez provoca una mayor reabsorción ósea (48,52,86), y disminuyen la diferenciación y actividad osteoblástica (87), como se refleja en el reducido número de células similares a osteoblastos en ratones diabéticos sin el inhibidor.

El CTLA4-Ig mejora la calidad ósea al reducir la secreción de TNF- α y RANK-L (57) e inhibir la expresión del receptor 4 de efrina tipo B (EphB4) en los linfocitos T, lo que aumenta la osteoblastogénesis (88) y disminuye la osteoclastogénesis (89). Además, otro mecanismo por el cual los linfocitos T CD4⁺ activados pueden disminuir la calidad del hueso es al apoyar la polarización de los macrófagos u otras células inmunitarias hacia un perfil proinflamatorio, lo que aumenta la osteoclastogénesis y la resorción ósea, conduciendo al desarrollo de la osteopatía diabética (90); sin embargo, en nuestro modelo no observamos diferencias en las subpoblaciones de células de granulocitos o monocitos.

Aunque no observamos cambios en la activación de los linfocitos B de sangre periférica o de la médula ósea, estas células podrían tener un papel indirecto en la inflamación sistémica, las alteraciones metabólicas o la fragilidad ósea; ya que los linfocitos B en la DMT2 favorecen la polarización de los linfocitos T CD4⁺ hacia un perfil inflamatorio

Th17 y ayudan a mantener la secreción de citocinas inflamatorias por parte de los linfocitos CD4⁺ (91,92). Sería interesante estudiar su participación en el futuro.

No observamos cambios en la concentración de proteínas carboniladas en el hueso, lo que sugiere que el daño oxidativo no es un mecanismo importante que cause fragilidad ósea en nuestro modelo experimental, mientras que la inflamación mediada por células T CD4⁺ proinflamatorias activadas si parece serlo.

9. CONCLUSIONES

En conclusión, el aumento en la activación de los linfocitos T CD4⁺ de médula ósea induce daño en la microarquitectura y fragilidad ósea en la DMT2 al promover un microambiente proinflamatorio en el hueso a través de la producción de TNF - α y RANK-L y juega un papel importante en el desarrollo de la resistencia a la insulina y el establecimiento de hiperglucemia.

Los inhibidores de la activación de los linfocitos como CTLA4-Ig podrían representar una estrategia de tratamiento para contrarrestar el desarrollo de la osteopatía diabética, al reducir la inflamación del hueso, e incluso podrían restaurar la salud metabólica de los pacientes con DMT2.

10. PERSPECTIVAS

- Inhibir específicamente en médula ósea la activación de los linfocitos T CD4⁺ para determinar la participación de este tejido en las alteraciones metabólicas.
- Determinar el mecanismo que conduce a una mayor activación de linfocitos T CD4⁺ en médula ósea en la DMT2.
- Analizar el efecto de la inhibición de la activación de los linfocitos T en la vía de señalización de la insulina en tejidos dependientes de insulina.
- Investigar el papel de los linfocitos B en la activación de los linfocitos T en la médula ósea
- Investigar la seguridad del uso de CTLA4-Ig como tratamiento antidiabético.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Florencio-Silva R, Sasso GR da S, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *Biomed Res Int*. 2015;2015:421746. doi: 10.1155/2015/421746
2. Oldknow KJ, MacRae VE, Farquharson C. Endocrine role of bone: recent and emerging perspectives beyond osteocalcin. *J Endocrinol*. 2015;225(1):R1-19. doi: 10.1530/JOE-14-0584
3. Mosialou I, Shikhel S, Liu J-M, Maurizi A, Luo N, He Z, et al. MC4R-dependent suppression of appetite by bone-derived lipocalin 2. *Nature*. 2017;543(7645):385–90. doi: 10.1038/nature21697
4. Kenkre JS, Bassett J. The bone remodelling cycle. *Ann Clin Biochem*. 2018;55(3):308–27. doi: 10.1177/0004563218759371
5. Carvalho MS, Cabral JMS, da Silva CL, Vashishth D. Bone matrix non-collagenous proteins in tissue engineering: creating new bone by mimicking the extracellular matrix. *Polymers*. 2021;13(7). doi: 10.3390/polym13071095
6. Chapurlat RD, Confavreux CB. Novel biological markers of bone: from bone metabolism to bone physiology. *Rheumatology*. 2016;55(10):1714–25. doi: 10.1093/rheumatology/kev410
7. Eriksen EF. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord*. 2010;11(4):219–27. doi: 10.1007/s11154-010-9153-1
8. Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(4):549–53. doi: 10.1161/01.atv.0000012303.37971.da
9. Katsimbri P. The biology of normal bone remodelling. *Eur J Cancer Care*. 2017;26(6). doi: 10.1111/ecc.12740
10. Siddiqui JA, Partridge NC. Physiological bone remodeling: systemic regulation and growth factor involvement. *Physiology*. 2016;31(3):233–45. doi: 10.1152/physiol.00061.2014
11. Donath MY, Dinarello CA, Mandrup-Poulsen T. Targeting innate immune mediators

- in type 1 and type 2 diabetes. *Nat Rev Immunol*. 2019;19(12):734–46. doi: 10.1038/s41577-019-0213-9
12. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas*. 10th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2022.
 13. Czech MP. Mechanisms of insulin resistance related to white, beige, and brown adipocytes. *Mol Metab*. 2020;34:27–42. doi: 10.1016/j.molmet.2019.12.014
 14. Ceriello A, deValk HW, Guerci B, Haak T, Owens D, Canobbio M, et al. The burden of type 2 diabetes in Europe: Current and future aspects of insulin treatment from patient and healthcare spending perspectives. *Diabetes Res Clin Pract*. 2020;161:108053. doi: 10.1016/j.diabres.2020.108053
 15. Tommerdahl KL, Shapiro ALB, Nehus EJ, Bjornstad P. Early microvascular complications in type 1 and type 2 diabetes: recent developments and updates. *Pediatr Nephrol*. 2022;37(1):79–93. doi: 10.1007/s00467-021-05050-7
 16. Huang K, Luo X, Zhong Y, Deng L, Feng J. New insights into the role of melatonin in diabetic cardiomyopathy. *Pharmacol Res Perspect*. 2022;10(1):e00904. doi: 10.1002/prp2.904
 17. Farooqui KJ, Mithal A, Kerwen AK, Chandran M. Type 2 diabetes and bone fragility- An under-recognized association. *Diabetes Metab Syndr*. 2021;15(3):927–35. doi: 10.1016/j.dsx.2021.04.017
 18. Kuchay MS, Krishan S, Mishra SK, Farooqui KJ, Singh MK, Wasir JS, et al. Effect of empagliflozin on liver fat in patients with type 2 diabetes and nonalcoholic fatty liver disease: a randomized controlled trial (E-LIFT Trial). *Diabetes Care*. 2018;41(8):1801–8. doi: 10.2337/dc18-0165
 19. Sato T, Mito K, Ishii H. Relationship between impaired parasympathetic vasodilation and hyposalivation in parotid glands associated with type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2020;318(5):R940–9. doi: 10.1152/ajpregu.00016.2019
 20. Burhans MS, Hagman DK, Kuzma JN, Schmidt KA, Kratz M. Contribution of adipose tissue inflammation to the development of type 2 diabetes mellitus. *Compr Physiol*. 2018;9(1):1–58. doi: 10.1002/cphy.c170040

21. Engin A. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on preadipocytes and macrophages: hypoxia hypothesis. *Adv Exp Med Biol.* 2017;960:305–26. doi: 10.1007/978-3-319-48382-5_13
22. Kintscher U, Hartge M, Hess K, Foryst-Ludwig A, Clemenz M, Wabitsch M, et al. T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(7):1304–10. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.165100
23. Pandolfi JB, Ferraro AA, Sananez I, Gancedo MC, Baz P, Billordo LA, et al. ATP-induced inflammation drives tissue-resident Th17 cells in metabolically unhealthy obesity. *J Immunol.* 2016;196(8):3287–96. doi: 10.4049/jimmunol.1502506
24. Olson NC, Doyle MF, de Boer IH, Huber SA, Jenny NS, Kronmal RA, et al. Associations of circulating lymphocyte subpopulations with type 2 diabetes: cross-sectional results from the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA). *PLoS One.* 2015;10(10):e0139962. doi: 10.1371/journal.pone.0139962
25. Kojta I, Chacińska M, Błachnio-Zabielska A. Obesity, Bioactive lipids, and adipose tissue inflammation in insulin resistance. *Nutrients.* 2020;12(5). doi: 10.3390/nu12051305
26. Yaribeygi H, Farrokhi FR, Butler AE, Sahebkar A. Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms. *J Cell Physiol.* 2019;234(6):8152–61. doi: 10.1002/jcp.27603
27. Dalmas E, Lehmann FM, Dror E, Wueest S, Thienel C, Borsigova M, et al. Interleukin-33-activated islet-resident innate lymphoid cells promote insulin secretion through myeloid cell retinoic acid production. *Immunity.* 2017;47(5):928-942.e7. doi: 10.1016/j.immuni.2017.10.015
28. Dalmas E. Innate immune priming of insulin secretion. *Curr Opin Immunol.* 2019;56:44–9. doi: 10.1016/j.coi.2018.10.005
29. Ehses JA, Perren A, Eppler E, Ribaux P, Pospisilik JA, Maor-Cahn R, et al. Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2007;56(9):2356–70. doi: 10.2337/db06-1650

30. Richardson SJ, Willcox A, Bone AJ, Foulis AK, Morgan NG. Islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2009;52:1686–8. doi: 10.1007/s00125-009-1410-z
31. Zhang Y, Yu X-L, Zha J, Mao L-Z, Chai J-Q, Liu R-T. Therapeutic vaccine against IL-1 β improved glucose control in a mouse model of type 2 diabetes. *Life Sci*. 2018;192:68–74. doi: 10.1016/j.lfs.2017.11.021
32. Ambrosi TH, Scialdone A, Graja A, Gohlke S, Jank A-M, Bocian C, et al. Adipocyte accumulation in the bone marrow during obesity and aging impairs stem cell-based hematopoietic and bone regeneration. *Cell Stem Cell*. 2017;20(6):771-784.e6. doi: 10.1016/j.stem.2017.02.009
33. Yokota T, Meka CSR, Kouro T, Medina KL, Igarashi H, Takahashi M, et al. Adiponectin, a fat cell product, influences the earliest lymphocyte precursors in bone marrow cultures by activation of the cyclooxygenase-prostaglandin pathway in stromal cells. *J Immunol*. 2003;171(10):5091–9. doi: 10.4049/jimmunol.171.10.5091
34. Tencerova M, Figeac F, Ditzel N, Taipaleenmäki H, Nielsen TK, Kassem M. High-fat diet-induced obesity promotes expansion of bone marrow adipose tissue and impairs skeletal stem cell functions in mice. *J Bone Miner Res*. 2018;33(6):1154–65. doi: 10.1002/jbmr.3408
35. Bilwani FA, Knight KL. Adipocyte-derived soluble factor(s) inhibits early stages of B lymphopoiesis. *J Immunol*. 2012;189(9):4379–86. doi: 10.4049/jimmunol.1201176
36. Hirata Y, Furuhashi K, Ishii H, Li HW, Pinho S, Ding L, et al. CD150(high) Bone marrow Tregs maintain hematopoietic stem cell quiescence and immune privilege via adenosine. *Cell Stem Cell*. 2018;22(3):445-453.e5. doi: 10.1016/j.stem.2018.01.017
37. Omatsu Y, Sugiyama T, Kohara H, Kondoh G, Fujii N, Kohno K, et al. The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity*. 2010;33(3):387–99. doi: 10.1016/j.immuni.2010.08.017
38. Christodoulou C, Spencer JA, Yeh S-CA, Turcotte R, Kokkaliaris KD, Panero R, et al. Live-animal imaging of native haematopoietic stem and progenitor cells. *Nature*. 2020;578(7794):278–83. doi: 10.1038/s41586-020-1971-z

39. Fadini GP, Ferraro F, Quaini F, Asahara T, Madeddu P. Concise review: diabetes, the bone marrow niche, and impaired vascular regeneration. *Stem Cells Transl Med.* 2014;3(8):949–57. doi: 10.5966/sctm.2014-0052
40. Loomans CJ, van Haperen R, Duijs JM, Verseyden C, de Crom R, Leenen PJ, et al. Differentiation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells is shifted into a proinflammatory phenotype by hyperglycemia. *Mol Med.* 2009;15(5–6):152–9. doi: 10.2119/molmed.2009.00032
41. Cortet B, Lucas S, Legroux-Gerot I, Penel G, Chauveau C, Paccou J. Bone disorders associated with diabetes mellitus and its treatments. *Joint Bone Spine.* 2019;86(3):315–20. doi: 10.1016/j.jbspin.2018.08.002
42. Mokgalaboni K, Dlodla P V, Nyambuya TM, Yakobi SH, Mxinwa V, Nkambule BB. Monocyte-mediated inflammation and cardiovascular risk factors in type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis of pre-clinical and clinical studies. *JRSM Cardiovasc Dis.* 2020;9:2048004019900748. doi: 10.1177/2048004019900748
43. Huang Z, Pei X, Graves DT. The interrelationship between diabetes, IL-17 and bone loss. *Curr Osteoporos Rep.* 2020;18(1):23–31. doi: 10.1007/s11914-020-00559-6
44. Napoli N, Chandran M, Pierroz DD, Abrahamsen B, Schwartz A V, Ferrari SL. Mechanisms of diabetes mellitus-induced bone fragility. *Nat Rev Endocrinol.* 2017;13(4):208–19. doi: 10.1038/nrendo.2016.153
45. Hofbauer LC, Brueck CC, Singh SK, Dobnig H. Osteoporosis in patients with diabetes mellitus. *J bone Miner Res.* 2007;22(9):1317–28. doi: 10.1359/jbmr.070510
46. Eller-Vainicher C, Cairoli E, Grassi G, Grassi F, Catalano A, Merlotti D, et al. Pathophysiology and management of type 2 diabetes mellitus bone fragility. *J Diabetes Res.* 2020;2020:7608964. doi: 10.1155/2020/7608964
47. Hazra S, Jarajapu YPR, Stepps V, Caballero S, Thinschmidt JS, Sautina L, et al. Long-term type 1 diabetes influences haematopoietic stem cells by reducing vascular repair potential and increasing inflammatory monocyte generation in a murine model. *Diabetologia.* 2013;56(3):644–53. doi: 10.1007/s00125-012-2781-0
48. Shahen VA, Gerbaix M, Koeppenkastrop S, Lim SF, McFarlane KE, Nguyen ANL, et

- al. Multifactorial effects of hyperglycaemia, hyperinsulinemia and inflammation on bone remodelling in type 2 diabetes mellitus. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2020;55:109–18. doi: 10.1016/j.cytogfr.2020.04.001
49. García-Hernández A, Arzate H, Gil-Chavarría I, Rojo R, Moreno-Fierros L. High glucose concentrations alter the biomineralization process in human osteoblastic cells. *Bone.* 2012;50(1):276–88. doi: 10.1016/j.bone.2011.10.032
50. Esser N, Legrand-Poels S, Piette J, Scheen AJ, Paquot N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014;105(2):141–50. doi: 10.1016/j.diabres.2014.04.006
51. Laake J-PS, Stahl D, Amiel SA, Petrak F, Sherwood RA, Pickup JC, et al. The association between depressive symptoms and systemic inflammation in people with type 2 diabetes: findings from the South London Diabetes Study. *Diabetes Care.* 2014;37(8):2186–92. doi: 10.2337/dc13-2522
52. Di Rosa F, Pabst R. The bone marrow: a nest for migratory memory T cells. *Trends Immunol.* 2005 Jul;26(7):360–6. doi: 10.1016/j.it.2005.04.011
53. Cortez M, Carmo LS, Rogero MM, Borelli P, Fock RA. A high-fat diet increases IL-1, IL-6, and TNF- α production by increasing NF- κ B and attenuating PPAR- γ expression in bone marrow mesenchymal stem cells. *Inflammation.* 2013;36(2):379–86. doi: 10.1007/s10753-012-9557-z
54. da Silva SV, Renovato-Martins M, Ribeiro-Pereira C, Citelli M, Barja-Fidalgo C. Obesity modifies bone marrow microenvironment and directs bone marrow mesenchymal cells to adipogenesis. *Obesity.* 2016;24(12):2522–32. doi: 10.1002/oby.21660
55. Weitzmann MN. Bone and the immune system. *Toxicol Pathol.* 2017;45(7):911–24. doi: 10.1177/0192623317735316
56. Miyaura C, Onoe Y, Inada M, Maki K, Ikuta K, Ito M, et al. Increased B-lymphopoiesis by interleukin 7 induces bone loss in mice with intact ovarian function: similarity to estrogen deficiency. *Proc Natl Acad Sci.* 1997;94(17):9360–5. doi: 10.1073/pnas.94.17.9360
57. Grassi F, Tell G, Robbie-Ryan M, Gao Y, Terauchi M, Yang X, et al. Oxidative stress

- causes bone loss in estrogen-deficient mice through enhanced bone marrow dendritic cell activation. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104(38):15087–92. doi: 10.1073/pnas.0703610104
58. Yu T, Sungelo MJ, Goldberg IJ, Wang H, Eckel RH. Streptozotocin-treated high fat fed mice: a new type 2 diabetes model used to study canagliflozin-induced alterations in lipids and lipoproteins. *Horm Metab Res.* 2017;49(5):400–6. doi: 10.1055/s-0042-110934
 59. Ayala JE, Samuel VT, Morton GJ, Obici S, Croniger CM, Shulman GI, et al. Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. *Dis Model Mech.* 2010;3(9–10):525–34. doi: 10.1242/dmm.006239
 60. Li D, Jiang C, Mei G, Zhao Y, Chen L, Liu J, et al. Quercetin alleviates ferroptosis of pancreatic β cells in type 2 diabetes. *Nutrients.* 2020;12(10). doi: 10.3390/nu12102954
 61. Liu X, Quan N. Immune cell isolation from mouse femur bone marrow. *Bio-protocol.* 2015;5(20). doi: 10.21769/bioprotoc.1631
 62. Yang H-Y, Kwon J, Kook M-S, Kang SS, Kim SE, Sohn S, et al. Proteomic analysis of gingival tissue and alveolar bone during alveolar bone healing. *Mol Cell Proteomics.* 2013;12(10):2674–88. doi: 10.1074/mcp.M112.026740
 63. Bi X, Grafe I, Ding H, Flores R, Munivez E, Jiang MM, et al. Correlations between bone mechanical properties and bone composition parameters in mouse models of dominant and recessive osteogenesis imperfecta and the response to anti-TGF- β treatment. *J Bone Miner Res.* 2017;32(2):347–59. doi: 10.1002/jbmr.2997
 64. Donner DG, Elliott GE, Beck BR, Forwood MR, Du Toit EF. The effects of visceral obesity and androgens on bone: trenbolone protects against loss of femoral bone mineral density and structural strength in viscerally obese and testosterone-deficient male rats. *Osteoporos Int.* 2016;27(3):1073–82. doi: 10.1007/s00198-015-3345-1
 65. Fallon EM, Nazarian A, Nehra D, Pan AH, O’Loughlin AA, Nose V, et al. The effect of docosahexaenoic acid on bone microstructure in young mice and bone fracture in neonates. *J Surg Res.* 2014;191(1):148–55. doi: 10.1016/j.jss.2014.04.005

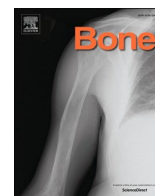
66. Doube M, Kłosowski MM, Arganda-Carreras I, Cordelières FP, Dougherty RP, Jackson JS, et al. BoneJ: Free and extensible bone image analysis in ImageJ. *Bone*. 2010;47(6):1076–9. doi: 10.1016/j.bone.2010.08.023
67. Jepsen KJ, Silva MJ, Vashishth D, Guo XE, van der Meulen MCH. Establishing biomechanical mechanisms in mouse models: practical guidelines for systematically evaluating phenotypic changes in the diaphyses of long bones. *J bone Miner Res*. 2015;30(6):951–66. doi: 10.1002/jbmr.2539
68. Rőszer T, Józsa T, Kiss-Tóth ED, De Clerck N, Balogh L. Leptin receptor deficient diabetic (db/db) mice are compromised in postnatal bone regeneration. *Cell Tissue Res*. 2014;356(1):195–206. doi: 10.1007/s00441-013-1768-6
69. Miao D, Scutt A. Histochemical localization of alkaline phosphatase activity in decalcified bone and cartilage. *J Histochem Cytochem*. 2002;50(3):333–40. doi: 10.1177/002215540205000305
70. Galicia-Garcia U, Benito-Vicente A, Jebari S, Larrea-Sebal A, Siddiqi H, Uribe KB, et al. Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. *Int J Mol Sci*. 2020;21(17). doi: 10.3390/ijms21176275
71. Zeng C, Shi X, Zhang B, Liu H, Zhang L, Ding W, et al. The imbalance of Th17/Th1/Tregs in patients with type 2 diabetes: relationship with metabolic factors and complications. *J Mol Med*. 2012;90(2):175–86. doi: 10.1007/s00109-011-0816-5
72. Platt AM, Gibson VB, Patakas A, Benson RA, Nadler SG, Brewer JM, et al. Abatacept limits breach of self-tolerance in a murine model of arthritis via effects on the generation of T follicular helper cells. *J Immunol*. 2010;185(3):1558–67. doi: 10.4049/jimmunol.1001311
73. Patakas A, Ji R-R, Weir W, Connolly SE, Benson RA, Nadler SG, et al. Abatacept inhibition of T cell priming in mice by induction of a unique transcriptional profile that reduces their ability to activate antigen-presenting cells. *Arthritis Rheumatol*. 2016;68(3):627–38. doi: 10.1002/art.39470
74. Boleto G, Guignabert C, Pezet S, Cauvet A, Sadoine J, Tu L, et al. T-cell costimulation blockade is effective in experimental digestive and lung tissue fibrosis. *Arthritis Res Ther*. 2018;20(1):197. doi: 10.1186/s13075-018-1694-9

75. Santopaolo M, Sullivan N, Thomas AC, Alvino VV, Nicholson LB, Gu Y, et al. Activation of bone marrow adaptive immunity in type 2 diabetes: rescue by co-stimulation modulator abatacept. *Front Immunol.* 2021;12:609406. doi: 10.3389/fimmu.2021.609406
76. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science.* 1996;271(5249):665–8. doi: 10.1126/science.271.5249.665
77. Jager J, Grémeaux T, Cormont M, Le Marchand-Brustel Y, Tanti J-F. Interleukin-1 β -induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology.* 2007;148(1):241–51. doi: 10.1210/en.2006-0692
78. Moraes-Vieira PM, Castoldi A, Aryal P, Wellenstein K, Peroni OD, Kahn BB. Antigen presentation and T-cell activation are critical for RBP4-induced insulin resistance. *Diabetes.* 2016;65(5):1317–27. doi: 10.2337/db15-1696
79. Santopaolo M, Sambataro M, Spinetti G, Madeddu P. Bone marrow as a target and accomplice of vascular complications in diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2020;36 Suppl 1:e3240. doi: 10.1002/dmrr.3240
80. Ojala R, Motiani KK, Ivaska KK, Arponen M, Eskelinen J-J, Virtanen KA, et al. Bone marrow metabolism is impaired in insulin resistance and improves after exercise training. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;105(12):e4290-303. doi: 10.1210/clinem/dgaa516
81. Rachid O, Osman A, Abdi R, Haik Y. CTLA4-Ig (abatacept): a promising investigational drug for use in type 1 diabetes. *Expert Opin Investig Drugs.* 2020;29(3):221–36. doi: 10.1080/13543784.2020.1727885
82. Liu M, Yu Y, Hu S. A review on applications of abatacept in systemic rheumatic diseases. *Int Immunopharmacol.* 2021;96:107612. doi: 10.1016/j.intimp.2021.107612
83. Pabst R, Nowara E. Organ distribution and fate of newly formed splenic lymphocytes in the pig. *Anat Rec.* 1982;202(1):85–94. doi: 10.1002/ar.1092020110
84. Pabst R, Pötschick K. Proliferation and emigration of newly formed lymphocytes from

pig spleens during an immune response. *Immunology*. 1983;50(2):281–8.

85. Ferraro F, Lymperi S, Méndez-Ferrer S, Saez B, Spencer JA, Yeap BY, et al. Diabetes impairs hematopoietic stem cell mobilization by altering niche function. *Sci Transl Med*. 2011;3(104):104ra101. doi: 10.1126/scitranslmed.3002191
86. Cortez-Espinosa N, Cortés-García JD, Martínez-Leija E, Rodríguez-Rivera JG, Barajas-López C, González-Amaro R, et al. CD39 expression on Treg and Th17 cells is associated with metabolic factors in patients with type 2 diabetes. *Hum Immunol*. 2015;76(9):622–30. doi: 10.1016/j.humimm.2015.09.007
87. Di Benedetto G, Lempereur L, Valle D, Greco EA, Bernardini R, Lenzi A, et al. Redundant modulatory effects of proinflammatory cytokines in human osteoblastic cells in vitro. *Clin Exp Rheumatol*. 2018;36(6):959–69.
88. Zhao C, Irie N, Takada Y, Shimoda K, Miyamoto T, Nishiwaki T, et al. Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell Metab*. 2006;4(2):111–21. doi: 10.1016/j.cmet.2006.05.012
89. Okada H, Kajiya H, Omata Y, Matsumoto T, Sato Y, Kobayashi T, et al. CTLA4-Ig directly inhibits osteoclastogenesis by interfering with intracellular calcium oscillations in bone marrow macrophages. *J Bone Miner Res*. 2019;34(9):1744–52. doi: 10.1002/jbmr.3754
90. An Y, Zhang H, Wang C, Jiao F, Xu H, Wang X, et al. Activation of ROS/MAPKs/NF- κ B/NLRP3 and inhibition of efferocytosis in osteoclast-mediated diabetic osteoporosis. *FASEB J*. 2019;33(11):12515–27. doi: 10.1096/fj.201802805RR
91. DeFuria J, Belkina AC, Jagannathan-Bogdan M, Snyder-Cappione J, Carr JD, Nersesova YR, et al. B cells promote inflammation in obesity and type 2 diabetes through regulation of T-cell function and an inflammatory cytokine profile. *Proc Natl Acad Sci*. 2013;110(13):5133–8. doi: 10.1073/pnas.1215840110
92. Winer DA, Winer S, Shen L, Wadia PP, Yantha J, Paltser G, et al. B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. *Nat Med*. 2011;17(5):610–7. doi: 10.1038/nm.2353

ANEXO 1: ARTÍCULO REQUISITO



CD4⁺ T-cell activation of bone marrow causes bone fragility and insulin resistance in type 2 diabetes

S.E. Cifuentes-Mendiola^{a,b}, D.L. Solis-Suarez^a, A. Martínez-Dávalos^c, M. Godínez-Victoria^d, A. L. García-Hernández^{a,*}

^a Laboratory of Dental Research, Section of Osteoimmunology and Oral Immunology, FES Iztacala, National Autonomous University of Mexico, A. Jiménez Gallardo SN, San Sebastián Xhala, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, CP 54714, Mexico

^b Postgraduate in Biological Sciences, National Autonomous University of Mexico, Mexico, Mexico

^c Physics Institute, National Autonomous University of Mexico, Circuito de la Investigación Científica, Ciudad Universitaria, 04510 México City, Mexico

^d Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Mexico, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Type 2 diabetes
Bone fragility
Activated T-cells
Bone marrow
Bone quality

ABSTRACT

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) causes an increased risk of bone fractures. However, the pathophysiology of diabetic bone fragility is not completely understood. It has been proposed that an inflammatory microenvironment in bone could be a major mechanism by inducing uncontrolled bone resorption, inadequate bone formation and consequently more porous bones. We propose that activated T-cells in the bone marrow cause a pro-inflammatory microenvironment in bone, and cause bone fragility in T2DM. We induced T2DM in C57BL/6 male mice through a hypercaloric diet rich in carbohydrates and low doses of streptozocin. In T2DM mice we inhibited systemic activation of T-cells with a fusion protein between the extracellular domain of Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 and the Fc domain of human immunoglobulin G (CTLA4-Ig). We analysed the effects of T2DM or CTLA4-Ig in lymphocyte cell subsets and antigen-presenting cells in peripheral blood and femoral bone marrow; and their effect on the metabolic phenotype, blood and bone cytokine concentration, femoral bone microarchitecture and biomechanical properties, and the number of osteoblast-like cells in the femoral endosteum. We performed a Pearson multiple correlation analysis between all variables in order to understand the global mechanism. Results demonstrated that CTLA4-Ig decreased the number of activated CD4⁺ T-cells in the femoral bone marrow and consequently decreased TNF- α and RANK-L concentration in bone, notably improved femoral bone microarchitecture and biomechanical properties, increased the number of osteoblast-like cells, and reduces osteoclastic activity compared to T2DM mice that did not receive the inhibitor. Interestingly, we observed that blood glucose levels and insulin resistance may be related to the increase in activated CD4⁺ T-cells in the bone marrow. We conclude that bone marrow activated CD4⁺ T-cells cause poor bone quality and insulin resistance in T2DM.

1. Introduction

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) causes bone complications such as osteopenia and potentially osteoporosis [1]. Patients with T2DM have an increased risk of bone fracture in the hip, wrist, foot and spine, despite having the same or higher bone density than healthy people [2]. Therefore, poor bone quality may be responsible for bone fragility in diabetes.

The pathophysiology of bone disease in T2DM is not completely understood; however, the development of a pro-inflammatory

microenvironment in bone could be a major mechanism. An increase in the concentration of interleukin (IL) 10 and pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-3, IL-6, and tumour necrosis factor α (TNF- α) has been observed in bone marrow microenvironment of mice with type 1 diabetes [3], and in bone marrow biopsy of patients with T2DM [4]. The increase of these cytokines reduces the differentiation of osteoblasts and the formation of mineral matrix, stimulates disordered bone resorption [3] and decreases the quality of hydroxyapatite crystals [5], leading to more porous and fragile bones.

The inflammatory microenvironment in diabetic bone could induce

* Corresponding author.

E-mail address: ana.garcia@unam.mx (A.L. García-Hernández).

<https://doi.org/10.1016/j.bone.2021.116292>

Received 21 October 2021; Received in revised form 2 December 2021; Accepted 3 December 2021

Available online 9 December 2021

8756-3282/Published by Elsevier Inc.

the migration of activated lymphocytes to bone marrow. It has been reported that T2DM patients have low-grade chronic inflammation [6,7], with an increase in activated Th1 and Th17 cells and a decrease in regulatory T cells (Tregs) in peripheral blood leading to poor resolution of systemic inflammation [8]. This is an interesting condition because activated lymphocytes can migrate to the bone marrow through the chemotactic gradient of stromal cell-derived factor 1 (SDF 1), which is overexpressed in the stroma of bone marrow in T2DM [4,9].

Furthermore, in experimental models of obesity and chronic hyperglycemia, a loss of immunosuppression has been observed in bone marrow stroma [4,10], along with increased secretion of receptor activator of NF- κ B ligand (RANK-L) and TNF- α stimulated by activated lymphocytes [11]. Therefore, it is possible that activated lymphocytes that migrate to the bone marrow maintain their effector capacity, impairing bone remodeling homeostasis.

In fact, in experimental models of non-diabetic osteoporosis it has been shown that activated T- and B-cells in bone marrow secrete TNF- α and RANK-L, causing an increase in bone resorption and bone fragility [12–14]. Furthermore, the inhibition of T-cell activation with the fusion protein between the extracellular domain of Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 and the Fc domain of human immunoglobulin G (CTLA4-Ig; Abatacept) decreases TNF- α production in bone marrow T-cells, decreases bone resorption and increases bone mineral density in mice with osteoporosis [14]. However, as far as we know, the participation of activated lymphocytes in the development of bone disease in T2DM has not been studied.

These findings suggest that activated inflammatory lymphocytes in T2DM can migrate to bone marrow and secrete pro-inflammatory cytokines causing poor bone quality. In this work we focus on determining whether the inhibition of T-cell activation in bone marrow improves bone quality in mice with T2DM.

2. Material and methods

2.1. Animals

We used 4-week-old male C57BL/6 mice acquired from the Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional (IPN, México). The mice were kept in a 12-h light/dark cycle with free access to water and food. All experiments with mice were carried out under the recommendations of the Official Mexican Standard NOM-062-ZOO-1999 and in accordance with the standards of the Ethics Committee of the FESI, UNAM CE/FESI/092021/1415. The mice were randomly divided into four experimental groups: control, T2DM, T2DM/CTLA4-Ig, and T2DM/h-IgG. To ensure sufficient statistical power in each experiment, there were at least 6 animals in each group (exact numbers for each experiment are indicated in figure legends). At 24 weeks of age, we euthanized mice by anesthesia overdose, and obtained peripheral blood, serum, femurs, tibiae, and visceral adipose tissue.

2.2. Type 2 diabetes induction

We induced T2DM through a hypercaloric diet rich in carbohydrates (3.3 kcal/g, 55.5% carbohydrates, 28% fat, 17.4% protein; supplementary table 1) that was maintained throughout the experiment. We induced an insulin secretion deficiency at 10 weeks of age by intraperitoneal administration of low doses of streptozocin (SZC, Sigma-Aldrich #S0130) for 7 days (50 mg/kg weight on day 1 and 25 mg/kg weight days 2–7;) [15]. We considered mice diabetic when they had a blood glucose concentration above 250 mg/dL [15]. We measured body weight and food consumption daily, and weekly we measured the height and abdominal circumference.

We quantified blood glucose levels with an Accu-Check glucometer (OneTouch Select Plus) every 15 days during a 6-h morning fast (8:00 am–2:00 pm) [16]. The development of insulin resistance was

determined by glucose tolerance and insulin sensitivity tests at 23–24 weeks of age with 5 days between them. For both tests, the mice were kept in a 6-h morning fast (8:00 am–2:00 pm). The glucose tolerance test (ip-GTT) was conducted by administering an intraperitoneal shot of D-glucose (1 g/kg of body weight; Macron fine chemicals, #491212) and quantifying blood glucose levels every 15 min for 90 min. For the insulin sensitivity test (ip-ITT), we administered an intraperitoneal shot of aspart insulin (Novo Nordisk México, S.A. de C.V.) (0.5 U/kg body weight) and measured blood glucose levels every 15 min for 90 min.

The serum insulin concentration was quantified at the time of sacrifice using the “Mouse insulin ELISA kit” (ThermoScientific, #EMINS), and we calculated the homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) as the blood glucose level multiplied by serum insulin level divided by 22.5 [17].

2.3. Inhibition of T-cell activation

T-cell activation was inhibited with CTLA4-Ig fusion protein (Abatacept, Ohrencia, Bristol Myers) in the T2DM/CTLA4-Ig group. CTLA4-Ig binds to costimulatory molecules in antigen-presenting cells causing lymphocyte anergy. We used human IgG (h-IgG; Sigma, #I4506) as an isotype control in the T2DM/h-IgG group because CTLA4-Ig contains the Fc fraction of a human immunoglobulin G. CTLA4-Ig and h-IgG were resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) 1 \times and we administered both treatments intraperitoneally at a dose of 500 μ g/50 μ L per mouse at 18 weeks of age, three times per week until the sacrifice [14].

2.4. Serum cytokine profile determination

We quantified the serum concentrations of IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17A, and IL-10 at 24 weeks of age with a “BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit” (BD Biosciences, #560485) according to the manufacturer's instructions in a FACSria III (BD) flow cytometer.

2.5. Evaluation of lymphocytes and antigen-presenting cell populations

For the analysis of lymphocyte populations, we obtained leukocytes of peripheral blood and bone marrow explants in the left femur [18]. The leukocytes obtained from bone marrow and peripheral blood were stained with antibodies coupled to fluorochromes to identify T-cell subsets (CD3-PE (Ebioscience, #12-0031-83); CD4-FITC (Biolegend, #100406); and CD8-PerCP (Biolegend, #140418), B-cells (CD19-APC; Biolegend, #115512), and used CD69-PE/Dazzle 594 (Biolegend, #104536) as an activation marker. For antigen-presenting cells we used the CD11b-APCCy7 (Biolegend, #101226) and MHCII-PerCP (Biolegend, #107612) antibodies, and for eosinophil cells we used CD170-PE.

To evaluate the production of TNF- α and IL-17, and FoxP3 expression in CD4⁺ T-cells, we cultured the cells in DMEM-HG (Sigma-Aldrich, #D1152) supplemented with 10% FBS at 37 °C in an atmosphere with 5% CO₂ for 4 h. We inhibited vesicular transit with brefeldin (3 μ g/mL; Sigma-Aldrich, #B7651) and induced lymphocyte activation with PMA (50 ng/mL; Sigma-Aldrich, #P1585) and ionomycin (500 ng/mL; Sigma-Aldrich, #I0634). We performed surface staining with CD3-FITC and CD4-PE antibodies. Immediately, we performed membrane permeabilization with permeabilization buffer (0.1% saponin, 0.1% sodium azide and 1% FBS in PBS 1 \times , pH 7.2), followed by intracellular staining with the following antibodies: FoxP3-PerCP (BD-biosciences, #563902), IL17-PerCP (Biolegend, #506944), and TNF- α -PE/Dazzle 594 (Biolegend, #506346).

All cells were fixed with 1% PFA in PBS 1 \times and we captured 50,000 events in a FACSria III (BD) flow cytometer, with FACSDiva software. Data analysis was performed using FlowJo software v.10.6.2. The gating strategy is shown in Supplementary Fig. 1.

2.6. Quantification of bone TNF- α , RANK-L, IL-17, and carbonylated protein concentrations

We pulverized the entire left tibia (bone marrow and bone) without the cartilage in liquid nitrogen and the proteins were extracted with 6 M guanidine-chloride in 100 mM Tris buffer [19]. Then the extracted proteins were precipitated with acetone and rehydrated in a RIPA buffer and frozen at -80°C until use. We quantified protein concentration using the Pierce BCA method (Thermo Scientific, #23225), and we determined TNF- α concentration using the “Murine TNF- α Standard TMB ELISA Development Kit” (Peprotech, #900-T54), the RANK-L concentration using the “Murine sRANK ligand Mini ABTS ELISA Development Kit” (Peprotech, #900-M233), the IL-17 concentration using the “Murine IL-17A Standard ABTS ELISA Development Kit” (Peprotech, #900-K392), and the carbonylated proteins using the “Protein carbonyl content assay kit” (Sigma-Aldrich, #MAK094) according to the manufacturer instructions.

2.7. Bone morphometric and densitometric analysis

Once the right femur was obtained, we froze it in PBS at -20°C until use [20–22]. To determine bone microarchitecture we performed a computerized microtomography (μCT) analysis as described by Fallon et al. [20]. The X-ray microtomography images were obtained with a benchtop μCT build at the Instituto de Física, UNAM at a resolution of $34\ \mu\text{m}/\text{pixel}$. The system is based on an Oxford Instruments Apogee XTG5011 tungsten anode X-ray tube that has a nominal focal spot size of $35\ \mu\text{m}$, coupled to a Rad-Icon Shad-o-Box 2048 flat-panel detector (Teledyne DALSA Inc.). Projection images were acquired at 50 kVp, 1 mA with an integration time of 500 ms per frame, 360-degree orbit in 1-degree steps. The images were corrected for flat-field non-uniformities, dead-pixels, and dark noise. Tomographic reconstruction was performed using the Feldkamp-Davis-Kress algorithm and a Hamming filter with 0.7 cut-off frequency using an in-house developed program written in MATLAB Release 2020a (The MathWorks, Inc.). All further processing and 3D visualization were performed using the open-source programs ImageJ and OsiriX. *trans*-Axial images were taken of the total femur (± 450 slices). The images were analysed in the BoneJ plugin of the ImageJ software as previously reported [23]. The segmentation procedure was consistent among all scans per bone type: global thresholds (and a Gaussian filter to suppress image noise, $\sigma = 0.3$). For the analysis, we divided the anatomical fractions of the femur into distal epiphysis (70 slices), distal metaphysis (35 slices), and diaphysis (210 slices), using an ROI manager (Supplementary Fig. 2). Bone volume fraction (BV/TV), trabecular separation (Tb. Sp), trabecular thickness (Tb. Th), trabecular number (Tb. N), density of connectivity ($1/\text{mm}^3$), and structure model index (SMI) were analysed in the epiphysis and distal metaphysis. Cortical bone area (B. area) and cortical thickness (Ct. Th) were analysed in the diaphysis.

2.8. Bone biomechanical properties

After μCT analysis, a three-point bending device was used. This test system is a low-cost version, supplied and manufactured by the Bioelectronics Department of the Center for Research and Advanced Studies (CINVESTAV)-IPN, Mexico. This device comes with Arduino sensors to measure and record the load force and a torque system to control the velocity and pressure with a wireless network. The tip applied a downward force in the middle of the bone sample, and the crank pressed slowly at a rate of $1.74\ \text{mm}/\text{min}$ until it reached the fracture point. A graphical interface of MATLAB 2020a MathWorks® contains and outputs the variables of the biomechanics of bones as load (Newtons, N), total displacement (mm), force/displacement (N/mm), post-yield energy to failure (mJ), fracture point (N), maximum load (N), yield point (N) defined using a $0.015\ \text{mm}$ offset parallel to the stiffness, elastic modulus (MPa), yield stress (MPa), and ultimate stress (MPa), according

to previous reports [24]. We calculated the minimum moment of inertia (Imin), and the perpendicular distance from the centre of the femur to the periosteum (c) in the slides of the mid-diaphysis (20 slices) obtained from μCT with the BoneJ plugin.

2.9. Histological analysis

The right tibia was fixed with 4% PFA and decalcified with a 10% EDTA solution for 3 weeks at 37°C , and then dehydrated, clarified in xylol and embedded in paraffin [25]. We obtained longitudinal histological sections ($5\ \mu\text{m}$) in a microtome. To analyze osteoblast cell populations, endosteal ALP⁺ cells were identified by histochemistry according to the method reported by Miao and Scutt [26]. To analyze osteoclast cell populations, we identified tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) cells by immunohistochemistry using a primary anti-TRAP antibody (1:100) (Santa Cruz biotechnology #sc28204), and a goat anti-rabbit IgG (H + L) secondary antibody HRP (1:500) (Invitrogen #31460). The immunoreactivity was evidenced by the DAB substrate (Roche #11718096001). In both cases, micrographs of the epiphysis and metaphysis of the tibia were taken at a magnification of $40\times$ in an inverted microscope (Zeiss AX100, Germany), and all cells were quantified in the visible field with ImageJ software.

2.10. Statistical analysis

The data distribution was analysed by Dágotino-Pearson analysis. The significant differences between the experimental groups were determined by analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post-hoc, using GraphPad Prism 9 software. Differences were considered statistically significant if $p \leq 0.05$. To analyze the association between CD4⁺ T-cell activation of peripheral blood and bone marrow with metabolic, immune parameters, and bone quality, we normalized the data with the mean of each variable. With normalized mean values of each parameter, we constructed a heat map and calculated correlation coefficients by Pearson's multiple correlation analysis in GraphPad Prism 9 software. Statistical significance was considered with a $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. T-cell activation participates in T2DM development

To monitor the development of T2DM, we analysed somatometric parameters, blood glucose levels, serum insulin, and insulin resistance. The T2DM, T2DM/CTLA4-Ig and T2DM/h-IgG mouse groups showed central obesity by an time-dependent increment in weight, abdominal circumference and a high percentage of visceral adipose tissue compared to healthy mice (Supplementary Fig. 3). The T2DM and T2DM/h-IgG groups developed hyperglycemia ($\geq 350\ \text{mg}/\text{dL}$) (Fig. 1a), glucose intolerance (Fig. 1b and supplementary Fig. 3), lower insulin sensitivity (Fig. 1c and supplementary Fig. 3), lower serum insulin concentration (Fig. 1d) and an increase in the HOMA-IR index (Fig. 1e), compared to healthy mice at 24-weeks of age, indicating the establishment of T2DM. Contrary to this, CTLA4-Ig administration decreased blood glucose levels ($\leq 200\ \text{mg}/\text{dL}$) (Fig. 1a), improved sensitivity to insulin (Fig. 1c and supplementary Fig. 3) and reduced the HOMA-IR index (Fig. 1e) in diabetic mice.

3.2. T-cell activation is responsible for systemic inflammation in T2DM mice

We determined serum Th1, Th2, and Th17 cytokine concentrations at 24-weeks of age. The T2DM group showed a significant increase in the concentration of TNF- α and IL-6 and a decrease in IL-10 compared to healthy mice (Fig. 1f–h). In contrast, the administration of CTLA4-Ig reduced the concentration of TNF- α and IL-6, and increased the concentration of IL-10 compared with the mice in the T2DM and T2DM/h-

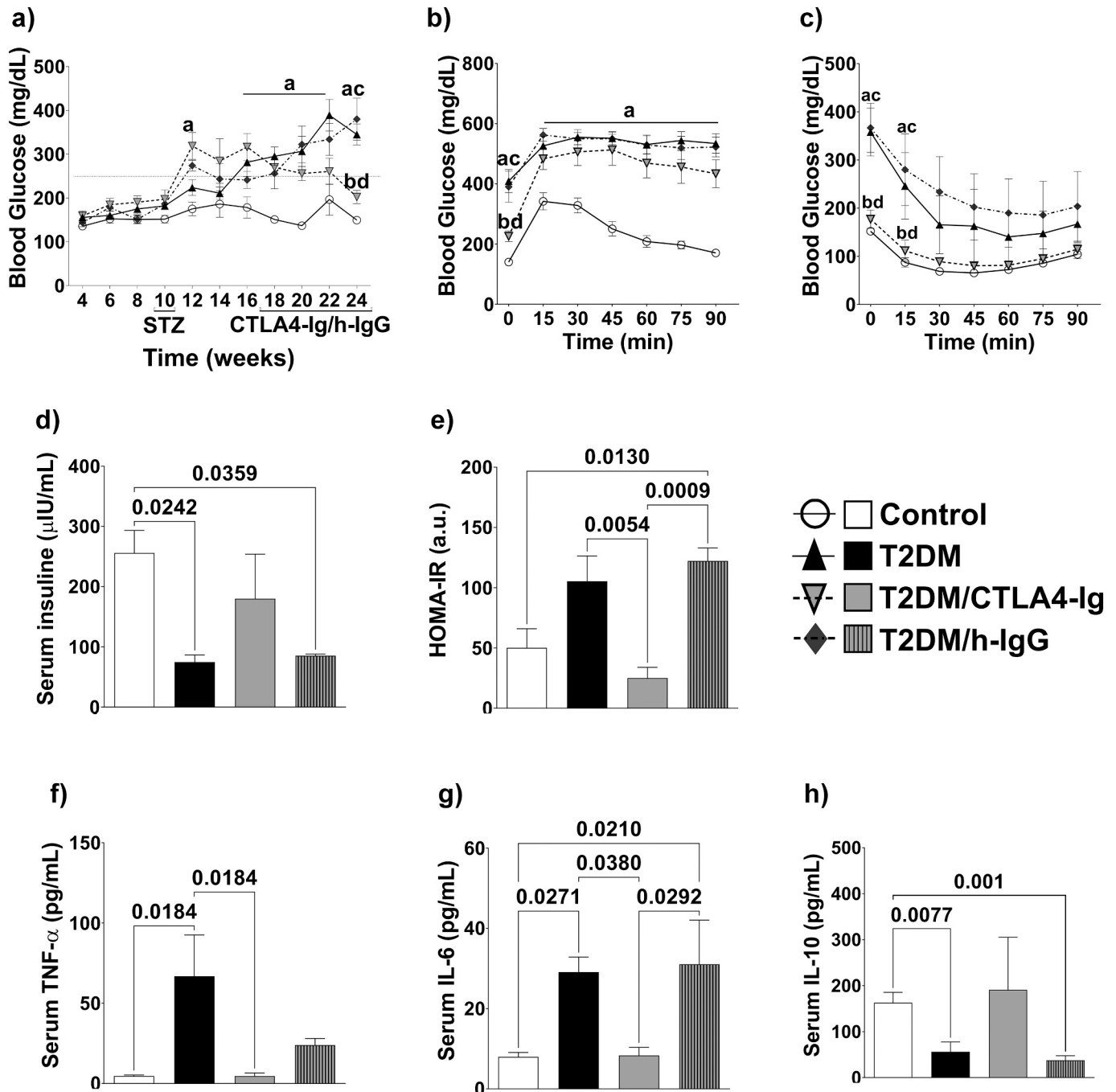


Fig. 1. Activated T lymphocytes participate in the development of hyperglycemia, insulin resistance, and systemic inflammation. In C57BL/6 male mice we induced T2DM by a hypercaloric diet and low doses of streptozotocin. We analysed the metabolic phenotype and cytokine profile in the different experimental groups: (a) Blood glucose concentration $n = 10$ per group. (b) Glucose tolerance test (ip-GTT) at 24 weeks of age $n = 10$ per group. (c) Insulin tolerance test (ip-ITT) at 24 weeks of age $n = 10$. (d) Serum insulin concentration at 24 weeks of age $n = 6$ per group. (e) Insulin resistance index (HOMA-IR) at 24 weeks of age $n = 6$ per group. (f, g and h) Serum cytokine levels at 24 weeks of age $n = 6$ per group. Graphs show the mean \pm SEM. ^a $p \leq 0.05$ vs. control, ^b $p \leq 0.05$ vs. T2DM, ^c $p \leq 0.05$ vs. T2DM/CTLA4-Ig and ^d $p \leq 0.05$ vs. T2DM/h-IgG. The bracket indicates p value.

IgG groups (Fig. 1f-h). There was no significant difference in the concentrations of IL-2, INF- γ , IL-17A, and IL-4 (data not shown).

3.3. T2DM increases CD4⁺ and CD8⁺ T-cell activation in peripheral blood

To determine the subsets of cells that could be promoting systemic inflammation and to understand the alterations in lymphocyte cell populations and antigen-presenting cells at the systemic level we

performed a flow cytometry analysis of peripheral blood at 24-weeks of age.

We observed that the T2DM group had the same percentage of CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ T-cells and CD19⁺ B-cell populations as the control group (Supplementary Fig. 4a). However, there was an increase in the expression of the activation marker CD69 in CD4⁺ and CD8⁺ T-cells (Fig. 2a). There were no significant differences in the percentage of the CD4⁺ cell subset that secretes TNF- α , i.e. the Th17 cell subset, but there was a decrease in the FoxP3 cell subset compared to control mice

Peripheral blood

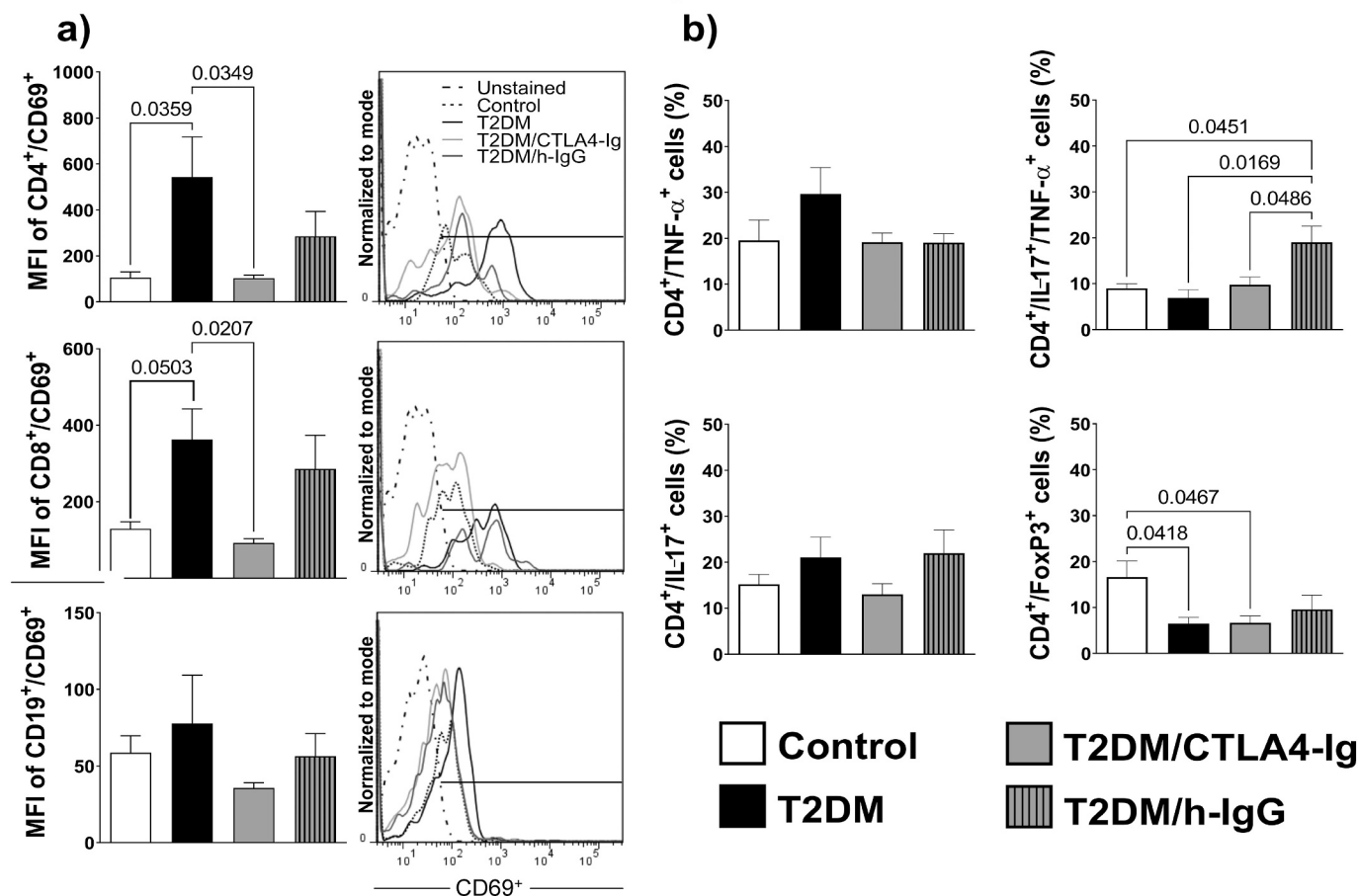


Fig. 2. T2DM induces CD4⁺ and CD8⁺ T-cell activation in peripheral blood. At 24-weeks of age, we obtained leukocytes from peripheral blood, and we performed an analysis of lymphocyte cell populations by flow cytometry. (a) Mean fluorescence intensity (MFI) of CD69 activation markers in T and B cells. (b) Th17 and Tregs cells subsets. Graphs show the mean \pm SEM. The bracket indicates *p* value. All experiments have *n* = 6 per group.

(Fig. 2b).

CTLA4-Ig administration in diabetic mice reduced the number of CD8⁺ T-cells (Supplementary Fig. 4a) and decreased the expression of CD69 in CD4⁺ and CD8⁺ T-cells (Fig. 2a). The isotype control behaved like the T2DM group, showing an increase in the activation of CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets, but with a significant increase in the percentage of Th17 cells compared to the other groups (Fig. 2 and Supplementary Fig. 4). We found no significant differences in antigen-presenting cells between four groups (Supplementary Fig. 5b and c).

3.4. T2DM increases the activation of inflammatory CD4⁺ T-cells and decreases the Tregs cell subset in bone marrow

To identify the possible participation of lymphocytes in the generation of a pro-inflammatory microenvironment in bone and the development of diabetic osteopathy, we analysed the presence of activated lymphocytes and antigen-presenting cells in bone marrow at 24-weeks of age.

The T2DM group showed an increase in CD4⁺ T-cells compared to the control group (Supplementary Fig. 4b). T2DM mice also showed higher expression of CD69 only in CD4⁺ T-cells (Fig. 3a), an increase in the TNF- α -secreting Th17 cell subset and a decrease in the FoxP3 cell subset compared to the healthy mice (Fig. 3b). We observed an increase in MHC-II expression in CD11b monocytes and CD11b granulocytes (Supplementary Fig. 5d).

The mice in the T2DM/CTLA4-Ig group showed a reduction in the CD4⁺ cell population (Supplementary Fig. 4b), a decrease in the

expression of CD69 in CD4⁺ T-cells (Fig. 3a), a decrease in the TNF- α -secreting Th17 cell subset, and an increase in the FoxP3 cell subset compared to the T2DM group (Fig. 3b). CTLA4-Ig reduced MHC-II expression in CD11b monocytes (Supplementary Fig. 5f). The isotype control behaved similarly to diabetic mice without the inhibitor (Fig. 3 and Supplementary Fig. 5).

3.5. T-cell activation induces RANK-L and TNF- α increase in diabetic bone

To determine whether T-cell activation caused by T2DM induces an inflammatory microenvironment and oxidative protein damage in bone, we quantified the concentration of TNF- α , RANK-L, IL-17, and carbonylated proteins in the protein extract of tibia at 24-weeks of age.

Mice in the T2DM group showed a significant increase in TNF- α and RANK-L compared to healthy mice, while mice in the T2DM/CTLA4-Ig group showed a reduction in the levels of both cytokines compared to diabetic mice without the inhibitor (Fig. 4). No differences were observed in the concentrations of IL-17 and carbonylated proteins between the four groups.

3.6. CD4 T-cell activation induces poor bone quality in T2DM

Having observed that the diabetic mice treated with CTLA4-Ig had reduced populations of activated CD4⁺ T-cells and concentrations of TNF- α and RANK-L in the bone, we analysed the bone microarchitecture by μ CT and bone biomechanical properties in the femurs of the mice at

Bone marrow

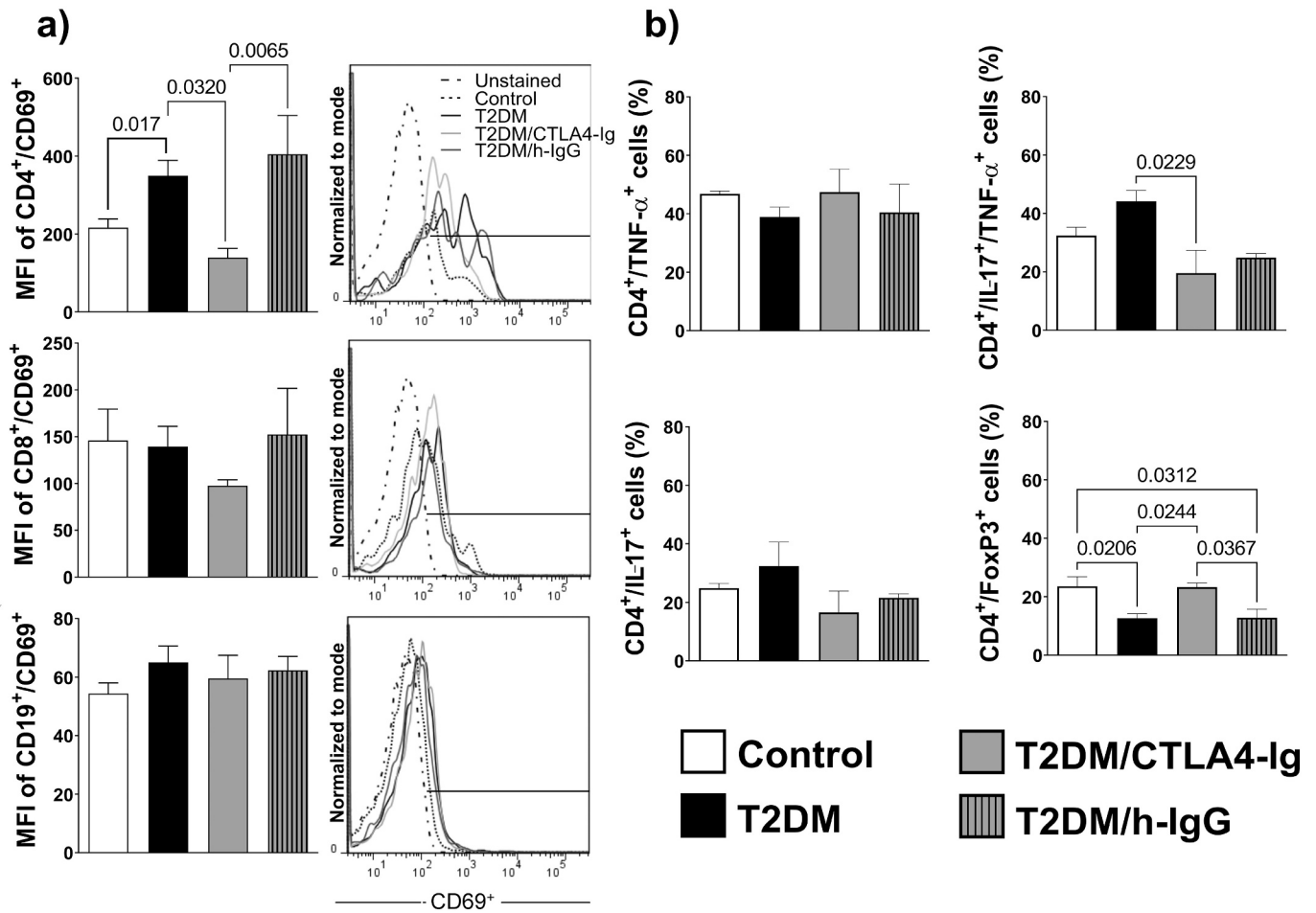


Fig. 3. T2DM induces T CD4-cell activation, increases Th17/TNF- α ⁺ cells, and reduces Tregs cells in bone marrow. At 24-weeks of age, we obtained leukocytes from femoral bone marrow explant, and we performed an analysis of lymphocyte cell populations by flow cytometry. (a) Mean fluorescence intensity (MFI) of CD69 activation markers in T and B cells. (b) Th17 and Tregs cell subsets. Graphs show the mean \pm SEM. The bracket indicates *p* value. All experiments have *n* = 6 per group.

24-weeks of age.

Mice in the T2DM group showed a more porous trabecular bone with a decrease in bone volume (BV/TV), and an increase in trabecular separation (Th. Sp) in distal epiphysis and metaphysis; additionally, T2DM mice had a decrease in bone surface area in the epiphysis and a lower connectivity density in the metaphysis (Fig. 5a, c, d, and Supplementary Table 2). They also showed a significant decrease in diaphysis cortical thickness with a high bone marrow area (Fig. 5a, b, and Supplementary Table 2), which indicates less dense bones compared to healthy mice. Additionally, mice in the T2DM group showed a decrease in bone fracture resistance, namely, ultimate stress, elastic modulus, yield stress (Fig. 5e), stiffness, maximum load, and work to fracture (Supplementary Table 2), indicating an increase in bone fragility compared to mice in the control group.

Mice in the T2DM/CTLA4-Ig group showed a more complex trabecular network with less porous trabecular bone evidenced by an increase in bone volume, and a decrease in trabecular separation in distal epiphysis and metaphysis with an increase in bone surface in the epiphysis and a higher connectivity density in the metaphysis compared to mice in the T2DM group (Fig. 5a, c, d, and Supplementary Fig. 2). The mice in this group had thicker cortical bone in the diaphysis and a decrease in bone marrow area (Fig. 5a and b), which indicates a higher bone density compared to untreated diabetic mice. Furthermore, inhibition of T-cell activation increased the ultimate stress, yield stress

(Fig. 5e), yield load, maximum load, post-yield displacement, and work to fracture (Supplementary Table 2), indicating that T-cell activation alters bone biomechanical properties and causes bone fragility in T2DM mice. The T2DM/h-IgG group showed a similar behavior to the T2DM group in bone structural and biomechanical parameters (Fig. 5a–e, and Supplementary Table 2).

3.7. Activation of T-cells decreases the number of osteoblasts and increases osteoclasts in diabetic bone

To determine the mechanism by which T-cell activation leads to alterations in bone microarchitecture and biomechanical properties, we analysed the number of cells positive for alkaline phosphatase and the number of cells positive for TRAP in the endosteum at 24-weeks of age, which indicates bone remodeling by osteoblast and osteoclast activity.

We observed that the T2DM group had fewer ALP⁺ cells (osteoblast) with an increase of TRAP⁺ cells (osteoclasts) than healthy mice. In contrast, the T2DM/CTLA4-Ig group showed an increase in ALP⁺ cells and a decrease in the number of osteoclasts TRAP⁺ compared to the T2DM group. The isotype control behaved like diabetic mice without the inhibitor (Fig. 6).

Bone

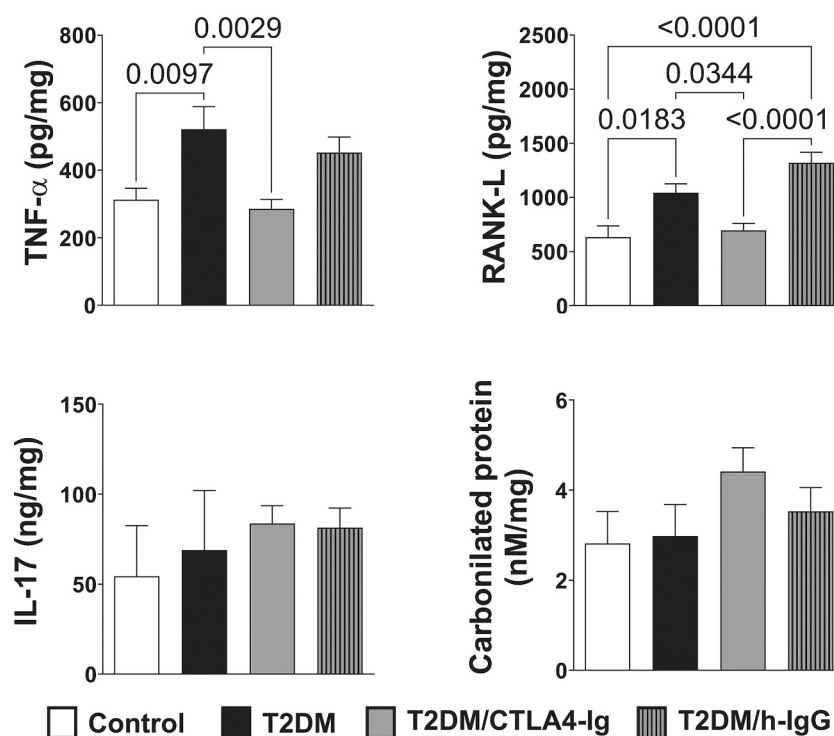


Fig. 4. T-cell activation by T2DM induces a higher concentration of TNF- α and RANK-L in bone. Results of TNF- α ($n = 10$ per group), RANK-L ($n = 8$ per group), IL-17 ($n = 6$ per group), and carbonilated protein ($n = 5$ per group) quantification in tibiae protein extracts measured by ELISA or colorimetry tests. Graphs show the mean \pm SEM. The bracket indicates P value.

3.8. The increase in activated CD4⁺ T-cells in bone marrow leads to a proinflammatory bone microenvironment, poor bone quality and insulin resistance in T2DM

Having observed that T-cell activation increases insulin resistance and systemic and local inflammation, and reduces bone quality, we decided to perform a heat map with all analysed variables to visualize the footprint of the experimental groups. We observed that T2DM had a different footprint compared to the control group in metabolic (Fig. 7a) and immune (Fig. 7b, d, and e) parameters and in bone structural and biomechanical characteristics (Fig. 7f). These characteristics are caused by T-cell activation because T2DM/CTLA4-Ig had a similar footprint to the control group, indicating that T-cell activation causes metabolic, immune and bone injury in T2DM mice. It is important to note that the isotype group had a similar footprint to the T2DM group, indicating that the inhibition of T-cell activation is responsible for the effects in the T2DM/CTLA4-Ig group.

We performed multiple Pearson correlation analysis with mean values of every experimental group to determine the population of T-cells that participate in the alterations observed in the T2DM group (Supplementary Fig. 6). The results showed that activated CD4⁺ T-cells in the peripheral blood were negatively correlated with distal epiphysis BV/TV ($r = -0.96$, $p = 0.04$), and positively correlated with bone TNF- α concentration ($r = 0.958$, $p = 0.042$), and BM CD4⁺ cell populations ($r = 0.973$, $p = 0.027$). Activated CD8⁺ T-cells in the peripheral blood were positively correlated with activated CD4⁺ T-cells in the peripheral blood ($r = 0.954$, $p = 0.046$), bone marrow CD4⁺ cells ($r = 0.997$, $p = 0.003$), bone TNF- α concentration ($r = 0.9999$, $p = 0.0001$), and distal epiphysis trabecular separation ($r = 0.976$, $p = 0.024$); and negatively correlated with bone marrow CD8⁺ cells ($r = -0.996$, $p = 0.004$), the bone marrow FoxP3 cell subset ($r = -0.963$, $p = 0.037$), bone marrow CD4⁺/TNF- α

($r = -0.993$, $p = 0.007$).

Additionally, we observed a negative correlation between activated CD4⁺ T-cells in bone marrow with serum IL-10 ($r = -0.99$, $p = 0.01$), bone marrow CD19⁺ cells ($r = -0.98$, $p = 0.02$), distal metaphysis bone surface ($r = -0.993$, $p = 0.007$), trabecular thickness ($r = -0.98$, $p = 0.02$), trabecular number ($r = -0.967$, $p = 0.033$), cortical thickness ($r = -0.988$, $p = 0.012$), work to fracture ($r = -0.98$, $p = 0.02$) (Supplementary Fig. 6) and ultimate stress ($r = -0.957$, $p = 0.043$) (Fig. 7a), and a positive correlation with HOMA-IR ($r = 0.999$, $p = 0.001$) (Fig. 7j), serum IL-6 ($r = 0.954$, $p = 0.003$), peripheral blood Th17 subset ($r = 0.993$, $p = 0.007$), distal epiphysis trabecular separation ($r = 0.957$, $p = 0.043$), distal metaphyseal trabecular separation ($r = 0.95$, $p = 0.05$), and bone marrow area ($r = 0.969$, $p = 0.031$). Bone TNF- α was negatively correlated with distal epiphysis trabecular separation ($r = -0.989$, $p = 0.024$) (Fig. 7h), and trabecular separation was negatively correlated with the number of endosteal ALP⁺ cells ($r = -0.989$, $p = 0.011$) (Fig. 7i).

4. Discussion

In this study, we found for the first time that activated CD4⁺ T-cells in the bone marrow in T2DM induce poor bone quality that is correlated with systemic inflammation and insulin resistance.

Our model had the main clinical characteristics of T2DM [27], such as central obesity, insulin resistance, hyperglycemia, decreased serum insulin concentrations, and systemic inflammation. Furthermore, we found an increase in activated CD4⁺ and CD8⁺ T-cells in the blood that is consistent with those observed in patients with T2DM [8,28]. h-IgG administration to diabetic mice caused an increase in Th17/TNF- α cell subset, contrary to that reported in other studies where h-IgG has no immunological effects in mice [29,30,31]. However, the effects of h-IgG

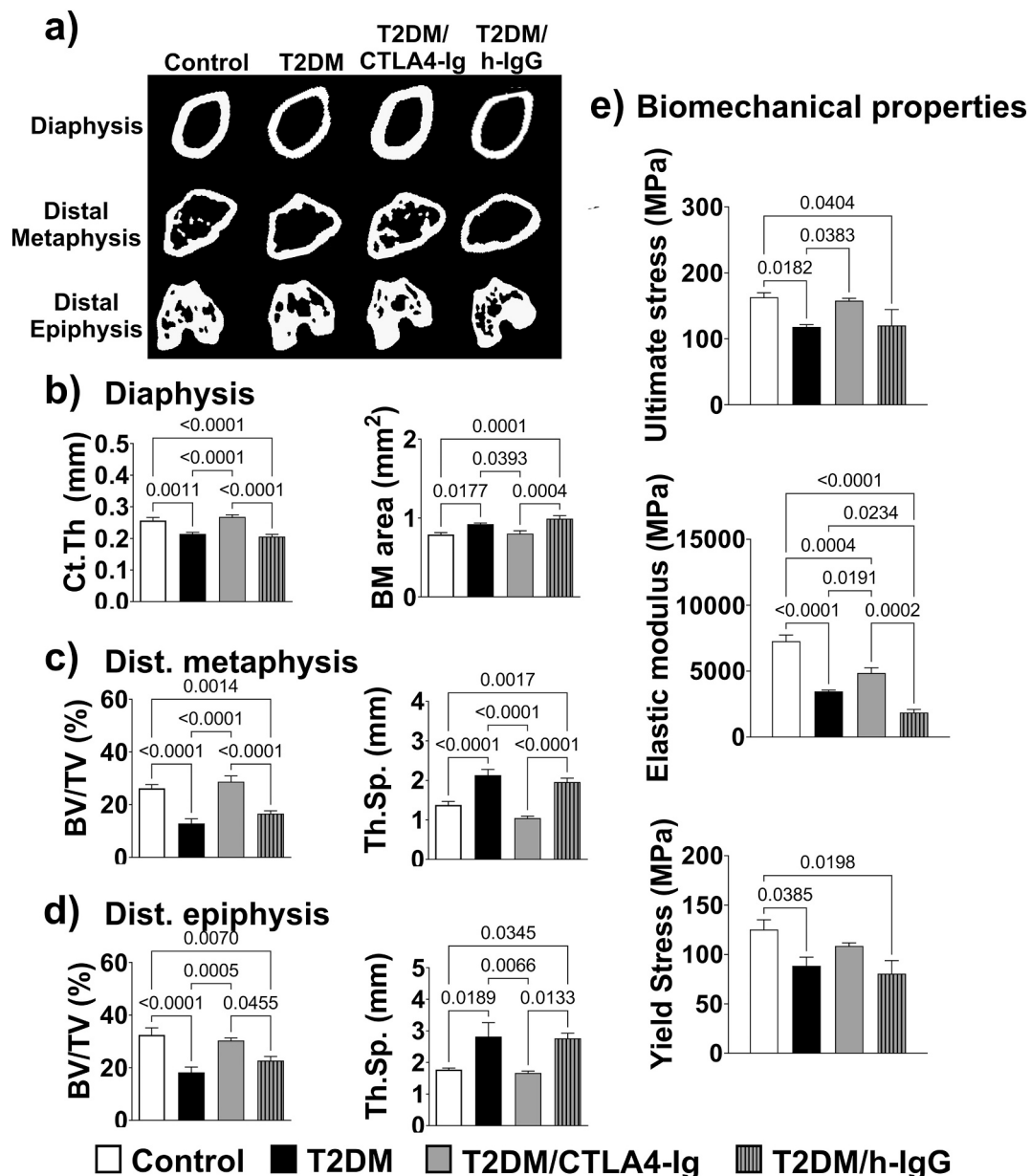


Fig. 5. CD4 T-cell activation by T2DM decreases bone mineral density, increases the trabecular bone porosity, and reduces bone resistance. Analysis of bone microarchitecture and resistance to fracture in the femur of the different experimental groups. (a) Representative transaxial images by computed microtomography (μ CT) of femur diaphysis, distal epiphysis, and distal metaphysis (b) Results of cortical thickness (Ct. Th.) and bone marrow area in the femoral diaphysis ($n = 10$ per group). (c) Results of bone volume (BV/TV) and trabecular separation (Tb.sp.) in femoral distal metaphysis ($n = 10$ per group). (d) Results of bone volume (BV/TV) and trabecular separation (Tb.sp.) in femoral distal epiphysis ($n = 10$ per group). (e) Femoral biomechanical properties obtained by three-point bending test ($n = 6$ per group). The graphs show mean \pm SEM. The bracket indicates p value.

in this cell subset are independent of T2DM because we only found differences between both groups in this immunological parameter.

We observed an increase in inflammatory bone marrow-activated CD4⁺ T-cells in diabetic mice, coinciding with the recent findings of Santopaolo et al., who observed an increase in activated CD4⁺ T-cells in the bone marrow of patients with T2DM [32].

The development of T2DM in our model is dependent on T-cell activation, because CTLA4-Ig administration decreased insulin resistance and increased insulin sensitivity, and consequently reduced blood glucose levels in mice with T2DM.

It is possible that the activated T-cells favour the development of T2DM by increasing serum TNF- α and IL-6 concentrations since we observed that CTLA4-Ig decreased the concentration of both cytokines, and it has been demonstrated that TNF- α and IL-6 induce insulin

resistance by inhibiting autophosphorylation of the insulin receptor and inducing phosphorylation on serine residues of the insulin receptor substrate 1 (IRS-1) [33,34]. Moreover, these results are consistent with those reported by Moraes-Vieira et al. [35], who observed that the administration of CTLA4-Ig in RPB4-Ox diabetic mice reduced insulin resistance and hyperglycemia and improved glucose metabolism by reducing inflammation in adipose tissue. However, in another study, CTLA4-Ig did not improve insulin sensitivity in diabetic mice [32]. These discrepancies may be due to differences in the dose of CTLA4-Ig, where using 500 μ g per mouse is beneficial for metabolic health, as found by ourselves and by Moraes-Vieira et al. Could be interesting to investigate the CTLA4-Ig effects in the insulin pathway. However, all three studies agree that activated T-cells play an essential role in the pathophysiology of T2DM and we suggest that CTLA4-Ig is an attractive

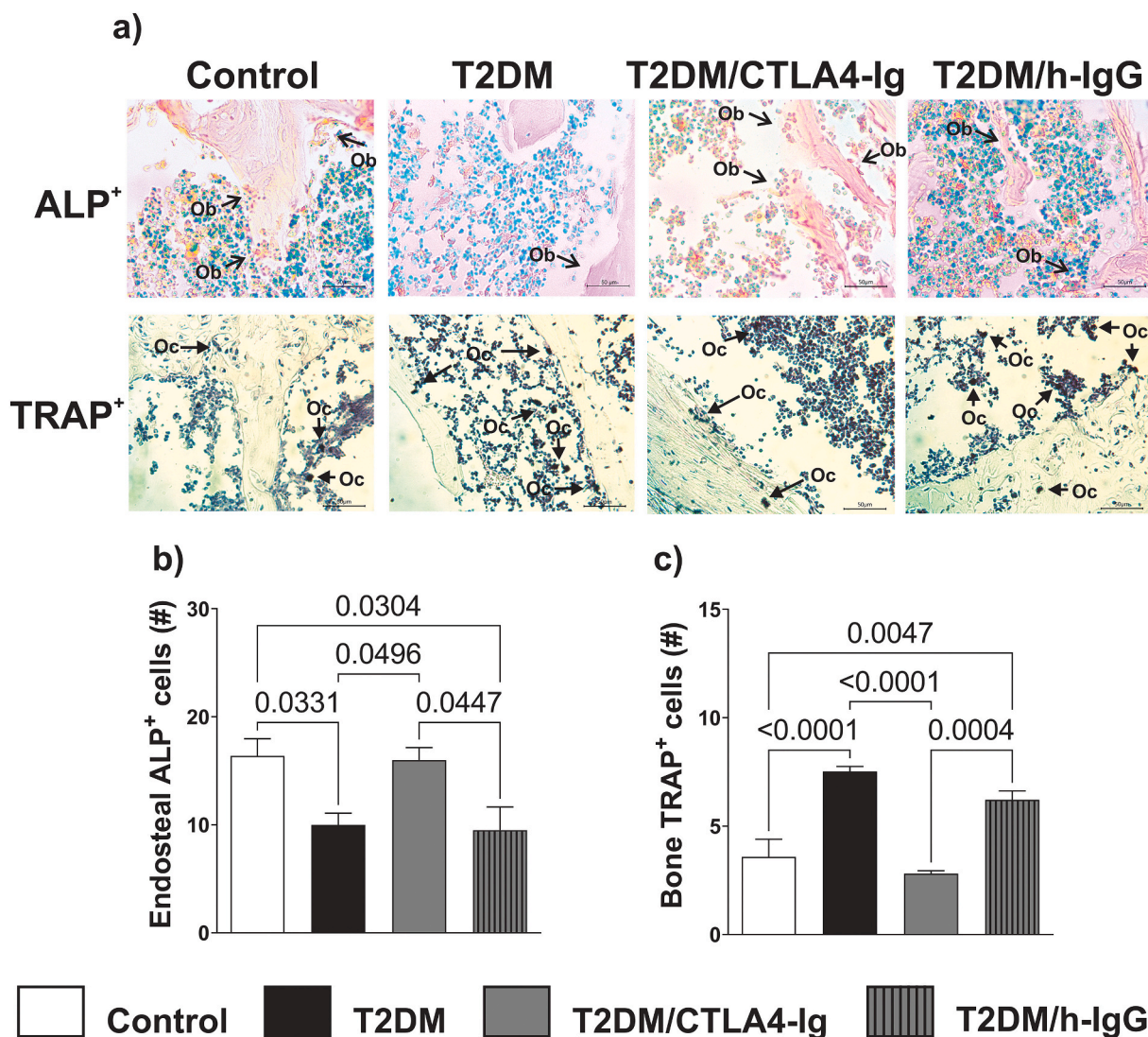


Fig. 6. CD4 T-cell activation by T2DM reduces the number of endosteal ALP⁺ cells and increases the number of TRAP⁺ cells. Results of tibial bone alkaline phosphatase activity (ALP) obtained by histochemistry and TRAP⁺ cells by immunohistochemistry (a) Representative micrographs of histological sections stained with Fast red indicating areas with ALP activity and Vector methyl green that stains nucleic acids and tartrate-resistant acid phosphatase staining by IHC. Arrows indicate areas with the presence of osteoblast-like cells (ALP-positive) in endosteal tissue or osteoclast-like cells. Bars = 50 μ m. (b) Results of the quantification of the number of cells positive for ALP in the endosteum ($n = 6$ per group). (c) Results of the quantification of the number of cells positive for TRAP ($n = 6$ per group). The graphs represent the mean \pm SEM. The bracket indicates p value.

therapeutic strategy for metabolic diseases. Additionally, our findings contribute to the previous hypothesis that suggests that immune alterations in the bone marrow in T2DM have a direct impact on insulin resistance and metabolic health [36]. Therefore, modulating CD4⁺ T-cell populations in the bone marrow may be a promising therapeutic target for treating T2DM since in addition, no serious side effects have been reported with the use of CTLA4-Ig in other diseases [37,38] although its safety has not been verified in the T2DM.

However, we do not know the mechanism underlying the increase in activated CD4⁺ T-cells in the bone marrow in T2DM. It is thought that they migrate by blood circulation. It has been shown that circulating activated T-cells can migrate to the bone marrow [39,40] in response to the chemotactic gradient of SDF1 [9], which increases in the bone marrow stroma in response to hyperglycemia [4,41]; higher concentrations of other homing chemokines like CCL19 and CXCL10/11 were also recently found in the bone marrow of T2DM patients [32]. Activated CD4⁺ T-cells favour the inflammatory microenvironment in the bone marrow, including the endosteal niche, negatively affecting bone quality. Alternatively, in our model the increase in bone marrow CD4⁺

T-cell activation seems to be due to antigen presentation since we observed an increase in MHCII in the CD11b⁺ cell subset of bone marrow. In ovariectomized mice, the proinflammatory microenvironment in the bone marrow induces T-cell activation by antigen-presenting cells. Therefore, it is possible that the migration of activated CD4⁺ T-cells toward the bone marrow and activation by antigen-presentation in situ is occurring in our mice with T2DM [14].

We demonstrate that in T2DM the increase in activated CD4⁺ T-cells in the bone marrow causes poor bone quality. Treatment with CTLA4-Ig increased bone density and resistance to fracture and decreased trabecular bone porosity. Furthermore, we found a positive correlation between the activation of bone marrow CD4⁺ T-cells with trabecular separation and bone fragility. Interestingly, we observed that CTLA4-Ig increased the percentage of Tregs cells, which positively correlated with bone density and negatively with trabecular separation and bone fragility parameters. Note that we found no correlation between peripheral blood CD4⁺ T-cell populations and bone quality parameters. This indicates that the alteration in bone marrow CD4⁺ T-cell populations leads to poor bone quality in T2DM. These results indicate that

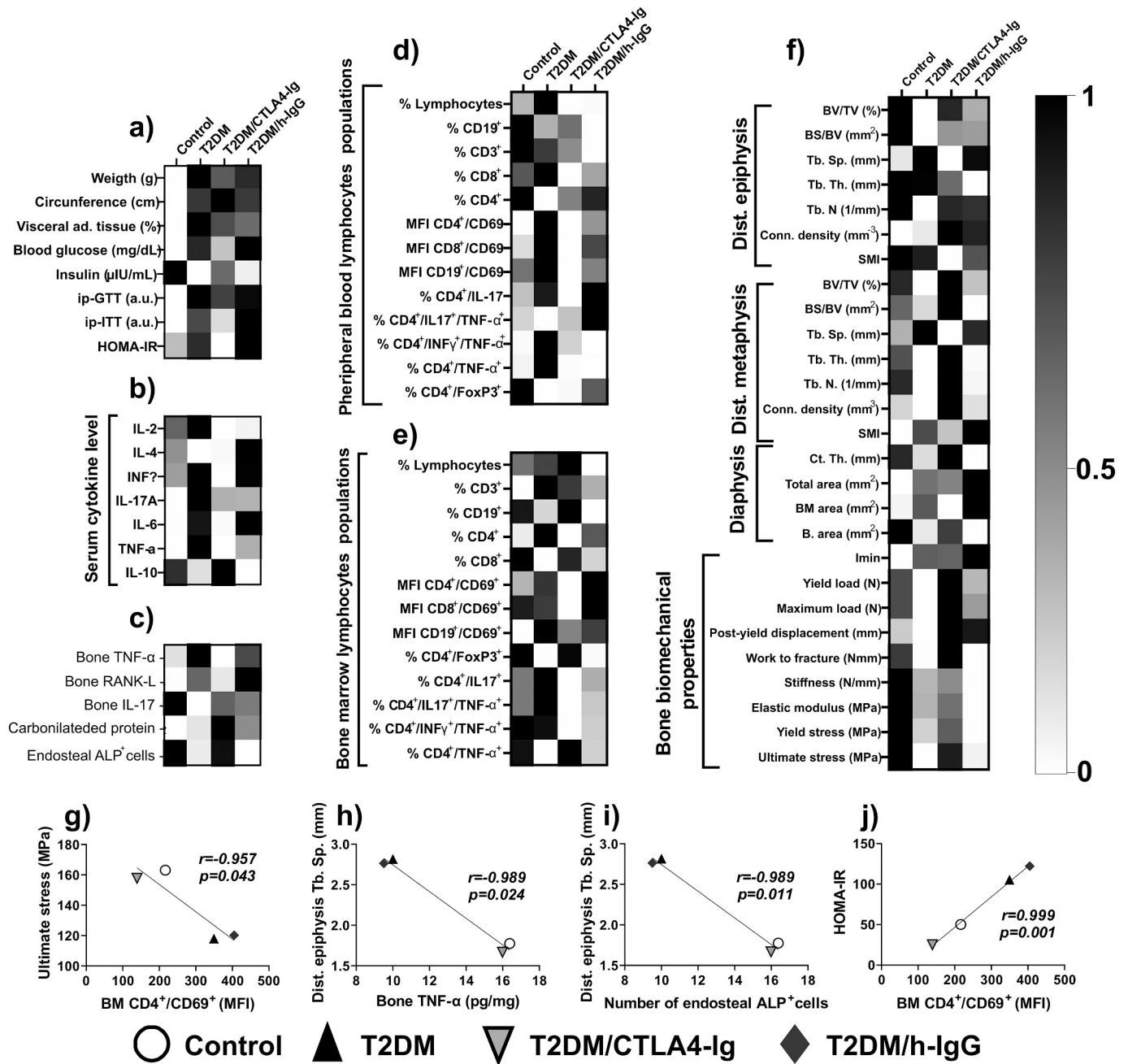


Fig. 7. CD4 T-cell activation in bone marrow correlates with bone alterations and insulin resistance in diabetic mice. (a-f) heat maps with metabolic, immunological and bone quality parameters, showing that diabetic mice have an increase in determining parameters for developing T2DM and bone fragility compared to healthy mice; while the administration of CTLA4-Ig in the diabetic mice caused a behavior like mice of the control group. Pearson's correlation between the mean values of: (g) bone marrow CD4 T cell activation and ultimate stress, (h) TNF-α concentration in bone and distal epiphysis trabecular separation (Th. Sp), (i) number of endosteal ALP⁺ cells and distal epiphysis trabecular separation (Th. Sp), (j) CD4 T-cells activation in bone marrow and insulin resistance index (HOMA-IR).

activation of CD4⁺ T-cell subsets in the bone marrow leads to more fragile bones by inducing a bone inflammatory microenvironment. Remain the question if old mice with T2DM would respond to CTLA-4 as we observed in our model.

We observed that diabetic mice treated with CTLA4-Ig had a reduction in the percentage of CD4⁺ T-cells that produce TNF-α and IL-17, and a lower concentration of TNF-α and RANK-L in the bone protein extract. Increased TNF-α and IL-17 induce overproduction of RANK-L, which in turn causes greater bone resorption [4,9,10], and a decrease in differentiation and osteoblastic activity [40], as reflected in the number of osteoblast-like cells, which was lower in diabetic mice without the inhibitor.

CTLA4-Ig improves bone quality by reducing the secretion of TNF-α and RANK-L [14] and inhibiting the expression of EphB4 in T lymphocytes, which increases osteoblastogenesis [43] and decreases osteoclastogenesis [44]. Another mechanism by which activated CD4⁺ T-cells may decrease bone quality is by supporting the polarization of macrophages or other immune cells toward a pro-inflammatory profile, which increases osteoclastogenesis and bone resorption, leading to the development of diabetic osteopathy [45]; however, in our model we did not observe differences in granulocyte or monocyte cell subsets.

Although we did not observe changes in peripheral blood or bone marrow B-cell activation, they could have an indirect role in systemic inflammation, metabolic alterations or bone fragility as it has been

reported that B-cells in T2DM support CD4⁺ T-cell polarization to the Th17 inflammatory profile and maintain the secretion of inflammatory cytokines by CD4⁺ T-cells [46,47]. It would be interesting to study their participation in the future.

We did not observe changes in the concentration of carbonylated proteins in bone, suggesting that oxidative damage is not a major mechanism causing bone fragility in our experimental model, whereas inflammation mediated by activated pro-inflammatory CD4⁺ T-cells appears to be.

In conclusion, the increase in activated CD4⁺ T-cells in the bone marrow induces microarchitectural injury and bone fragility in T2DM by promoting a pro-inflammatory microenvironment in bone through TNF and RANK-L production and plays an important role in the development of insulin resistance and the establishment of hyperglycemia. Inhibitors of lymphocyte activation such as CTLA4-Ig could represent a treatment strategy to counteract the development of diabetic osteopathy, by reducing the inflammation of bone, and could even restore the metabolic health of patients with T2DM.

CRedit authorship contribution statement

Conception and design of study and methodology: Cifuentes-Mendiola SE; García-Hernández AL.

Funding acquisition, resources, supervision, project administration: García-Hernández AL.

Data curation; Formal analysis: Cifuentes-Mendiola SE.

Acquisition of data and analysis: Cifuentes-Mendiola SE; Solis-Suarez DL; Martínez-Dávalos A; Godínez-Victoria M.

Drafting the manuscript: Cifuentes-Mendiola SE; Solis-Suarez DL; Martínez-Dávalos A; Godínez-Victoria M; García-Hernández AL.

Approval of the version of the manuscript to be published: Cifuentes-Mendiola SE; Solis-Suarez DL; Martínez-Dávalos A; Godínez-Victoria M; García-Hernández AL.

Funding sources

This study was supported by grants from PAPIIT IN213122; IN223619 UNAM DGAPA MÉXICO, and COMECYT EDOMEX-FICDTEM-2021-01 N.P. 75 ID-Int 100 MÉXICO.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), doctoral scholarship: CVU:697428 MÉXICO.

Declaration of competing interest

All authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

Bioelectronics Department of the Center for Research and Advanced Studies (CINVESTAV)-IPN, Mexico and Karla González for the design of the three-point device. MSc Elias Perrusquia for the graphical interface of MATLAB 2020a MathWorks for the biomechanical measurements. Fernanda Medina for her collaboration in the animal care.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bone.2021.116292>.

References

- [1] L.C. Hofbauer, C.C. Brueck, S.K. Singh, H. Dobnig, Osteoporosis in patients with diabetes mellitus, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 22 (9) (2007 Sep) 1317–1328, <https://doi.org/10.1359/jbmr.070510>.
- [2] C. Eller-Vainicher, E. Cairoli, G. Grassi, F. Grassi, A. Catalano, D. Merlotti, et al., Pathophysiology and Management of Type 2 diabetes mellitus bone fragility, *J. Diabetes Res.* 2020 (2020) 7608964, <https://doi.org/10.1155/2020/7608964>.

- [3] S. Hazra, Y.P.R. Jarajapu, V. Stepps, S. Caballero, J.S. Thinschmidt, L. Sautina, et al., Long-term type 1 diabetes influences haematopoietic stem cells by reducing vascular repair potential and increasing inflammatory monocyte generation in a murine model, *Diabetologia* 56 (3) (2013 Mar) 644–653, <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2781-03>.
- [4] V.A. Shahen, M. Gerbaix, S. Koeppenkastrup, S.F. Lim, K.E. McFarlane, A.N. L. Nguyen, et al., Multifactorial effects of hyperglycaemia, hyperinsulinemia and inflammation on bone remodelling in type 2 diabetes mellitus, *Cytokine Growth Factor Rev.* 55 (2020 Oct) 109–118, <https://doi.org/10.1016/j.cytogr.2020.04.001>.
- [5] A. García-Hernández, H. Arzate, I. Gil-Chavarría, R. Rojo, L. Moreno-Fierros, High glucose concentrations alter the biomineralization process in human osteoblastic cells, *Bone* 50 (1) (2012 Jan) 276–288, <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.10.032>.
- [6] J.-P.S. Laake, D. Stahl, S.A. Amiel, F. Petrak, R.A. Sherwood, J.C. Pickup, et al., The association between depressive symptoms and systemic inflammation in people with type 2 diabetes: findings from the South London diabetes study, *Diabetes Care* 37 (8) (2014 Aug) 2186–2192, <https://doi.org/10.2337/dc13-2522>.
- [7] N. Esser, S. Legrand-Poels, J. Piette, A.J. Scheen, N. Paquet, Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 105 (2) (2014 Aug) 141–150, <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2014.04.006>.
- [8] N.C. Olson, M.F. Doyle, I.H. de Boer, S.A. Huber, N.S. Jenny, R.A. Kronmal, et al., Associations of circulating lymphocyte subpopulations with type 2 diabetes: cross-sectional results from the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA), *PLoS One* 10 (10) (2015), e0139962, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139962>.
- [9] F. Di Rosa, R. Pabst, The bone marrow: a nest for migratory memory T cells, *Trends Immunol.* 26 (7) (2005 Jul) 360–366, <https://doi.org/10.1016/j.it.2005.04.011>.
- [10] M. Cortez, L.S. Carmo, M.M. Rogero, P. Borelli, R.A. Fock, A high-fat diet increases IL-1, IL-6, and TNF- α production by increasing NF- κ B and attenuating PPAR- γ expression in bone marrow mesenchymal stem cells, *Inflammation* 36 (2) (2013 Apr) 379–386, <https://doi.org/10.1007/s10753-012-9557-z>.
- [11] S.V. da Silva, M. Renovato-Martins, C. Ribeiro-Pereira, M. Citelli, C. Barja-Fidalgo, Obesity modifies bone marrow microenvironment and directs bone marrow mesenchymal cells to adipogenesis, *Obesity (Silver Spring)* 24 (12) (2016 Dec) 2522–2532, <https://doi.org/10.1002/oby.21660>.
- [12] M.N. Weitzmann, Bone and the immune system, *Toxicol. Pathol.* 45 (7) (2017 Oct) 911–924, <https://doi.org/10.1177/0192623317735316>.
- [13] C. Miyaura, Y. Onoe, M. Inada, K. Maki, K. Ikuta, M. Ito, et al., Increased B-lymphopoiesis by interleukin 7 induces bone loss in mice with intact ovarian function: similarity to estrogen deficiency, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (17) (1997 Aug) 9360–9365, <https://doi.org/10.1073/pnas.94.17.9360>.
- [14] F. Grassi, G. Tell, M. Robbie-Ryan, Y. Gao, M. Terauchi, X. Yang, et al., Oxidative stress causes bone loss in estrogen-deficient mice through enhanced bone marrow dendritic cell activation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (38) (2007 Sep) 15087–15092, <https://doi.org/10.1073/pnas.0703610104>.
- [15] T. Yu, M.J. Sungelo, I.J. Goldberg, H. Wang, R.H. Eckel, Streptozotocin-treated high fat fed mice: a new type 2 diabetes model used to study canagliflozin-induced alterations in lipids and lipoproteins, *Horm. Metab. Res.* 49 (5) (2017 May) 400–406, <https://doi.org/10.1055/s-0042-110934>.
- [16] J.E. Ayala, V.T. Samuel, G.J. Morton, S. Obici, C.M. Croniger, G.I. Shulman, et al., Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice, *Dis. Model. Mech.* 3 (9–10) (2010) 525–534, <https://doi.org/10.1242/dmm.006239>.
- [17] D. Li, C. Jiang, G. Mei, Y. Zhao, L. Chen, J. Liu, Y. Tang, C. Gao, P. Yao, Quercetin alleviates ferroptosis of pancreatic β cells in type 2 diabetes, *Nutrients* 12 (10) (2020 Sep 27) 2954, <https://doi.org/10.3390/nu12102954>.
- [18] X. Liu, N. Quan, Immune cell isolation from mouse femur bone marrow, *Bio-protocol*. 5 (20) (2015 Oct), <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.1631>.
- [19] H.-Y. Yang, J. Kwon, M.-S. Kook, S.S. Kang, S.E. Kim, S. Sohn, et al., Proteomic analysis of gingival tissue and alveolar bone during alveolar bone healing, *Mol. Cell. Proteomics* 12 (10) (2013 Oct) 2674–2688, <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.026740>.
- [20] E.M. Fallon, A. Nazarian, D. Nehra, A.H. Pan, A.A. O’Loughlin, V. Nose, et al., The effect of docosahexaenoic acid on bone microstructure in young mice and bone fracture in neonates, *J. Surg. Res.* 191 (1) (2014 Sep) 148–155, <https://doi.org/10.1016/j.jss.2014.04.005>.
- [21] D.G. Donner, G.E. Elliott, B.R. Beck, M.R. Forwood, E.F. Du Toit, The effects of visceral obesity and androgens on bone: trenbolone protects against loss of femoral bone mineral density and structural strength in visceraally obese and testosterone-deficient male rats, *Osteoporos. Int.* 27 (3) (2016 Mar) 1073–1082, <https://doi.org/10.1007/s00198-015-3345-1>.
- [22] X. Bi, I. Grafe, H. Ding, R. Flores, E. Munivez, M.M. Jiang, et al., Correlations between bone mechanical properties and bone composition parameters in mouse models of dominant and recessive osteogenesis imperfecta and the response to anti-TGF- β treatment, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 32 (2) (2017 Feb) 347–359, <https://doi.org/10.1002/jbmr.2997>.
- [23] M. Doube, M.M. Klosowski, I. Arganda-Carreras, F.P. Cordelières, R.P. Dougherty, J.S. Jackson, et al., BoneJ: free and extensible bone image analysis in ImageJ, *Bone* 47 (6) (2010 Dec) 1076–1079, <https://doi.org/10.1016/j.bone.2010.08.023>.
- [24] K.J. Jepsen, M.J. Silva, D. Vashishth, X.E. Guo, M.C.H. van der Meulen, Establishing biomechanical mechanisms in mouse models: practical guidelines for systematically evaluating phenotypic changes in the diaphyses of long bones, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 30 (6) (2015 Jun) 951–966, <https://doi.org/10.1002/jbmr.2539>.

- [25] T. Röszer, T. Józsa, E.D. Kiss-Tóth, N. De Clerck, L. Balogh, Leptin receptor deficient diabetic (db/db) mice are compromised in postnatal bone regeneration, *Cell Tissue Res.* 356 (1) (2014 Apr) 195–206, <https://doi.org/10.1007/s00441-013-1768-6>.
- [26] D. Miao, A. Scutt, Histochemical localization of alkaline phosphatase activity in decalcified bone and cartilage, *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 50 (3) (2002 Mar) 333–340, <https://doi.org/10.1177/002215540205000305>.
- [27] U. Galicia-García, A. Benito-Vicente, S. Jebari, A. Larrea-Sebal, H. Siddiqi, K. B. Uribe, et al., Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (17) (2020 Aug), <https://doi.org/10.3390/ijms21176275>.
- [28] C. Zeng, X. Shi, B. Zhang, H. Liu, L. Zhang, W. Ding, et al., The imbalance of Th17/Th1/Tregs in patients with type 2 diabetes: relationship with metabolic factors and complications, *J Mol Med (Berl)*. 90 (2) (2012 Feb) 175–186, <https://doi.org/10.1007/s00109-011-0816-5>.
- [29] A. Patakas, R.R. Ji, W. Weir, S.E. Connolly, R.A. Benson, S.G. Nadler, J.M. Brewer, I.B. McInnes, P. Garside, Abatacept inhibition of T cell priming in mice by induction of a unique transcriptional profile that reduces their ability to activate antigen-presenting cells, *Arthritis Rheumatol.* 68 (3) (2016 Mar) 627–638, <https://doi.org/10.1002/art.39470>.
- [30] A.M. Platt, V.B. Gibson, A. Patakas, R.A. Benson, S.G. Nadler, J.M. Brewer, I. B. McInnes, P. Garside, Abatacept limits breach of self-tolerance in a murine model of arthritis via effects on the generation of T follicular helper cells, *J. Immunol.* 185 (3) (2010 Aug 1) 1558–1567, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001311>.
- [31] G. Boleto, C. Guignabert, S. Pezet, A. Cauvet, J. Sadoine, L. Tu, C. Nicco, C. Gobeaux, F. Batteux, Y. Allanore, J. Avouac, T-cell costimulation blockade is effective in experimental digestive and lung tissue fibrosis, *Arthritis Res Ther.* 20 (1) (2018 Aug 29) 197, <https://doi.org/10.1186/s13075-018-1694-9>.
- [32] M. Santopaolo, N. Sullivan, A.C. Thomas, V.V. Alvino, L.B. Nicholson, Y. Gu, et al., Activation of bone marrow adaptive immunity in type 2 diabetes: rescue by co-stimulation modulator abatacept, *Front. Immunol.* 12 (2021), 609406, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.609406>.
- [33] G.S. Hotamisligil, P. Peraldi, A. Budavari, R. Ellis, M.F. White, B.M. Spiegelman, IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α and obesity-induced insulin resistance, *Science* 271 (5249) (1996 Feb) 665–668, <https://doi.org/10.1126/science.271.5249.665>.
- [34] J. Jager, T. Grémeaux, M. Cormont, Y. Le Marchand-Brustel, J.-F. Tanti, Interleukin-1 β -induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression, *Endocrinology* 148 (1) (2007 Jan) 241–251, <https://doi.org/10.1210/en.2006-0692>.
- [35] P.M. Moraes-Vieira, A. Castoldi, P. Aryal, K. Wellenstein, O.D. Peroni, B.B. Kahn, Antigen presentation and T-cell activation are critical for RBP4-induced insulin resistance, *Diabetes* 65 (5) (2016 May) 1317–1327, <https://doi.org/10.2337/db15-1696>.
- [36] R. Ojala, K.K. Motiani, K.K. Ivaska, M. Arponen, J.-J. Eskelinen, K.A. Virtanen, et al., Bone marrow metabolism is impaired in insulin resistance and improves after exercise training, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 105 (12) (2020 Dec) e4290–e4303, <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa516>.
- [37] O. Rachid, A. Osman, R. Abdi, Y. Haik, CTLA4-ig (abatacept): a promising investigational drug for use in type 1 diabetes, *Expert Opin. Investig. Drugs* 29 (3) (2020 Mar) 221–236, <https://doi.org/10.1080/13543784.2020.1727885>.
- [38] M. Liu, Y. Yu, S. Hu, A review on applications of abatacept in systemic rheumatic diseases, *Int. Immunopharmacol.* 96 (2021 Jul), 107612, <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107612>.
- [39] R. Pabst, K. Pötschick, Proliferation and emigration of newly formed lymphocytes from pig spleens during an immune response, *Immunology* 50 (2) (1983 Oct) 281–288.
- [40] R. Pabst, E. Nowara, Organ distribution and fate of newly formed splenic lymphocytes in the pig, *Anat. Rec.* 202 (1) (1982 Jan) 85–94, <https://doi.org/10.1002/ar.1092020110>.
- [41] F. Ferraro, S. Lymperi, S. Méndez-Ferrer, B. Saez, J.A. Spencer, B.Y. Yeap, et al., Diabetes impairs hematopoietic stem cell mobilization by altering niche function, *Sci. Transl. Med.* 3 (104) (2011 Oct), 104ra101, <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002191>.
- [42] C. Zhao, N. Irie, Y. Takada, K. Shimoda, T. Miyamoto, T. Nishiwaki, et al., Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis, *Cell Metab.* 4 (2) (2006 Aug) 111–121, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.05.012>.
- [43] H. Okada, H. Kajiya, Y. Omata, T. Matsumoto, Y. Sato, T. Kobayashi, et al., CTLA4-ig directly inhibits osteoclastogenesis by interfering with intracellular calcium oscillations in bone marrow macrophages, *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 34 (9) (2019 Sep) 1744–1752, <https://doi.org/10.1002/jbmr.3754>.
- [44] Y. An, H. Zhang, C. Wang, F. Jiao, H. Xu, X. Wang, et al., Activation of ROS/MAPKs/NF- κ B/NLRP3 and inhibition of efferocytosis in osteoclast-mediated diabetic osteoporosis, *FASEB J.* 33 (11) (2019 Nov) 12515–12527, <https://doi.org/10.1096/fj.201802805RR>.
- [45] D.A. Winer, S. Winer, L. Shen, P.P. Wadia, J. Yantha, G. Paltser, et al., B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies, *Nat. Med.* 17 (5) (2011 May) 610–617, <https://doi.org/10.1038/nm.2353>.
- [46] J. DeFuria, A.C. Belkina, M. Jagannathan-Bogdan, J. Snyder-Cappione, J.D. Carr, Y.R. Nersesova, et al., B cells promote inflammation in obesity and type 2 diabetes through regulation of T-cell function and an inflammatory cytokine profile, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (13) (2013 Mar) 5133–5138, <https://doi.org/10.1073/pnas.1215840110>.