



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA**

**“BIOMARCADORES TEMPRANOS DE FALLA DE LA
CÉLULA β EN NIÑOS Y ADOLESCENTES
CON OBESIDAD”**

**”
TESIS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE SUBESPECIALISTA EN
ENDOCRINOLOGIA PEDIATRICA**

**PRESENTA
DR. ALEJANDRO ILYA LÓPEZ CÁRDENAS**

**TUTOR DE TESIS
DRA. NELLY ALTAMIRANO BUSTAMANTE**

**COTUTORES DE TESIS
DRA. MYRIAM MARLENNE ALTAMIRANO BUSTAMANTE
M en C. CHIHARU MURATA**



CIUDAD DE MÉXICO 2020



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.


**“BIOMARCADORES TEMPRANOS DE FALLA DE LA CÉLULA β
EN NIÑOS Y ADOLESCENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 1”**



**DR. JOSÉ NICOLÁS REYNÉS MANZUR
DIRECTOR DE ENSEÑANZA**



**DR. MANUEL ENRIQUE FLORES LANDERO
JEFE DEPARTAMENTO DE PRE Y POSTGRADO**



**DR. CARLOS ROBLES VALDÉS
PROFESOR TITULAR DEL CURSO**



**DRA. NELLY F. ALTAMIRANO BUSTAMANTE
TUTOR DE TESIS**



**DRA. MYRIAM M. ALTAMIRANO BUSTAMANTE
COTUTOR DE TESIS**



**M EN C. CHIHARU MURATA
COTUTOR DE TESIS**

“El costo del progreso...La transición epidemiológica”

**Agradecemos el apoyo por CONACYT proyecto salud -2010-2-151942,
Cátedras CONACYT 2138. ICYTDF2010.**

ÍNDICE

INDICE	5
RESUMEN	6
MARCO TEÓRICO	7
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
JUSTIFICACION	19
OBJETIVOS	22
HIPÓTESIS	23
MATERIAL Y METODOS	25
TAMAÑO DE MUESTRA	30
METODOLOGIA	35
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	37
CONSIDERACIONES ÉTICAS	40
RECURSOS	42
CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	43
RESULTADOS	45
DISCUSION	48
CONCLUSIONES	51
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ANEXO 1 CUADROS	58
ANEXO 2 FIGURAS	61
ANEXO 3 VARIABLES	70
ANEXO 4 HOJA DE CAPTURA	74
ANEXO 5 CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO	75
ANEXO 6 CARTA DE ASENTIMIENTO INFORMADO	80

RESUMEN

Introducción: La alta prevalencia de obesidad y de DM en niños provoca gran demanda a los sistemas de salud a nivel mundial, por lo que ahora se reconocen como enfermedades catastróficas. La búsqueda de biomarcadores de daño temprano de la célula beta, es un desafío en salud pública. Los biomarcadores tempranos podrían mejorar nuestro entendimiento sobre la contribución de la disfunción de la célula beta en la historia natural de la DM1.

Justificación: La obesidad es una enfermedad compleja, existe resistencia a la insulina que conforme aumenta provoca disfunción del islote, menor número de células β , incremento de células α , depósito de amiloide, y por ende falla de la célula β . Si formas anómalas de plegamiento de la amilina son detectados en suero, se podrían usar como biomarcadores predictivos de la enfermedad en población en riesgo, y responder así, al desafío que la transición epidemiológica nos enfrenta.

Planteamiento del problema: La prevalencia de obesidad ha aumentado en las últimas tres décadas y se asocia con alta morbimortalidad. En la literatura los marcadores actuales para predecir a mediano plazo el diagnóstico de SM -en el adolescente con obesidad son marcadores de resistencia a la insulina pero no existe ningún estudio, hasta donde tenemos conocimiento de disminución de la masa de células β in vivo.

Objetivo: Identificar formas de OC del hIAPP, en niños y adolescentes con Obesidad como nuevos biomarcadores moleculares de daño a la célula beta.

Tipo de estudio: Estudio prospectivo, transversal, observacional y comparativo.

Criterios de selección: Niños y adolescentes de 4-18 años de edad, con diagnóstico de obesidad de acuerdo con la OMS, con normoglucemia de acuerdo con la ADA, sin ingesta de medicamentos ni otra enfermedad sistémica o síndrome genético y que aceptaron participar en el estudio.

Análisis estadístico: La distribución de las variables cuantitativas se describió por mediana, mínimo y máximo y de las cualitativas por frecuencias simples. La diferencia entre dos medias se hizo por prueba de Welch y en las categóricas por prueba chi-cuadrada. Para identificar los casos con alto riesgo de daño a células beta, se realizó un análisis de cluster jerárquico con la aplicación del método de Ward. Se consideró significativa una $p < 0.05$. Utilizamos el software JMP11 de SAS Institute, Inc.

Resultados: Presentamos 47 pacientes con obesidad comparados con pacientes con DM (60 con DM1 y 39 con DM2) vs 16 controles. No encontramos diferencias en los OC del IAPP en los pacientes con obesidad comparados con los pacientes con DM, pero sí con el grupo control [3.05 (1.22-7.07) vs 1.71 (1.10-2.02) $p < 0.001$]. Un punto de corte de OC > 3.35 de OC identifica al paciente con obesidad (ginecoide o androide) de alto riesgo quien presenta ≥ 4 comorbilidades (dislipidemia, Riesgo de esteatosis hepática e hipertensión arterial diastólica). A través del modelo de regresión logística buscamos si el valor 3,35 permite identificar puntos de corte de alto riesgo de los indicadores metabólicos actualmente utilizados como marcadores de daño de célula beta

Conclusiones: Es un estudio pionero que demuestra que la obesidad, es una enfermedad conformacional en edades pediátricas. Pudimos cuantificar a los OC de hIAPP en suero de niños con obesidad, demostrar su citotoxicidad y su rol como biomarcadores de falla temprana de la célula beta. Los OC son menores en el niño con obesidad metabólicamente sana, es decir, puede funcionar como un biomarcador, en lugar de, los 22 estudios solicitados actualmente, para identificar al niño con obesidad con alto riesgo cardiometabólico. Es una investigación de proteómica translacional exitosa y confiamos que sea un parteaguas para la mejora de la atención de nuestros niños y adolescentes con obesidad.

MARCO TEÓRICO

La Organización Mundial de la Salud estima que 2.6 millones de personas mueren como resultado de tener obesidad[1–3]. México dentro de la transición epidemiológica, en menos de una década incrementó la prevalencia global de obesidad en niños de 5-11 años de 18.6 % a 29 % y en adolescentes al 36%[4]

La Resistencia a la insulina (RI), definida como un menor efecto de la insulina sobre órganos blanco, es el mediador clave de la enfermedad cardiometabólica relacionada con obesidad, aunque los mecanismos subyacentes no se conocen en su totalidad. La RI es un predictor del desarrollo de DM2 aún en individuos con tolerancia normal a la glucosa. La génesis de la RI que inicia en etapas tempranas del desarrollo fetal contribuye a que el estilo de vida dispare la expresión de genes de riesgo, a través de varios mediadores, a saber: hiperinsulinemia, cambios inflamatorios de bajo grado, estrés oxidativo, lipotoxicidad, inducción de cambios epigénéticos, cambios en el microbioma intestinal, por señalar algunos[5–8]. La RI es el mecanismo fisiopatológico común de enfermedades como obesidad, diabetes mellitus tipo 2, hipertensión arterial, dislipidemia, síndrome de ovarios poliquísticos, esteatosis hepática no alcohólica y el evento final de esta pléyade de constelaciones denominado síndrome metabólico, es un evento coronario[9–12].

Un hito en el conocimiento de la obesidad es la posibilidad de identificar que niño tiene “obesidad metabólicamente sana” y quien tiene obesidad con daño a la célula beta asociado con alto riesgo cardiometabólico de tal manera que desarrollará síndrome metabólico en las dos primeras décadas de la vida y se perpetuará a lo largo de su vida adulta [OR 9.3 (4.4-22), $p < 0.01$][10,13]. Actualmente se utilizan marcadores clínicos (obesidad central, circunferencia de cintura, distribución androide de grasa, datos clínicos de resistencia a la insulina, presión arterial) y marcadores bioquímicos (glucosa, insulina, HOMA, péptido C, triglicéridos, colesterol HDL, ácido úrico, microalbuminuria de 24 horas)[14].

La evidencia contundente de que los sujetos con delgados o con obesidad “metabólicamente enfermos” son de alto riesgo cardiometabólico, para desarrollar cáncer y con una alta tasa de mortalidad. Es fundamental entender que existe un

fenotipo lipodistrófico (caracterizado por mayor acúmulo de grasa visceral, secreción de insulina alterada, resistencia a la insulina, baja capacidad cardiorrespiratoria, con una baja adherencia a las recomendaciones de un cambio terapéutico de estilo de vida sumado a el tratamiento farmacológico para la hipertensión, hiperglucemia o dislipidemia) que exige un cambio de paradigmas, en el conocimiento de la fisiopatología y por ende en el abordaje clínico y terapéutico de estos sujetos de alto riesgo, de tal manera de ser capaces de cumplir la meta de una medicina personalizada[15].

OBESIDAD

La alta prevalencia de obesidad y de DM en niños provoca gran demanda a los sistemas de salud a nivel mundial, por lo que ahora se reconocen como enfermedades catastróficas [3,27,44].

La resistencia a la insulina es el mecanismo fisiopatológico inicial para desarrollar alteraciones metabólicas. Clínicamente se manifiesta por la presencia de obesidad central, mayor índice grasa/músculo, acantosis nigricans, hiperqueratosis, hirsutismo y en niñas puberales hiperandrogenismo, manifestado por alteraciones menstruales o, su expresión máxima, síndrome de ovarios poliquísticos.

El diagnóstico de obesidad implica exceso de peso con respecto a la estatura y específicamente exceso de tejido graso. El tejido adiposo es uno de los sitios principales de acción de insulina y ejerce una gran influencia sobre la sensibilidad a la insulina en otros tejidos a través de la liberación de ácidos grasos libres y de adipocinas (leptina y adiponectina). El tejido adiposo blanco clásicamente considerado como un órgano pasivo, es ahora reconocido como un amortiguador importante en la disponibilidad y demanda para almacenar el exceso de calorías y prevenir el acúmulo tóxico de nutrientes en sitios ectópicos, también se comunican con otros órganos metabólicamente importantes a través de la secreción de adipocinas constituyendo un sistema endócrino dinámico que regula la distribución de nutrientes en tejidos periféricos. El tejido adiposo café, cuya función fundamental es la termogénesis, proceso energético extremadamente costoso, para mantener

la temperatura corporal a través de la generación de calor en respuesta al frío. El tejido adiposo café tiene más mitocondrias y están enriquecidos con la proteína desacoplante 1 (UCP1), que desacopla la cadena de fosforilación oxidativa, por lo que en lugar de ATP, se produce calor[16].

Al aumentar la adiposidad se presenta disfunción del tejido adiposo blanco: disminuye su capacidad para almacenar nutrientes y cambia las adipocinas secretadas (disminuye adiponectina, aumenta resistina, interleucina 6, factor de necrosis tumoral alfa, moléculas de adhesión, entre otras) que constituyen los factores de mayor riesgo para el desarrollo de resistencia a la insulina, a través de inducir inflamación crónica de bajo grado de la grasa visceral. Además disminuye el potencial del tejido adiposo café para disipar energía [17–20]

En los pacientes con RI ya sean delgados o con obesidad existe hiperinsulinemia compensadora como expresión de la disfunción de la célula beta que compromete su sensibilidad a la insulina y provoca una secreción inapropiada de insulina [21]

El estándar de oro para medir la Sensibilidad /Resistencia a la insulina es el clamp euglucémico hiperinsulinémico, pero es altamente costoso, por lo que en los últimos 20 años han surgido otros biomarcadores para determinarla, los más utilizados en estudios clínicos y epidemiológicos para predecir DM son el Homeostasis Model Assessment-Insulin Resistance (HOMA-IR) y el QUIKI.

HOMA es un método desarrollado por Matthews se utiliza como marcador de Resistencia a la insulina, se basa en la relación dinámica de glucosa e insulina en ayunas. En la práctica diaria se utiliza el cálculo de HOMA-IR (insulina en ayuno μmL) x (glucosa en ayunas mmol/L) / 22.5 o bien (insulina en ayuno $\mu\text{U/mL}$) x (glucosa en ayunas mg/dL) / 405. Los valores de referencia para prepuberales es < 2.5 y para puberales <3.5. Un HOMA-IR mayor de 3.5 nos indica la presencia de resistencia a la insulina. Existe correlación positiva entre HOMA-IR, dislipidemia y porcentaje de grasa corporal[22,23].

El QUICKI es un marcador de sensibilidad a la insulina, es una variación del HOMA, pero tiene mejor correlación lineal con el clamp particularmente en sujetos con

obesidad y con DM y se calcula con la siguiente fórmula: $QUICKI = 1/(\log I0 + \log G0)$. Los valores de referencia son 0.382 ± 0.007 y disminuye en obesidad y aún más en el paciente con DM. Si los dos son normales podemos concluir que el paciente no tiene RI [24].

Definición de obesidad

El Índice de masa corporal (IMC): muestra la masa en función de la estatura y permite analizar las relaciones entre estas dos variables. El índice de masa corporal no refleja directamente el exceso de grasa; se calcula con la siguiente fórmula: $IMC = \text{peso (kg)}/\text{talla (m)}^2$. La obesidad a partir de los dos años de edad, se define sobre las bases del IMC para edad y sexo. No existe un punto de corte universalmente aceptado para el diagnóstico de obesidad en niños de acuerdo con edad y sexo. Las definiciones más utilizadas actualmente son: OMS (Organización Mundial de la salud): $IMC \geq$ centila 95; IDF (Federación Internacional de Diabetes): IMC equivalente al IMC 30 del adulto, para edad y sexo[25] Figura 1.

Obesidad Central

La distribución de la grasa permite distinguir dos somatotipos: el androide o en forma de manzana (distribución central) y el ginecoide en forma de pera (distribución periférica). La obesidad central se asocia con riesgo alto para desarrollar enfermedades crónicas degenerativas. En adultos el NHANES III (Third National Health and Nutrition Examination Survey) define la obesidad central en base a la relación cintura/cadera, utilizado como un marcador de la grasa visceral, cuando esta relación aumenta la tasa de sobrevida disminuye [26]

Existe un marcador clínico disponible, fácil de realizar sistemáticamente una vez estandarizado y es el diámetro de cintura que se mide a la mitad de la distancia entre el borde inferior de la última costilla y el borde superior de la cresta ilíaca y recientemente se ha incorporado al relación cintura/talla. El 60% de los niños con obesidad tienen cuando menos un factor de riesgo cardiovascular, sobre todo si el diagnóstico es de obesidad central medida a través del diámetro de cintura (\geq centila 90) o una relación cintura/talla ≥ 0.50 . [27]

SÍNDROME METABÓLICO

La constelación de cambios inducidos por la obesidad tienen como blancos de choque cinco órganos o tejidos: células beta, músculo, hígado, tejido adiposo y espacio vascular, y el impacto sobre ellos es cada vez mayor conforme progresa la obesidad. La resistencia a la insulina, mecanismo fisiopatológico crucial, induce hiperinsulinemia compensadora que provoca aumento en la cantidad y desdiferenciación del tejido adiposo con menor capacidad para almacenar energía, dando como resultado mayor RI con aumento en la producción de citocinas proinflamatorias que inducen inflamación crónica de bajo grado e infiltración ectópica de grasa en páncreas, hígado y músculo [28].

Cuando la RI rebasa la capacidad de la célula β inicia la hiperglucemia por falla de función, desdiferenciación (pérdida de identidad) reprogramación (presencia de células polihormonales) y apoptosis de la célula beta, en una palabra, disfunción del islote[29] evidente por la disminución en la liberación de insulina y aumento de la síntesis de glucagon, mecanismos que aceleran el daño endotelial y la formación de la placa de ateroma que antecede por año o décadas al evento clínico cardiovascular.

Esta pléyade de factores de riesgo se engloba bajo el término de Síndrome Metabólico donde no existe una definición mundialmente aceptada, y en etapas pediátricas se acepta en mayores de 10 años. Los estudios realizados en poblaciones de niños y adolescentes mexicanos, aparentemente sanos, de acuerdo con NHANES III, muestran una prevalencia del síndrome metabólico de manera global del 8%, y en el norte del país del 6.5%; pero en niños y adolescentes de 10-14 años de edad con diagnóstico de obesidad la prevalencia aumenta al 66%., Cuadros 1-2.

Al emerger la obesidad como una epidemia mundial explica el por qué se ha cuadruplicado el número de personas con DM2 convirtiéndose en un problema de

salud pública. En adolescentes mexicanos la elevación de proteína C reactiva y de interleucina 6 asociada con disminución de adiponectina predicen el desarrollo de DM2. El diagnóstico de diabetes mellitus se basa en la medición de glucosa en ayunas (≥ 126 mg/dL) y/o Hemoglobina glucosilada (HbA1c ($\geq 6.5\%$)), pero en adolescentes con obesidad, el estándar de oro para confirmar normoglucemia, es la determinación de glucosa 120 minutos después de una carga oral de glucosa (CTOG) (≥ 200 mg/dL). En 2014 el costo asociado con el tratamiento de DM en USA fue de 612 billones [10,30].

Enfermedades conformacionales

La obesidad ha sido considerada decisiva para la epidemia de las enfermedades crónico-degenerativas, pero actualmente las evidencias señalan que las alteraciones metabólicas, tanto en sujetos delgados como en presencia de obesidad, son los factores de riesgo más importantes para DM2 y ésta a su vez, lo es, para la Enfermedad de Alzheimer (EA)[31–34].

Todas tienen como núcleo fisiopatológico común la amiloidosis, definida como una alteración del plegamiento de proteínas a nivel sistémico con estructuras β -plegadas de origen amiloideo[35,36]. En la DM2, la acumulación de las placas amiloideas (β A) se asocia con formación de fibrilos amiloideos depositados en las células β del páncreas con efecto citotóxico[37–39]. Por su parte, en la EA, la neurodegeneración se produce con efectos similares de la EA. Se engloban bajo el término enfermedades conformacionales[9,40,41]. Las enfermedades conformacionales (EC) tienen una base fisiopatológica común que es una alteración a nivel de las proteínas, ya sea en su tamaño, forma, plegamiento o conformación[9,36,40,42].

PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS

El plegamiento proteínico juega un papel decisivo en la biología celular, pues existe una estrecha relación entre la estructura y la función de las proteínas. Así, cuando una proteína se pliega de manera no nativa, tiende a agregarse y eventualmente a formar fibras amiloides. Aunque hay proteínas que fibrilan más pronto que otras, en teoría todas las proteínas podrían ser capaces de ser llevadas y permanecer en

conformaciones ricas en láminas β si se encuentran las condiciones adecuadas para esto, ya que la facultad de formar fibras no depende del estado nativo sino de la naturaleza del esqueleto de la proteína. Las concentraciones elevadas de glucosa y de zinc favorecen la formación de láminas β -cruzadas y la consecuente formación de fibras amiloides[43–46].

Con frecuencia, durante el proceso de agregación y acumulación de estas proteínas, primero se da la formación de oligómeros solubles que sólo precipitarán una vez que hayan alcanzado cierto tamaño. Sin embargo, son los intermediarios oligoméricos los que se consideran citotóxicos. Las fibras por lo general son inocuas en tanto que no se acumulen sistémicamente. Fig. 1 La toxicidad in vitro de los oligómeros solubles en la EA es inhibida por anticuerpos específicos contra dichos oligómeros. La agregación y formación de fibras se favorece por condiciones que promueven la formación de intermediarios inestables y se ha correlacionado la propensión de una proteína a formar agregados con el tiempo de vida media de estos intermediarios parcialmente plegados. Estas estructuras amiloideas son blancos terapéuticos para la búsqueda de nuevos tratamientos de estas enfermedades. El principal componente de los depósitos amiloides en la EA es el polipéptido beta amiloide, mientras que en la DM2 los depósitos son del polipéptido amiloide del islote. Estas formas amiloides poseen un polimorfismo conformacional dependiendo del microambiente y que el polimorfismo produce diferentes grados de citotoxicidad[36,47]. Figura 2.

Formación de Estructura no nativa de proteínas:

La lámina β -cruzada es la estructura que se forma al exponerse las regiones hidrofóbicas de las proteínas solubles dando lugar a estructuras no nativas. Las estructuras no nativas interactúan entre sí formando oligómeros solubles que se mantienen estables en la agregación y oligomerización lo que explica el atrincheramiento y depósito de agregados proteicos en diversos órganos provocando daño tisular y por ende disfunción orgánica[48,49] (Fig. 1).

El polipéptido amiloide del islote (IAPP), también conocido como amilina, es un péptido de 37 residuos que se produce en las células β del páncreas y es sintetizado, procesado y secretado junto con la insulina[50–52]h.

El IAPP, sufre alteración en su estructura terciaria. El IAPP desplegado o no procesado se agrega en el lisosoma, se libera junto con la insulina y ya fuera de la célula sufre una exposición a un ambiente químico con (pH aumentado y calcio disminuido), así como otras moléculas (glucosa, proteoglicanos, heparán sulfato) que puede producir un cambio estructural en el péptido e iniciar la formación de fibras (correlacionado con estudios biofísicos in vitro), dando lugar a su depósito tisular y causar una muerte celular inmediata y la acumulación de fibras pequeñas puede afectar la función[9,53].

Estudios recientes indican que, la agregación del IAPP, especialmente los agregados pre-fibrilares es un factor diabetogénico que produce citotoxicidad y falla progresiva de la célula β . Las membranas de las células β adyacente a los depósitos biosintéticos in vivo e in vitro son interrumpidas visiblemente interfiriendo con el ciclo de las proteínas de membrana[50,54]

Hasta donde tenemos conocimiento, no se ha estudiado en las etapas preclínicas y clínicas de la DM2 la presencia de formas anómalas de plegamiento solubles, pero en la enfermedad de Alzheimer se han identificado formas anómalas de plegamiento y anticuerpos que reconocen diferentes epítopes conformacionales (formas anómalas de plegamiento) están en etapas de ensayos clínicos para probar su eficiencia terapéutica[55,56]. Nicolls demostró las relaciones clínicas y biológicas de la DM2 y la enfermedad de Alzheimer[57].

Los agregados prefibrilares solubles pueden ser detectados por anticuerpos monoclonales (AMo)[55,58]. Los AMo herramientas muy útiles para el diseño de diagnósticos finos a nivel de secuencia o conformación de la proteína en cuestión y, son un soporte sólido y persuasivo que alienta al uso de AMo como estrategia

para obtener aquellos que reconozcan epítopes que correspondan a formas con plegamiento anómalo de estructuras no nativas y/o epítopes en diferente estado de desdoblamiento o agregación que sean solubles. Entonces, a través de una serie de anticuerpos monoclonales, producidos contra formas anómalas de plegamiento de la amilina, se podrían obtener diferentes etapas del proceso de formación de fibras y tener imágenes que permitan construir modelos fisiopatológicos de las especies proteínicas que están en juego durante el desarrollo de la DM2.

El mantenimiento de concentraciones séricas de glucosa dentro de límites estrechos a pesar de grandes variaciones en la tasa de entrada de glucosa (por ejemplo comidas) y en la utilización (por ejemplo el ejercicio aumenta la sensibilidad a la insulina en el músculo entrenado por lo que captura más fácilmente la glucosa) requiere de un complejo sistema de regulación. La falla para regular la liberación de insulina en respuesta a los valores de glucosa, altera la producción hepática de glucosa. Por definición en DM, esta regulación falla, con pérdida de función de células β que precede al déficit en la masa de células β [54,59,60].

Existen pacientes con obesidad “metabólicamente sana” el criterio pivote es la ausencia de resistencia a la insulina sola o asociada con ausencia de marcadores de inflamación subclínica bajos determinada por proteína C reactiva, o bien cuando tienen menos de dos factores diagnósticos de síndrome metabólico. Sin embargo, hay dos hechos probados, la duración y gravedad de la obesidad se asocian positivamente con el síndrome metabólico (SM), sugiriendo que “la obesidad metabólicamente sana” es un estado transitorio hacia el SM, por lo que deben ser tratados para evitar la progresión [61]

Los parámetros utilizados para definir obesidad “metabólicamente sana” tienen una gran variabilidad y no toman en cuenta los cambios de la glucosa en ayunas, ni del perfil de lípidos, ni de la presión arterial que son resultados de los mismos mecanismos fisiopatológicos

El riesgo cardiovascular entre individuos a través de diferentes categorías del IMC depende de su salud metabólica a lo largo de su vida, ya que entre 33-52% de los individuos con obesidad metabólicamente normal van a desarrollar SM durante el seguimiento (6-20 años), sobre todo las mujeres[62]

Ello, ha llevado a la búsqueda del fenotipo de mayor riesgo en los sujetos con obesidad “metabólicamente sana”, a encontrar las similitudes y diferencias con el sujeto delgado o con obesidad de alto riesgo cardiovascular, con el fin de implementar nuevas estrategias tanto desde la perspectiva clínica como de salud pública[14,63,64] (Figure 3).

En la literatura los marcadores actuales para predecir a mediano plazo el diagnóstico de SM -en el adolescente con obesidad central, con normoglucemia por CTOG y factores de riesgo cardiovasculares -, son marcadores de resistencia a la insulina: concentraciones de adiponectina baja (centila 5) y de proteína C reactiva e interleucina 6 altas (centila 95), pero no existe ningún estudio, hasta donde tenemos conocimiento de disminución de la masa de células β in vivo Figura 4.

Es por ello que proponemos este estudio, ya que si formas anómalas de plegamiento de la amilina, especies de agregados solubles son detectados en líquidos corporales de sujetos, se podrían usar como biomarcadores predictivos de la enfermedad en población en riesgo, y responder así, al desafío que la transición epidemiológica nos enfrenta: El reto de identificar en forma temprana que adolescente con obesidad desarrollará DM2, para en ellos implementar estrategias terapéuticas más firmes para resolver los problemas de salud futura.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La prevalencia de obesidad ha aumentado en las últimas tres décadas y se asocia con alta morbimortalidad, ya es un factor determinante para el desarrollo de síndrome metabólico, sin embargo, no todos los pacientes con obesidad presentan alteraciones metabólicas, ni todos los sujetos con un índice de masa corporal normal o incluso delgados, son de bajo riesgo, es decir, debemos encontrar que factores hacen que un fenotipo sea “metabólicamente sano” y cuáles dan origen al fenotipo “lipodistrófico”. La transición epidemiológica plantea como imperativo identificar en forma temprana que niño es metabólicamente sano y que hacer para mantenerlo en bajo riesgo y qué paciente delgado o con obesidad tiene condiciones metabólicas adversas.

La obesidad desde el punto de vista proteómico además de muchos otros factores de susceptibilidad, puede considerarse una enfermedad compleja, se presenta cuando existe resistencia a la insulina que conforme aumenta provoca disfunción del islote, con disminución del número de células β , incremento de células α y depósito de amiloide, condicionando falla de la célula β . Con el paso del tiempo, los niveles de glucosa en sangre aumentan mientras que la secreción de insulina disminuye, principalmente debido a un daño gradual en la célula beta asociado con la formación de depósitos tóxicos de amiloide dentro de los islotes pancreáticos.

Las enfermedades conformacionales tienen una base fisiopatológica común, es una alteración a nivel de las proteínas, ya sea en su tamaño, forma, plegamiento o conformación. El daño al islote, se debe a la agregación de formas parcialmente plegadas del polipéptido pancreático del islote (IAPP) por errores en el plegamiento o parcialmente degradadas (plegamiento anómalo) que desencadenan un proceso cooperativo de auto asociación o auto ensamblaje que forma protofilamentos, antes de formar fibras bien definidas y producir daño tisular.

El plegamiento proteico juega un papel importante en la biología celular por lo que es inevitable que al ocurrir un plegamiento anómalo se produzca un proceso

biológico disfuncional y por lo tanto condicione una enfermedad ya sea por citotoxicidad aumentada o por deficiencia de proteínas funcionales. Esto sugiere que el depósito de amiloide en el islote puede ser un evento temprano en la patogenia de la obesidad y que está asociado con una reducción en la liberación de insulina antes de la aparición de hiperglucemia, pero también asociado con la progresión de la disfunción, desdiferenciación y muerte de la célula beta durante la progresión clínica a DM.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Pueden detectarse formas de plegamiento anómalas (no nativas) del IAPP en sangre?

¿Las formas de plegamiento anómalas (no nativas) del IAPP son un marcador de disfunción del islote?

¿Las formas de plegamiento anómalas (no nativas) del IAPP son marcadores en sangre de falla de las células beta del páncreas en pacientes con DM1?

¿La cantidad de formas de plegamiento anómalas (no nativas) del IAPP aumenta conforme progresa el daño a células beta en pacientes con DM1?

¿Las formas de plegamiento anómalas (no nativas) del IAPP cambian conforme aparecen las complicaciones crónicas en pacientes con DM1?

JUSTIFICACIÓN

La epidemia de obesidad y de DM2 es un problema de salud pública mundial y México ocupa el séptimo lugar, con un alto costo financiero. Si bien la DM2 es una enfermedad heterogénea, la obesidad y la resistencia a la insulina son el heraldo para desarrollarla.

Un hito en el conocimiento de la obesidad es la identificación temprana de niños delgado o con obesidad de alto riesgo cardiometabólico, actualmente se utilizan marcadores clínicos (obesidad central, circunferencia de cintura, distribución androide de grasa, datos clínicos de resistencia a la insulina, presión arterial) y marcadores bioquímicos (glucosa, insulina, HOMA, péptido C, triglicéridos, colesterol HDL, ácido úrico, microalbuminuria de 24 horas). Todo ello encaminado a detectar alteraciones metabólicas con daño a la célula beta.

El metabolismo comprende una serie de reacciones químicas que ocurre en la célula. Son la fuente principal de energía para el mantenimiento de la función celular y la insulina desempeña un papel crucial. La concentración sérica de glucosa dentro de límites estrechos requiere de un complejo sistema de regulación. La falla para regular la liberación de insulina en respuesta a los valores de glucosa, altera la producción hepática de glucosa, porque existe resistencia a la acción de insulina y ello provoca hiperinsulinemia compensadora que a la larga desencadena daño irreversible a la célula β . Desde un punto de vista pragmático es razonable predecir que la pérdida de función de célula β precede a la pérdida de masa.

Kayed y colaboradores demostraron que en la fisiopatología de las enfermedades conformacionales, los oligómeros solubles son la especie tóxica más importante, y además, que existe una estructura común a todos los oligómeros solubles en las enfermedades conformacionales: Un anticuerpo monoclonal específico contra oligómeros solubles de la EA, cruza con otras especies de oligómeros del polipéptido amiloide del islote de la DM2 y de otros péptido amiloidogénicos. Estudios recientes indican que la agregación del péptido amiloide del islote,

especialmente los agregados pre-fibrilares, son un factor diabetogénico que produce citotoxicidad y falla de la célula β .

Tomando en cuenta todos estos resultados podemos sugerir que los agregados de formas de plegamiento anómalas (estructuras no nativas) del IAPP (OC) son candidatos moleculares a ser biomarcadores para monitorear el progreso de la obesidad y la identificación en etapas preclínicas de la DM2 antes del daño permanente de la célula β por el secuestro de sus proteínas secretadas (proinsulina 4%, péptido C e Insulina 96% y 100% amilina).

Hasta donde tenemos conocimiento, no se ha estudiado ni en obesidad ni en las etapas preclínicas y clínicas de la DM2 la presencia de formas anómalas de plegamiento solubles, pero en la enfermedad de Alzheimer se han identificado formas anómalas de plegamiento y anticuerpos que reconocen diferentes epítopes conformacionales (formas anómalas de plegamiento) y actualmente están en etapas de ensayos clínicos para probar su eficiencia terapéutica.

Los agregados prefibrilares solubles pueden ser detectados por anticuerpos monoclonales (AMo). Los AMo son herramientas muy útiles para el diseño de diagnósticos finos a nivel de secuencia o conformación de la proteína en cuestión y, son un soporte sólido y persuasivo que alienta al uso de AMo como estrategia para obtener aquellos que reconozcan epítopes que correspondan a formas con plegamiento anómalo de estructuras no nativas y/o epítopes en diferente estado de desdoblamiento o agregación que sean solubles. Entonces, a través de una serie de AMo, producidos contra formas anómalas de plegamiento de la amilina, se podrían obtener diferentes etapas del proceso de formación de fibras y tener imágenes que permitan construir modelos fisiopatológicos de las especies proteínicas que están en juego durante la progresión de la obesidad que permitirá el desarrollo de DM2.

Por otra parte, si estas mismas especies de agregados solubles son detectados en líquidos corporales (orinas, suero, etc) podrían evidentemente funcionar como biomarcadores de etapas muy tempranas de disfunción del islote en general y de la célula β en particular.

En la literatura en el adolescente con obesidad central, con normoglucemia por Curva de tolerancia oral a la glucosa asociada con factores de riesgo cardiovasculares se utilizan en la actualidad indicadores para predecir el desarrollo de DM2 a mediano plazo son marcadores de resistencia a la insulina, a saber, concentraciones de adiponectina baja (centila 5) y de proteína C reactiva e interleucina 6 altas (centila 95), pero no existe ningún estudio, hasta donde tenemos conocimiento de disminución de la masa de células β in vivo.

Es por ello, que proponemos este estudio, ya que si formas anómalas de plegamiento de la amilina, especies de agregados solubles, son detectados en líquidos corporales, se podrían usar como biomarcadores predictivos de la enfermedad en población en riesgo, y responder así, al desafío que la transición epidemiológica nos enfrenta: El reto es identificar en forma temprana que adolescente con obesidad desarrollará DM2 y SM e implementar en ellos estrategias terapéuticas más firmes para inducir cambios en su estilo de vida y controlar los otros factores de riesgo metabólico para resolver o aminorar los problemas de salud futura.

OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar formas de plegamiento anómalas del IAPP, en etapas pre-clínicas y clínicas de la DM y en adolescentes con obesidad como nuevos biomarcadores moleculares de daño a la célula beta.

Objetivos específicos

Identificar si existen formas de plegamiento anómalas (no nativas) del IAPP en individuos sanos.

Determinar que la cantidad de formas de plegamiento anómalas (no nativas) del IAPP aumenta conforme progresa el daño a células beta.

Determinar formas de plegamiento anómalas en niños y adolescentes con obesidad.

Determinar formas de plegamiento anómalas (no nativas) del IAPP en niños y adolescentes con diabetes mellitus tipo 1.

Determinar formas de plegamiento anómalas (no nativas) del IAPP en pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

Comparar si la cantidad de formas de plegamiento anómalas (no nativas) del IAPP entre los grupos de estudio difieren con las del grupo control.

HIPÓTESIS GENERAL

Las formas de plegamiento anómalas (no nativas) del IAPP (OC) son marcadores en suero de falla de las células beta del páncreas y son útiles para el diagnóstico temprano de diabetes mellitus.

La cantidad de formas de plegamiento anómalas (no nativas) del IAPP aumenta conforme progresa el daño a células beta.

Hipótesis específicas:

En niños y adolescentes sanos la concentración de formas de plegamiento anómalas (no nativas) del IAPP es menor al 3%.

En niños y adolescentes con obesidad y normoglucemia la concentración de formas de plegamiento anómalas es mayor del 10%.

En niños y adolescentes con obesidad con diabetes mellitus tipo 1 o tipo 2 con evolución menor de cinco años la concentración de formas de plegamiento anómalas (no nativas) del IAPP es mayor que en los de reciente diagnóstico.

En niños y adolescentes con obesidad con diabetes mellitus tipo 1 con complicaciones crónicas la concentración de formas de plegamiento anómalas (no nativas) del IAPP es menor que en los de reciente diagnóstico y con menor tiempo de evolución.

DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Es un estudio prospectivo, transversal, observacional y comparativo.

Población de estudio: Niños y adolescentes con obesidad y/o con Diabetes mellitus atendidos en el Servicio de Endocrinología en Hospitales de Tercer nivel de la Ciudad de México.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para alcanzar los objetivos planteados de esta investigación, se propuso dividir el estudio en tres etapas:

Etapa I. Producción y purificación de formas anómalas de plegamiento a través de métodos químicos y fisicoquímicos. Se realizó en la unidad de investigación de enfermedades metabólicas (UIBCAR) IMSS y coordinada por la Dra. Myriam Altamirano.

Etapa II. Producción y purificación de anticuerpos monoclonales contra formas de plegamiento anómalo de IAPP. Se realizó en el departamento de biología celular de CINVESTAV, y unidad de investigación en enfermedades metabólicas (UIBCAR), IMSS y fue coordinado por el Dr. José Manuel Hernández y la Dra. Myriam Altamirano.

Etapa III. Detección de formas de plegamiento anómalas de IAPP (OC) por radioinmunoanálisis en plasma de sujetos en etapas pre-clínicas y clínicas de la DM comparados con sujetos sanos en población pediátrica. Se realizó en forma conjunta con los Servicios de Endocrinología del INP y del Hospital de Pediatría CMN y UIBCAR coordinados por Dra. Nelly Altamirano, Dra. Eulalia Garrido y Dra. Myriam Altamirano.

Etapa 1. Producción y purificación de formas anómalas de plegamiento a través de métodos químicos y fisicoquímicos.

Material y métodos

El polipéptido amiloide del islote (IAPP h) sintético se obtuvo de Sigma.

Formación de oligómeros solubles pre-fibrilares con estructura β -cruzada:

a). El IAPP h recién sintetizado por Sigma, se disolvió en PBS a una concentración final de 1mg/ml. Se incubará a temperatura ambiente por tres semanas para facilitar la formación de fibrillas. Durante este período se realizó una cinética en el tiempo para captar la formación de oligómeros solubles pre-fibrilares con estructura β -cruzada. Las muestras se analizaron por fluorescencia, dicroísmo circular, y también se efectuaron estudios de pegue con rojo congo y se evaluó la birrefringencia en microscopio de luz polarizada. Los oligómeros, las protofilamentos y las fibras se observaron por Microscopía electrónica de Transmisión (TEM) y Microscopía de fuerza atómica (AFM).

b) **Glicación del IAPP h:** el IAPP h se incubó a 37°C, en la obscuridad, en PBS con 1M de D-glucosa-6 fosfato y 0.055% (m/v) de NaN₃. El IAPP h tiene tres sitios de glicación (1 lisina, 1 arginina y el amino-terminal). Se realizó un control sin glucosa 6 fosfato. La glicación fue confirmada por: observación de la aparición del color café, por la presencia de oligómeros solubles en geles de poliacrilamida, por fluorescencia y dicroísmo circular¹⁵.

Medidas de Fluorescencia: La agregación y la formación de proto-fibrillas se hizo por LS (Light scattering) y fluorescencia de la tioflavin T (thT) con un espectrofluorómetro Hitachi F-4500¹⁸.

Dicroísmo circular: La evolución de la estructura secundaria del IAPP h glicado se realizó en un espectropolarímetro JASCO J-810. Se tomó el promedio de 10

espectros sucesivos en la longitud de onda de 190 a 240 nm. Los porcentajes de estructura secundaria se analizaron con el software k2d.

Etapa 2. Producción y purificación de anticuerpos monoclonales contra formas de plegamiento anómalo de IAPP.

Material y métodos

La proteína en diferentes estados de plegamiento anómalo, se purificó y se utilizó para inmunizar ratones Balb/c. Todos los procedimientos de manejo de animales de laboratorio se realizaron de acuerdo con un protocolo aprobado por el CICUAL (Comisión Institucional de uso de animales de laboratorio, que sigue la norma que rige en el Distrito Federal NOM-062-ZOO 1999).

Se siguió un esquema de inmunización inicial (4 animales: 2 con péptido amiloide y 2 con complejo) y 2-3 retos espaciados cada 15 días, usando 50 microgramos con adyuvante Titermax 5:1 v/v. Los animales fueron sangrados de la cola 5 días después de cada reto a partir del segundo reto, para cuantificar la respuesta de anticuerpos por ELISA hasta obtener un título mínimo de 1:5000. Tres días antes de la fusión celular, los animales fueron retados con antígeno puro, y se sacrificaron de acuerdo con la norma NOM-062-ZOO-1999 para obtener las células del bazo, con las que realizó la fusión.

Se utilizó la metodología tradicional de producción de anticuerpos monoclonales (Amo) que es aún vigente (uso de una proteína como antígeno para inmunizar ratones, usar las células (linfocitos) del bazo y/o ganglios para fusionarlas con una línea celular inmortal y así, generar hibridomas que sólo crecen en un medio de selección con hipoxantina-aminoptericina-timidina (HAT)⁷⁹. La selección de los hibridomas productores de Inmunoglobulinas se hizo por dilución limitante. Sin embargo, fue fundamental aplicar la experiencia en el diseño de la estrategia para la selección adecuada de los hibridomas productores de los anticuerpos más afines y que reconozcan el antígeno en varios sustratos ya que esto permitió su uso más

versátil. El tiempo durante la selección es también un factor determinante, porque los hibridomas productores de inmunoglobulinas se encuentran mezclados con no productores, y estos últimos crecen mayormente y enmascaran los hibridomas útiles. Por lo tanto, se hizo un estudio del antígeno y de fragmentos antigénicos en péptidos recombinantes o sintéticos que se probaron en diferentes sustratos para asegurar la captura e identificación de los mejores AMo. Se utilizaron columnas de afinidad con proteína G Pierce, para purificar los anticuerpos que se usaron en las pruebas.

Los anticuerpos bioespecíficos se prepararon a partir de dos hibridomas del mismo isotipo. Las conjugaciones con compuestos o con fármacos se hizo siguiendo las indicaciones de los kit comerciales de Pierce de conjugación según los grupos reactivos.

La importancia de hacer nuestros propios anticuerpos monoclonales se fundamenta en varias razones:

- La primera, en el hecho de que los AMOs son conformación específica, y nos interesa tener AMOs contra varias conformacionales para contar con una batería de AMOs que nos permitan identificar el polimorfismo proteico.
- La segunda, es que una vez obtenidos los AMOs estaríamos en condiciones de secuenciar, clonar y producir AMOs recombinantes, para diseñar un método diagnóstico, así como sus potenciales usos inmunoterapéuticos.
- La tercera, es el costo, mandar a hacer a una compañía los AMOs con las cantidades y las variaciones conformacionales que necesitamos sería muy alto.
- La cuarta, es que se requiere formar recursos humanos en la producción de AMOs en el INP/IMSS.

Con los anticuerpos monoclonales purificados y seleccionados en la fase dos se montaron ensayos de RIA, siguiendo el procedimiento reportado por Christmanson y colaboradores⁷, para detectar formas anómalas de plegamiento del hIAPP (OC) en suero de las poblaciones de estudio.

Etapa 3. Detección de formas de plegamiento anómalas de IAPP por radioinmunoanálisis en plasma de sujetos en etapas pre-clínicas y clínicas de la DM comparados con sujetos sanos en población pediátrica

Las determinaciones de las forma anómalas de plegamiento del IAPP de los cuatro grupos, se hicieron en suero, ya que el IAPP se sintetiza junto con la insulina y se espera en este fluido mayor concentración del IAPP, y consideramos que es la forma más segura de cuantificarlo.

Los niveles de IAPP nativo se determinaron en plasma por radioinmunoanálisis (RIA) como se describe en Christmanson y col[6].

Se desconoce si en la orina hay suficiente concentración de formas anómalas de IAPP pero podría ser otra fase del estudio una vez que se logre su identificación en sangre.

TAMAÑO DE MUESTRA

Se calculó el tamaño de muestra, por medio de la fórmula para intervalo de confianza de un solo lado basándonos en la siguiente hipótesis: Más del 10% de los adolescentes con obesidad presentan alteración en la tolerancia oral a la glucosa.

Por lo que tenemos las siguientes aseveraciones.

H_0 : P (DM2 en adolescentes con obesidad) \leq 10%

Lo cual se explica que la Hipótesis cero sería que menos del 10% de los adolescentes con obesidad presentan DM 2.

H_1 : P (DM2 en adolescentes con obesidad) $>$ 10%

Lo cual explica que la Hipótesis uno sería que más del 10% de los adolescentes con obesidad presentan DM2.

Basándose en la siguiente ecuación:

$$P \geq \hat{p} - z_{1-\alpha} \sqrt{\frac{\hat{p}\hat{q}}{n}}$$

Despejándose tenemos lo siguiente

$$n = \frac{\hat{p}\hat{q} \times 1.64^2}{(P - \hat{p})^2}$$

Por lo tanto sustituyendo por los valores tenemos que:

$$n = \frac{0.1 \times 0.9 \times 1.64^2}{(0.1 - 0.009)^2}$$

Por lo que tenemos que la muestra para que tenga un IC aceptable debe de ser de 2,435.4 pacientes.

Realizando la misma ecuación expuesta previamente

P-p	N
0.01	2435.4
0.02	608.850
0.03	270.600
0.04	152.125
0.05	97.41

Teniendo en cuenta que para el tipo de estudio necesitamos una muestra con mayor poder (mínimo del 80%) lo cual se logra con una muestra mayor de 97 pacientes, se realizó un estudio bi institucional participando los Servicios de Endocrinología del Centro Médico Nacional, IMSS y del Instituto Nacional de Pediatría.

CRITERIOS DE SELECCIÓN

Criterios de Inclusión para el grupo de estudio

Grupo 1.- Grupo control.-Niños y Adolescentes Sanos

- Niños y Adolescentes sin enfermedad aguda o crónica aparente:
- Edad 4 a 18 años
- Peso de acuerdo con la talla para edad y sexo
- $IMC \geq Pc 5 \leq pc 75$ para edad y sexo ($\Delta ZIMC - Z\text{ talla} = \pm 1d.e.$)
- Sin datos clínicos de resistencia a la insulina,
- Sin antecedentes personales de obesidad, enfermedad sistémica o síndrome genético.
- Sin ingesta de medicamentos
- Sin antecedentes heredofamiliares de DM o de síndrome metabólico
- Glucosa en ayunas normal < 100 mg/dL e insulina < 20 mUI/mL y con HOMA < 2.5 y perfil de lípidos completo en ayuno.
- Aceptaron participar en el estudio.

Grupo 2. Niños y Adolescentes con obesidad

- Niños y Adolescentes
- Edad de 4 a 18 años
- $IMC \geq Pc 85$ para edad y sexo
- Que se les haya realizado CTOG con determinación de glucosa 0 y 120 minutos.
- Perfil de lípidos completo en ayuno
- Con o sin datos clínicos de resistencia a la insulina (obesidad central, acantosis, hiperqueratosis)
- Con normoglucemia. (Criterios de ADA, glucemia de ayuno normal (< 100 mg/dL) y glucemia post CTOG a las 2 h normal (< 140 mg/dL))
- Sin otra enfermedad sistémica o síndrome genético
- Sin ingesta de medicamentos

- Que aceptaron participar en el estudio

Grupo 3.- Niños y Adolescentes con DM1

- Niños y Adolescentes
- Edad de 4 a 18 años
- Diagnóstico de DM1 de acuerdo con la ADA: hiperglucemia en ayunas, autoanticuerpos GAD positivos, péptido C < 1 al diagnóstico y en algunos con HLA susceptible (DR3/DR4), dependencia insulina desde el diagnóstico.
- Sin otra enfermedad sistémica o síndrome genético
- Sin ingesta de medicamentos como glucocorticoides o antineoplásicos
- que aceptaron participar en el estudio

Grupo 4.- Niños y Adolescentes con DM2

- Niños y Adolescentes
- Edad de 9 a 18 años
- IMC \geq Pc 85 para edad y sexo
- Diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 en diferentes tiempos de evolución: (de acuerdo a los criterios aceptados por la ADA:, con glucosa en ayunas \geq 126 mg/dL o por curva tolerancia oral a la glucosa con glucemia post CTOG a las 2 h \geq 200 mg/dL), tratados con biguanidas (metformina) sola o combinada con insulina
- Perfil de lípidos completo en ayuno
- Sin otra enfermedad sistémica o síndrome genético
- Sin ingesta de otros medicamentos
- Aceptaron participar en el estudio

Criterios de Exclusión en todos los grupos :

Pacientes con antecedentes de otras enfermedades: Cáncer, Enfermedades del Sistema Nervioso Central, VIH, hepatitis B y C, enfermedad autoinmune sistémica, infecciones graves en los últimos seis meses, en tratamientos con fármacos anticonvulsivos, quimioterápicos, antidepresivos, glucocorticoides; o con Abuso de alcohol o drogas estimulantes y Sujetos que no aceptaron participar en el estudio.

METODOLOGÍA

De acuerdo con el artículo 17 de la ley general de investigación este estudio tiene un riesgo mayor que el mínimo: por lo que se solicitó el consentimiento y asentimiento informado. La extracción de sangre fue menor del 0.5% del volumen circulante de acuerdo con su edad y género.

- Se incluyeron niños y adolescentes con diagnóstico de obesidad entre 11 a 18 años, quienes dentro del abordaje diagnóstico o de seguimiento cuentan con determinaciones en ayuno de 10 horas de glucosa, insulina y perfil de lípidos completo, además de CTOG con determinación de glucosa a los 120 minutos, atendidos en el Servicio de endocrinología del Instituto Nacional de Pediatría (INP), o del Centro Médico Nacional (IMSS), en el período comprendido entre el 1 de mayo al 30 de diciembre del 2012. Se les solicitó consentimiento informado a los padres y asentimiento bajo información a los pacientes a partir de los 12 años de edad (anexo 1 y 2)-
- Se elaboró historia clínica completa. Para obtener la información se revisaron los expedientes clínicos y se interrogó a los pacientes y familiares: nombre completo, número de registro o de afiliación, edad al diagnóstico, edad al momento de inclusión en el estudio, así como el uso de fármacos que pudieran alterar la tolerancia a la glucosa como glucocorticoides, antihipertensivos.
- Se realizó somatometría donde se determinó el peso, la talla, cintura y la presión arterial en el momento de la inclusión en el estudio, con los instrumentos previamente calibrados y estandarizados con una diferencia interobservador menor del 1%. Se calculó IMC, pz de talla, pz de IMC, centila de peso, de talla y de IMC. Esta evaluación se realizó por el mismo investigador (Endocrinólogo pediatra Dra. Nelly Altamirano Bustamante, INP, Dra. Eulalia Garrido Magaña IMSS)) en todos los pacientes.
- Se realizó exploración física general, con énfasis en datos clínicos de resistencia a la insulina y estadio de Tanner. Esta evaluación se realizó por el mismo investigador

(Endocrinólogo pediatra Dra. Nelly Altamirano Bustamante, INP, Dra. Eulalia Garrido Magaña IMSS), en todos los pacientes, con una concordancia del 100%. Se determinó el grado de desarrollo puberal mediante la escala de Tanner.

- Evaluación bioquímica de la resistencia a la insulina: A todos los sujetos se les tomó una muestra de sangre con 10 horas de ayuno, de una vena del brazo (vena antecubital), se obtuvieron aproximadamente 9 ml, en una sola visita, el día que tuvieron cita programada al Servicio de Endocrinología. La sangre se fraccionó en dos tubos identificados por un código (no llevaron nombre, es decir ningún dato confidencial). El primero de 7 ml se centrifugó y la muestra de suero de 4 mL que se utilizó para determinar formas anómalas de plegamiento, fueron enviadas a la Dra. MMAB responsable del Laboratorio de UBICAR, del Hospital de Cardiología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, para almacenamiento (-80 °C) y análisis posterior hasta el final de la investigación. Estas muestras sólo fueron utilizadas para los propósitos descritos en este protocolo. No se realizaron estudios genéticos. Una vez que el estudio concluya las muestras serán desechadas de manera apropiada.
- A todos los pacientes se les informó sobre el plan de alimentación más adecuado para obtener un mejor peso y mantenerlo, la actividad física que debe realizar o el tratamiento más conveniente para disminuir el riesgo de presentar DM o si ya la tiene controlarla adecuadamente.
- Los niveles de IAPP nativo se determinaron en plasma por radioinmunoanálisis (RIA) como se describe en Christmanson y col[6].

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Variables Cuantitativas: La distribución de los datos fue descrita por la mediana con el valor mínimo y máximo, debido a la falta de compatibilidad en la mayoría de las variables estudiadas. La diferencia entre los grupos fue determinada por la prueba de Welch.

Variables Cualitativas: Consistió en la revisión de la distribución y frecuencias simples (número y porcentaje) de cada una de las variables categóricas: género, tiempo de evolución categórica, dislipidemia categórico, perfil de lípidos categórico, maduración sexual de Tanner categórico, síndrome metabólico categórico. La diferencia entre los grupos se determinó por la prueba de chi-cuadrada.

Exploramos la comparación de dos medias buscando una relación entre las variables continuas y entre la variable dependiente cuantitativa continua [formas anómalas de plegamiento (OC)] y variables independientes cualitativas binarias (presencia ó ausencia de). e hicimos pruebas de t pareada para comparación de medias de los marcadores bioquímicas y clínicos entre todas las categorías cualitativas categóricas.

Para identificar los casos con alto riesgo de daño a células beta, se realizó un análisis de cluster jerárquico con la aplicación del método de Ward utilizando las siguientes variables: obesidad central, TAS, TAD, péptido C, HOMA, QUICKI, TG, HDL, Non-HDL, AU, ALT y realización habitual del ejercicio recomendado. Estas doce variables fueron seleccionadas por la presencia de la asociación con el valor obtenido de oligómero citotóxico y la disponibilidad de datos clínicos y bioquímicos. Diferentes números de clusters (de dos a cinco) se realizaon y la agrupación de los casos en tres clusters fue elegida por presentar mejor interpretabilidad. El perfil clínico-bioquímico de los tres clusters fue interpretado al observar el comportamiento de los datos estandarizados. Entre los clusters obtenidos se comparó el nivel de OC por medio de la prueba de Welch.

Tanto con las variables categóricas como con las variables numéricas continuas la comparación múltiple fue realizado de manera protegida, es decir, en caso de realizar la comparación entre tres o más grupos, sólo con las variables que presentaron la diferencia estadísticamente significativa, se llevó a cabo la comparación entre todos los pares de grupos para determinar dónde se encuentran las diferencias.

En todas las pruebas estadísticas la significancia estadística fue reconocida al nivel de $p < 0.05$. Todos los parámetros estimados fueron presentados con su intervalo de confianza de 95%. Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo por el software JMP11 de SAS Institute, Inc.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

De acuerdo con el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, este estudio corresponde a un estudio de riesgo mínimo.

A los pacientes con obesidad con y sin diabetes mellitus o síndrome metabólico se les proporcionó asesoramiento sobre el plan de alimentación ideal para su peso, talla y estadio de Tanner, la actividad física que debe de realizar y de ser necesario se les instituyó el tratamiento específico para uno o los diferentes padecimientos detectados durante el estudio, con seguimiento por la consulta externa del Servicio de Endocrinología. A los controles sanos se les indicó el plan de alimentación y actividad física adecuada para continuar en las mejores condiciones de salud. Para la sociedad, el beneficio de este estudio es contribuir al conocimiento de las bases moleculares de la obesidad, como una enfermedad conformacional, con lo que es posible poder cambiar los paradigmas diagnósticos y terapéuticos.

Se explicó a los participantes que la información obtenida es estrictamente confidencial y utilizada sólo para fines del presente estudio, sin que se vea afectada su integridad física, ni modificada su atención en el Instituto si no aceptan participar, observando de esta forma los artículos 5º, 6º, 7º y 10º del Código Sanitario y los artículos 7º y 12º del Reglamento Interior del Consejo de Salubridad General de los Estados Unidos Mexicanos.

De acuerdo con la declaración de Helsinki se solicitó la autorización por escrito del paciente. A los participantes que cumplieron los criterios de inclusión, los investigadores responsables del estudio solicitaron su participación en el estudio, después de haberles explicado en qué consiste. Posteriormente se solicitó leer la carta de consentimiento informado y, si estaban de acuerdo, firmarla (Anexo 1) Es conveniente mencionar que, una persona diferente solicitó el consentimiento, en los casos de pacientes en los cuales alguna de las investigadoras fuera su médico tratante.

El proyecto fue evaluado y aprobado por los Comités de Investigación y de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Pediatría y registrado con el Número INP 091/2013 y sigue vigente (Diciembre 2020). También fue evaluado y aprobado por la Comisión de Ética en Investigación del IMSS.

RECURSOS Y FACTIBILIDAD

Se trata de un proyecto trans-disciplinario que cuenta con los recursos humanos con la experiencia científica para realizarlo y así estar en condiciones de enfrentar el desafío de diagnosticar tempranamente el riesgo de DM en pacientes con obesidad. Se cuenta con una infraestructura multi-institucional que se fortaleció con el financiamiento del CONACYT para consolidar esta red de expertos en Obesidad-DM en México.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

CRONOGRAMA DE TAREAS				
Actividad o tarea	1er. año		2do. año	
	1er. Semestre	2do. Semestre	3er. Semestre	4to. Semestr e
<p>Etapa I.</p> <p>Producción y purificación de formas anómalas de plegamiento a través de métodos químicos y fisicoquímicos.</p>	<p>1. Expresión, replegamiento y purificación del IAPP recombinante</p> <p>2. Modificación química (glicación) del IAPP control (comprado), y el IAPP recombinante</p> <p>3. Producción de formas anómalas de plegamiento por temperatura del IAPP control y del IAPP recombinante</p> <p>4. Purificación de formas anómalas de plegamiento que sean estables.</p>	<p>5. Caracterización fisicoquímica (por espectroscopias, dicroísmo circular, fluorescencia, ultracentrifugación) de las formas no nativas (anómalas) de plegamiento purificados.</p> <p>6. Escalamiento y producción de intermediarios estables de plegamiento anómalo</p>	<p>7. Estudio funcional de los intermediarios de plegamiento anómalo purificados en un sistema celular de apoptosis</p>	<p>8 Estudio funcional de los intermediarios de plegamiento anómalo purificados en un sistema celular de apoptosis</p>
<p>Etapa II.</p> <p>Producción y purificación de anticuerpos monoclonales contra formas de plegamiento anómalo de IAPP.</p>		<p>8. Inoculación de los animales de los intermediarios de plegamiento anómalos purificados</p> <p>9. Purificación de los AMOS que se obtengan</p> <p>10. Pruebas inmunológicas (ELISAS)</p>	<p>11. Purificación de otros AMOs</p> <p>12. Pruebas inmunológicas (ELISAS, RIA)</p>	

<p>Etapas III. Detección de formas de plegamiento anómalas de IAPP por radioinmunoanálisis en plasma de sujetos con diabetes mellitus tipo 2</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Con los primeros AMOs que se purifiquen se montará el RIA para el IAPP nativo y para las formas no nativas del IAPP. 2. Detección del IAPP nativo por RIA en la población de estudio 	<ol style="list-style-type: none"> 3. Determinación por RIA de formas no nativas de plegamiento anómalo del IAPP en la población de estudio. 	
<p>Análisis</p>	<p>Análisis de resultados de las etapas I y II</p>	<p>Análisis de resultados de las etapas III</p>	<p>Análisis de resultados global</p>
<p>Publicación de Resultados</p>	<p>Redacción de tesis de pre-grado y reportes de servicio social</p>	<p>Preparación de al menos un manuscrito para publicación internacional</p>	<p>Preparación de un documento para patente y las publicaciones internacionales que se deriven.</p> <p>Redacción de tesis de posgrado (especialidad y maestría)</p>

RESULTADOS

Presentamos 47 pacientes, con obesidad y los comparamos con pacientes con DM [60 pacientes con DM1 y 39 con DM2] y con 16 controles. La edad promedio de los pacientes con Obesidad fue de 13.25 (4.7 a 16.8 años), el 49% eran femeninos, con una PZ IMC de 1.89 (-0.26 , 3.96) D.E, con glucosa en ayunas menor de 100 [88 (72-99) y HbA1c < 6.5% [5.2 (4.2, 6.4) y con glucosa menor de 140 mg/dL a las dos horas después de una carga oral de glucosa. No encontramos diferencias en sexo ni en edad entre los cuatro grupos, pero sí en las características metabólicas con respecto al grupo control. Los pacientes con obesidad tenían mayor PZ de IMC, menor colesterol de HDL y ácido úrico más alto que los pacientes con DM2. Las características clínicas y-bioquímica de los sujetos en los cuatro grupos se resumen en el cuadro 3. La distribución de los datos de las variables cuantitativas fue descrita por la mediana con el valor mínimo y máximo, debido a la falta de compatibilidad en la mayoría de las variables estudiadas. La diferencia entre los grupos se determinó por la prueba de chi-cuadrado con las variables categóricas y por la prueba de Welch para las variables cuantitativas.

Comportamiento de los oligómeros citotóxicos

Se describió la distribución del valor de OC en los cuatro grupos por medio de histogramas y visualmente está clara la diferencia de la forma de distribución entre el grupo de niños sanos (controles) frente a los otros tres grupos. La mediana de OC en los niños con obesidad fue significativamente diferente que el de los controles [3.1 (1.2 – 7.1) vs 1.7 (1.1 – 2.0), $p < 0.001$], pero no encontramos diferencias al compararlo con el grupo de pacientes con DM.{DM1 [(3.24 (1-6.22) $p= 0.704$], DM2 [2.06 (1.01-6.32) $p= 0.104$]}.}

Factores asociados y OC

Glucotoxicidad: Comparamos los valores de OC con los indicadores aceptados actualmente de función de célula beta: a través de regresión lineal simple. Figura 6

- Glucosa: Encontramos tendencia a tener OC más altos ($p= 0.119$).

- HbA1C, Péptido C, HOMA: Encontramos correlación positiva ($p=0.027$), ($p=0.017$), ($p=0.012$), respectivamente.

Lipotoxicidad: Comparamos los valores de OC con los indicadores aceptados actualmente de dislipidemia: a través de regresión lineal simple: Figura 6

- Triglicéridos: Encontramos tendencia a tener OC más altos ($p=0.170$).

Modelo de regresión lineal múltiple. Tomando como variable dependiente el valor de OC y como variables independientes: Triglicéridos, Péptido C, HbA1c y la interacción de Triglicéridos y Péptido C, encontramos interacción cuando el nivel de Triglicéridos es relativamente bajo (<150) el péptido C alto se asocia con OC alto ($p=0.051$). Se pierde el efecto, cuando TG es alto (>200). Figura 7.

Identificación de grupos de alto riesgo y OC

A. Búsqueda de Punto de corte de OC como Biomarcador de coexistencia de comorbilidades.

a. Comportamiento de oligómeros en toda la población

De acuerdo con el valor de OC en toda la población dividimos a los pacientes en tres grupos para comparar los valores de las variables clínicas y bioquímicas analizadas. No hubo diferencia en sexo ni en edad. Observamos que en los pacientes con $OC < 2$ (valores similares al grupo control) el porcentaje de valores diagnósticos de alteración era menor en las variables analizadas y el 80% realizaba ejercicio. Buscamos el número de pacientes con 6 o más indicadores altos de acuerdo con los tres grupos de valor de OC: En el grupo < 2 no hubo ningún paciente, comparado con 4 pacientes en el grupo de 2-4 vs 11 pacientes en el grupo de $OC > 4$. Cuadro 4.

Hicimos análisis de Pareto y encontramos que en el grupo de $OC < 2$ ningún paciente tenía hipertensión arterial ni microalbuminuria, pero no permitía distinguir entre los grupos de 2-4 y $OC > 4$. Figuras 8-9

b. Comportamiento de variables clínicas y bioquímicas:

Observamos que la cantidad de OC aumenta conforme aumenta el número de complicaciones y de manera significativa cuando un niño con obesidad presentó estas comorbilidades (hiperglucemia de ayuno (glucosa > 85 mg/dL, resistencia a la insulina (HOMA > 3,5 y Péptido C > 3), dislipidemia (hipertrigliceridemia > 150 mg/dL, hipoalfa < 45 mg/dL), hiperuricemia (> 4.5 mg/dL, elevación de ALT (> 25 e hipertensión arterial diastólica), ($p = 0.003$) (Figura 10) .

Por lo tanto, en la población de niños con obesidad, como no se espera la muerte masiva de células β pancreáticas, buscamos la correlación entre el nivel de OC y el daño de células β medido por el número de alteraciones analizadas.

Si un niño con obesidad presenta 8 comorbilidades (hiperglucemia de ayuno, resistencia a la insulina (HOMA y Péptido C), dislipidemia (hipertrigliceridemia, hipoalfa), hiperuricemia, elevación de ALT, hipertensión arterial diastólica), es probable que sus células β estén sufriendo daño, y mientras mayor sea la copresencia de complicaciones, mayor será la alteración funcional en células β . ($p = 0.0171$). Nuestro análisis apoya esta hipótesis si un niño presenta cuatro o más complicaciones, la mediana de OC es mayor comparando con los niños con dos o menos (medianas: 4.52 [IQR: 2.23]; 1.62 [IQR: 1.49], Prueba de Welch: $p=0.003$)
Figura 11

Ahora, asumiendo que un paciente con cuatro o más complicaciones sea un caso con riesgo alto en la alteración de la función de células β , se plantea una pregunta: ¿el nivel de OC permite identificar los caso con riesgo alto?, y si es así, ¿cuál es el punto de corte del valor de OC para optimizar la utilidad de la prueba?

Para contestar estas preguntas, hicimos dos análisis estadísticos: uno es por el modelo de regresión logística y otro es la construcción de la curva ROC, así como la estimación de parámetros de utilidad diagnóstica.

El modelo de regresión logística mostró una asociación muy elevada entre estas dos variables ($\chi^2=10.55$, $p=0.001$) y la curva ROC sugirió el nivel de OC de 1.71 como el mejor punto de corte, el cual corresponde a la sensibilidad de 1.00 y especificidad de 0.73. Figuras 12 - 13

c) Análisis de Regresión logística

Analizamos todas las variables clínicas y bioquímicas investigadas (22) en aras de buscar patrones diferentes para identificar niños de alto riesgo predichos por el nivel de OC. El modelo estableció la presencia de 10 alteraciones cuando por curva ROC el punto de corte del valor de OC de 1.93, pero no fue significativo ($p= 0.124$). Figura 14

En el análisis de regresión logística la presencia de 8/12 alteraciones es significativa para identificar niños de alto riesgo (χ^2 cuadrada 9.68 $p = 0.001$ y establece el punto de corte por curva ROC de ($OC=>1.94$) con una Sensibilidad de 0.100 y una especificidad de 0.74.

En el análisis de regresión logística la presencia de 9/12 alteraciones es significativa para identificar niños de alto riesgo (χ^2 cuadrada 9.66 $p = 0.001$ y establece el punto de corte por curva ROC de ($OC=>3.35$) con una Sensibilidad de 0.100 y una especificidad de 0.74. Figura 15.

d) Análisis de comorbilidades

Las comorbilidades más frecuentes fueron: dislipidemia: (colesterol LDL o TG o HIPOALFA), Riesgo de esteatosis hepática (ALT) e hipertensión arterial diastólica. Analizamos el valor de oligómero de acuerdo con el número presente en cada paciente y encontramos significancia estadística ($p = 0.078$). En este análisis se utilizó ANOVA de una vía con corrección de Welch en lugar del análisis no paramétrico Kruskal-Wallis, debido a la asimetría que se observa en cada una de las categorías sometidas en la comparación (número de complicaciones: 0; 1; 2; 3 y 4: el grupo de 5 presenta la simetría). Figura 16.

Si un niño presenta tres o más comorbilidades, la mediana de OC es mayor comparando con los niños con dos o menos (medianas: 5.02 [IQR: 2.3]; 1.71 [IQR: 3.1], Prueba de Welch: $p < 0.001$). Figura 17.

Ahora, asumiendo que un paciente con tres o más complicaciones sea un caso con riesgo alto en la alteración de la función de células β . A través del modelo de regresión logística el nivel de OC permite identificar los casos con riesgo alto (chi-cuadrado=12.13, $p < 0.001$), y la curva ROC sugirió el nivel de OC de 3.35 como el mejor punto de corte, el cual corresponde a la sensibilidad de 0.96 y especificidad de 0.66. Figura 18.

e) Análisis de conglomerado

Para identificar los casos de alto riesgo del daño de células beta, se realizó un análisis de cluster de las 12 variables que consideramos tener la relación con el estado de células beta: relación cintura/talla; centila de TAS y TAD; péptido C en ayuno; HOMA; QUICKI; TG; C-HDL; C-NoHDL; AU; ALT y ejercicio. Se obtuvieron tres clusters tipificables. Figura 19

Por medio del análisis de cluster se pudieron obtener 3 clusters que se pueden tipificar sus perfiles como: obesidad "sana"; obesidad ginecoide; y obesidad androide (Figura 20). Los pacientes de últimos dos clusters presentan perfiles clínico-bioquímicos asociables con daños severos en células beta de páncreas. En cluster 1 las variables clínicas-metabólicas generalmente presentan valores cercanos al promedio de todos los casos estudiados, habiendo algunas relativamente altas (QUICK, HDL, ejercicios) y bajas (PEPC, HOMA, NoHDL, ALT); en el cluster 2, cintura/talla, TAS y QUICKI son notoriamente bajas, mientras que PEPC, HOMA, TG, NoHDL y ejercicios son altas; en cluster 3, cintura/talla, TAS, TAD, PEPC, HOMA y ALT son muy elevadas, siendo los valores de TG, HDL son similares al grupo 2. Los valores de QUICKI, AU y ejercicios son notoriamente bajas, lo que implica baja sensibilidad a la insulina.

Cálculo de Riesgo de daño a célula beta

Se calcularon dos tipos de OR para riesgo alto de daños en células beta de acuerdo con OC: uno, OR que corresponde al cambio de una unidad de OC; y otro, OR por presentar OC mayor que el punto de corte identificado, 3.35.

Modelo Cambio por unidad de OC: Se utilizó el modelo de regresión logística para obtener la razón de momios que corresponde al cambio de cada unidad de medición de OC para presentar una comorbilidad [OR 2.40 (IC95%: 1.37 – 4.36)], es decir, la probabilidad de tener riesgo alto de daño de células beta es 2.40 veces mayor, al comparar, el valor en dos diferentes individuos.

Modelo por punto de corte de OC para riesgo alto: Se buscó la razón de momios que corresponde al valor de OC dicotomizado por el punto de corte de grupos de riesgo alto ($OC \geq 3.35$), generó la razón de momios de 51.32 [IC95%: 4.67 – 564.16] ($p=0.001$), es decir, la probabilidad de incremento del riesgo en niños que tuvieron resultado positivo ($OC \geq 3.35$) es 51.32 veces más alta en comparación con los que tuvieron resultados negativos ($OC < 3.35$) Cuadro5.

B) $OC > 3.35$ como predictor de cambios en los indicadores actuales de daño de célula beta

Dividimos a la población de pacientes de acuerdo con el valor de OC identificado como de riesgo (>3.35) para comparar el comportamiento de las variables independientes estudiadas con prueba de ANOVA de una vía con corrección de Welch.

a. Características clínicas: En los pacientes con valores de OC de alto riesgo:

- Relación cintura/talla: Encontramos tendencia a tenerla mayor [0.585 (IQ 0.123) vs 0.566(IQ 0.101), $p= 0.101$]. Figura 24
- Centila de Presión arterial diastólica: Encontramos tendencia a tenerla mayor [89 (IQ 39) vs 50 (IQ 40), $p= 0.101$].

Comparamos a los pacientes de acuerdo con Los valores de OC > 3.35 con indicadores actualmente identificados de daño a la célula beta con prueba de ANOVA.

Glucotoxicidad: En los pacientes con valores de OC de alto riesgo > 3.35. Figura 25

- Glucosa: más alta [92.1 (IQ 10.2) vs 85.3 (IQ 8.5), p= 0.034].
- Péptido C más alto: [3.8 (IQ 1.6) vs 2.5 (IQ 1.4), p= 0.003].
- HOMA más alto: [6.1 (IQ 5.5) vs 3.3 (IQ 2.0), p= 0.001].
- HbA1C: tiende a ser más baja: [5.2 (IQ 0.48) vs 5.3 (IQ .50), p= 0.072].

Lipotoxicidad: En los pacientes con valores de OC de alto riesgo > 3.35.

- Triglicéridos: más altos [155 (IQ 104) vs 107 (IQ 83), p= 0.041].
- Colesterol HDL más bajo: [37.5 (IQ 9) vs 45.2 (IQ 14), p< 0.001].
- ALT más alta: [31.6 (IQ 14) vs 19.6 (IQ 8), p= 0.002].
- Ácido úrico: tiende a ser más bajo: [5.0 (IQ 2.5) vs 5.9 (IQ 1.5), p= 0.095].

A través del modelo de regresión logística buscamos si el valor de OC > 3,35 permite identificar puntos de corte de alto riesgo de los indicadores metabólicos actualmente utilizados como marcadores de daño de célula beta. Encontramos que sugiere estadísticamente significativo el nivel de alto riesgo de glucosa, de péptido C y de HOMA y de manera parcial el ácido úrico en niños con obesidad. Glucosa (chi-cuadrado=4.66, p<0.030), y la curva ROC sugirió el nivel de glucosa de 89.4 mg/dL como el mejor punto de corte, el cual corresponde a la sensibilidad de 0.65 y especificidad de 0.71. Cuadro 6.

DISCUSIÓN

Una de las principales aportaciones de esta tesis es demostrar que la obesidad es una enfermedad conformacional. Es decir que una de las bases fisiopatológica de la obesidad es el mal plegamiento de proteínas blanco, entre ellas la del polipéptido amiloide del islote (hIAPP). Una vez que el hIAPP se despliega, entra en un estado competente de agregación, que lo lleva a generar homo y hetero-oligómeros. Estos oligómeros son citotóxicos y producen daño celular y apoptosis de la célula beta. [39,65,66].

El considerar a la obesidad como una enfermedad conformacional, revoluciona la endocrinología clínica ya que se cambian los paradigmas diagnósticos, pronósticos, de transmisión y terapéuticos en general, y pone de relieve que las enfermedades conformacionales tienen su origen en la infancia y no sólo son típicas en el envejecimiento [36,67].

En esta tesis se realizó un proyecto de medicina proteómica translacional, en el que participaron investigadores clínicos e investigadores biomédicos. Los resultados más sobresalientes desde el punto de vista biomédicos son: i) La obesidad es una enfermedad conformacional. ii) Por western blot, se demostró que los homo-oligómeros de hIAPP son trímeros, hexámeros y dodecámeros, además de oligómeros de alto peso molecular; están elevados en los niños y adolescentes con obesidad y hay una diferencia estadísticamente significativa con niños y adolescentes sanos [3.05 (1.22 – 7.07)] vs [1.72 (1.10 – 2.02)] $p < 0.001$. iii) Los hetero-oligómeros (La co-agregación del hIAPP con otras proteínas del plasma) son abundantes en el suero de niños con obesidad. Las principales proteínas que se co-agregan al hIAPP son la seroalbúmina y la haptoglobina, además de varias inmunoglobulinas. iv) Los homo y hetero-oligómeros son citotóxicos y lo demostramos en células de cerebelo con ensayos de viabilidad [65]. Desde el punto de vista clínico, se expandió el horizonte epistémico, al correlacionar la cuantificación de los oligómeros en suero con los datos de la historia clínica (Exploración física, laboratorio y gabinete) Cuadros 3-6 , Figura 13-18.

En primer lugar el análisis de acúmulos (Cluster analysis) permite clasificar la obesidad en tres grupos: obesidad sana, obesidad androide, obesidad ginecoide. Lo que destaca es que la concentración de oligómeros es menor en la obesidad ginecoide que en la obesidad androide, y eso significa que hay menor riesgo metabólico (Figura X). Por lo tanto, podemos diferenciar de manera efectiva con la única determinación de la concentración de oligómeros si un niño o adolescente con obesidad tiene mayor o menor riesgo metabólico (Figuras 19-28).

En segundo lugar, ésto es un resultado significativo por la facilidad de la estratificación con un solo biomarcador (los oligómeros de hIAPP en suero) en lugar de 22 estudios de laboratorio que se utilizan en la actualidad en la clínica [63,68]. Si bien los resultados obtenidos en el presente estudio no permite el uso del punto de corte de OC como el valor recomendable para los clínicos, ya que los estimadores de parámetros de “diagnostic accuracy” obtenidos presentaron intervalos de confianza muy amplias, los resultados fueron “encourageables” para llevar a cabo un estudio con mayor tamaño de muestra enfocándose en niños con obesidad

En tercer lugar, proponemos una nueva fisiopatología de la evolución de las enfermedades conformacionales, empezando desde la edad pediátrica en donde la obesidad es la piedra de toque de las futuras comorbilidades como la DM, las enfermedades cardiovasculares, las enfermedades neurodegenerativas y algunos cánceres.

Desde el punto de vista de salud pública los resultados son trascendentales ya que permiten lanzar la alerta epidemiológica de que la obesidad puede ser una enfermedad transmisible de tipo de las prion-like enfermedades. Por lo tanto sería altamente recomendable iniciar una investigación sistemática en los bancos de sangre, de la cantidad de oligómeros de hIAPP presentes en las muestras usadas para transfusión sanguínea.

Esta tesis cierra la brecha que existe entre la investigación biomédica básica y la atención sanitaria especializada en los hospitales de tercer nivel. Es una investigación de proteómica translacional exitosa y confiamos que sea un parteaguas para la mejora de la atención de nuestros niños y adolescentes con obesidad.

CONCLUSIONES

Somos pioneros en demostrar que los niños con obesidad producen homo y hetero-oligómeros de hIAPP, aumentan con el progreso de la obesidad, circulan en el torrente sanguíneo, se pueden aislar del plasma y ser cuantificados por inmunoensayo con anticuerpos específicos.

Los OC son una buena posibilidad de identificar los casos con daños de células beta, la cual puede sustituir múltiples mediciones clínicas y bioquímicas.

El valor de OC en niños con obesidad permite identificar a niños de riesgo alto de comorbilidades. El incremento de una unidad de OC incrementa OR de 2.40 [1.37-4.36] $p < 0.001$, es decir, la probabilidad de tener riesgo alto de daño de células beta es 2.40 veces mayor el riesgo de comorbilidades, al comparar con el valor en dos diferentes individuos.

Fuimos capaces de identificar el punto de corte de OC por curva ROC ($OC \geq 3.35$), con una sensibilidad de 0.93 y una especificidad de 0.79, como biomarcador de mayor daño a célula beta para niños con obesidad de alto riesgo cardiometabólico (comorbilidades graves presentes: dislipidemia, hiperglucemia de ayuno (> 85 mg/dL), elevación de ALT (> 22 UI/mL) o alteración funcional de células β (resistencia a la insulina HOMA y Péptido C de ayuno). Es decir, que un valor bajo de OC (< 3.35) sugiere la integridad del funcionamiento de células β ($p < 0.001$).

Si bien los resultados obtenidos en el presente estudio no permite el uso del punto de corte de OC como el valor recomendable para los clínicos, ya que los estimadores de parámetros de "diagnostic accuracy" obtenidos presentaron intervalos de confianza muy amplias, los resultados fueron "encourageables" para llevar a cabo un estudio con mayor tamaño de muestra enfocándose en niños con obesidad

Ello podría significar que el OC tendría un papel fundamental para diferenciar entre niños con obesidad de bajo y alto riesgo cardiometabólico, como un tamizaje inicial, lo que significa un cambio en el abordaje diagnóstico del niño con obesidad con disminución del costo directo, indirecto e intangible que actualmente implica el atender un niño con obesidad, es decir que en lugar de realizar todo el abordaje bioquímico (22 variables) se puede distinguir con una sola determinación de OC entre el niño sólo con obesidad “metabólicamente sana” y el niño con obesidad asociada con síndrome metabólico.

Un factor esencial del nivel de OC bajo en los niños con obesidad es la realización de ejercicio, lo que refuerza la importancia de la actividad física como un elemento decisivo en el abordaje terapéutico del niño con obesidad para disminuir el riesgo cardiometabólico,

BIBLIOGRAFÍA

1. Schulze MB. Metabolic health in normal-weight and obese individuals. *Diabetologia*. *Diabetologia*; 2019;62:558–66.
2. Wells JCK, Fewtrell MS, Williams JE, Haroun D, Lawson MS, Cole TJ. Body composition in normal weight, overweight and obese children: matched case-control analyses of total and regional tissue masses, and body composition trends in relation to relative weight. *Int. J. Obes. (Lond)*. [Internet]. 2006 [cited 2016 Jul 29];30:1506–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16770333>
3. Bengoa R. Los casos de diabetes podrían duplicarse en los países en desarrollo durante los próximos 30 años. OMS. 2012. p.
4. Gómez F, Tamayo MT, Estela B, Herrera A, Altamirano-Bustamante N, Barquera S, et al. Consenso de expertos sobre prevención, diagnóstico y tratamiento de la obesidad en edad pediátrica. Available from: www.himfg.edu.mx
5. Despa S, Margulies KB, Chen L, Knowlton AA, Havel PJ, Taegtmeyer H, et al. Hyperamylinemia Contributes to Cardiac Dysfunction in Obesity and Diabetes: A Study in Humans and Rats. *Circ. Res.* [Internet]. 2012;110:598–608. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22275486>
6. Barbosa-Cortés L, López-Alarcón M, Mejía-Arangur JM, Klünder-Klünder M, del Carmen Rodríguez-Zepeda M, Rivera-Márquez H, et al. Adipokines, insulin resistance, and adiposity as a predictors of metabolic syndrome in child survivors of lymphoma and acute lymphoblastic leukemia of a developing country. *BMC Cancer*. BioMed Central Ltd.; 2017;17.
7. Zhao WQ, Townsend M. Insulin resistance and amyloidogenesis as common molecular foundation for type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Biochim.Biophys.Acta*. p. 482–96.
8. Puttabyatappa M, Sargis RM, Padmanabhan V. Developmental programming of insulin resistance: are androgens the culprits? *J. Endocrinol.* [Internet]. BioScientifica Ltd.; 2020 [cited 2020 Sep 6];245:R23–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32240982>
9. Sengupta U, Nilson AN, Kaye R. The Role of Amyloid-?? Oligomers in Toxicity, Propagation, and Immunotherapy. *EBioMedicine*. The Authors; 2016;6:42–9.

10. Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat. Rev. Endocrinol.* [Internet]. 2019 [cited 2019 Jun 10];15:288–98. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41574-019-0176-8>
11. Profenno LA, Porsteinsson AP, Faraone S V. Meta-analysis of Alzheimer's disease risk with obesity, diabetes, and related disorders. *Biol. Psychiatry.* p. 505–12.
12. Nilsson E, Ling C. DNA methylation links genetics, fetal environment, and an unhealthy lifestyle to the development of type 2 diabetes. *Clin. Epigenetics.* BioMed Central Ltd.; 2017.
13. Morrison JA, Friedman LA, Wang P, Glueck CJ. Metabolic Syndrome in Childhood Predicts Adult Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes Mellitus 25 to 30 Years Later. *J. Pediatr.* 2008;152:201–6.
14. Phillips CM. Metabolically healthy obesity across the life course: epidemiology, determinants, and implications. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* Blackwell Publishing Inc.; 2017. p. 85–100.
15. Eckel RH, Jakicic JM, Ard JD, De Jesus JM, Houston Miller N, Hubbard VS, et al. 2013 AHA/ACC guideline on lifestyle management to reduce cardiovascular risk: A report of the American college of cardiology/American heart association task force on practice guidelines. *J. Am. Coll. Cardiol.* Elsevier USA; 2014;63:2960–84.
16. Peirce V, Carobbio S, Vidal-Puig A. The different shades of fat. *Nature.* Nature Publishing Group; 2014. p. 76–83.
17. Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006. p. 885–96.
18. Rosen ED, Spiegelman BM. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature.* Nature Publishing Group; 2006. p. 847–53.
19. Tchernof A, Després JP. Pathophysiology of human visceral obesity: An update. *Physiol. Rev.* 2013;93:359–404.
20. Yi Z, Stunz LL, Bishop GA. CD40-mediated maintenance of immune homeostasis in the adipose tissue microenvironment. *Diabetes.* American Diabetes Association Inc.; 2014;63:2751–60.
21. Shanik MH, Xu Y, Skrha J, Dankner R, Zick Y, Roth J. Insulin resistance and

- hyperinsulinemia: is hyperinsulinemia the cart or the horse? [Internet]. *Diabetes Care*. *Diabetes Care*; 2008 [cited 2020 Sep 6]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18227495/>
22. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. Springer-Verlag; 1985;28:412–9.
23. Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care*. 2004. p. 1487–95.
24. Gutch M, Kumar S, Razi SM, Gupta K, Gupta A. Assessment of insulin sensitivity/resistance. *Indian J. Endocrinol. Metab. Medknow Publications*; 2015;19:160–4.
25. Altamirano-Bustamante NF, Altamirano-Bustamante MM, Valderrama-Hernández A, Montesinos-Correa H. Growth evaluation: Nutritional status. *Acta Pediatr. Mex.* 2014;35.
26. Sahakyan KR, Somers VK, Rodriguez-Escudero JP, Hodge DO, Carter RE, Sochor O, et al. Normal-weight central obesity: Implications for total and cardiovascular mortality. *Ann. Intern. Med. American College of Physicians*; 2015;163:827–35.
27. Fernández JR, Redden DT, Pietrobelli A, Allison DB. Waist circumference percentiles in nationally representative samples of African-American, European-American, and Mexican-American children and adolescents. *J. Pediatr.* 2004;145:439–44.
28. Dentelli P, Barale C, Togliatto G, Trombetta A, Olgasi C, Gili M, et al. A diabetic milieu promotes OCT4 and NANOG production in human visceral-derived adipose stem cells. *Diabetologia*. 2013;56:173–84.
29. Talchai C, Xuan S, Lin H V., Sussel L, Accili D. Pancreatic β cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic β cell failure. *Cell*. 2012;150:1223–34.
30. Glovaci D, Fan W, Wong ND. Epidemiology of Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease. *Curr. Cardiol. Rep.* [Internet]. 2019 [cited 2019 Jun 10];21:21. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11886-019-1107-y>

31. Avila-Vazquez M, Altamirano-Bustamante N, Altamirano-Bustamante M. Amyloid Biomarkers in Conformational Diseases at Face Value: A Systematic Review. *Molecules* [Internet]. 2017;23:79. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/23/1/79>
32. L.-M. Y, A. V. Molecular characterization of the hetero-assembly of beta-amyloid peptide with islet [Internet]. *Curr. Pharm. Des.* A. Kapurniotu, Division of Peptide Biochemistry, Technische Universitat Munchen, Emil-Erlenmeyer-Forum 5, D-85354 Freising, Germany. E-mail: akapurniotu@wzw.tum.de; Bentham Science Publishers B.V. (P.O. Box 294, Bussum 1400 AG, Netherlands); 2014. p. 1182–91. Available from: <http://www.ingentaconnect.com/content/ben/cpd>
33. Lin JC, Liu HL. Protein conformational diseases: from mechanisms to drug designs. *Curr. Drug Discov. Technol.* p. 145–53.
34. Chiti F, Dobson CM. Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annu. Rev. Biochem.* [Internet]. 2017;86:27–68. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-biochem-061516-045115>
35. Carrell RW, Lomas DA. Conformational disease. *Lancet* [Internet]. 1997;350:134–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673697020734>
36. Chiti F, Dobson CM, Dikic I, Hartl FU, Sontag EM, Samant RS, et al. Structural Studies of Amyloid Proteins at the Molecular Level. *Annu. Rev. Biochem.* [Internet]. 2017;86:193–224. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-biochem-061516-045104>
37. Clarke EE, Shearman MS. Quantitation of amyloid-beta peptides in biological milieu using a novel homogeneous time-resolved fluorescence (HTRF) assay. *J. Neurosci. Methods* [Internet]. 2000;102:61–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11000412>
38. Clark A, Cooper GJS, Lewis CE, Morris JF, Willis AC, Reid KB, et al. Islet amyloid: a complication of islet dysfunction or an aetiological factor in Type 2 diabetes? *Diabetologia* [Internet]. 1st ed. Springer-Verlag; 2004 [cited 2016 Jul 16];48:157–69. Available from:

<http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/307/5708/380>

39. Raleigh D, Zhang X, Hastoy B, Clark A. The β -cell assassin: IAPP cytotoxicity. *J. Mol. Endocrinol.* [Internet]. 2017 [cited 2019 Jun 1];59:R121–40. Available from: <https://jme.bioscientifica.com/view/journals/jme/59/3/JME-17-0105.xml>
40. Dobson CM. Protein misfolding, evolution and disease. *Trends Biochem.* p. 329–32.
41. Fawver JN, Duong KT, Wise-scira O, Petrofes R, Schall HE, Coskuner O, et al. Probing and Trapping a Sensitive Conformation : Amyloid- β Fibrils , Oligomers , and Dimers. 2012;32:197–215.
42. Eisenberg D, Jucker M. The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell* [Internet]. 2012;148:1188–203. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009286741200222X>
43. Sawaya MR, Sambashivan S, Nelson R, Ivanova MI, Sievers SA, Apostol MI, et al. Atomic structures of amyloid cross- β spines reveal varied steric zippers. *Nature.* 2007;447:453–7.
44. Jiang L, Liu C, Leibly D, Landau M, Zhao M, Hughes MP, et al. Structure-based discovery of fiber-binding compounds that reduce the cytotoxicity of amyloid beta. *Elife.* 2013;2013:1–27.
45. Landau M, Sawaya MR, Faull KF, Laganowsky A, Jiang L, Sievers SA, et al. Towards a pharmacophore for amyloid. *PLoS Biol.* 2011;9:e1001080.
46. Eisenberg DS, Sawaya MR. Structural Studies of Amyloid Proteins at the Molecular Level. *Annu. Rev. Biochem.* [Internet]. 2017;86:69–95. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-biochem-061516-045104>
47. Yerbury JJ, Stewart EM, Wyatt AR, Wilson MR. Quality control of protein folding in extracellular space. *EMBO Rep.* p. 1131–6.
48. Stroud JC, Liu C, Teng PK, Eisenberg D. Toxic fibrillar oligomers of amyloid- β have cross- β structure. 2012;109:7717–22.
49. Riek R, Eisenberg DS. The activities of amyloids from a structural perspective. *Nature* [Internet]. 2016;539:227–35. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature20416> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27830791>

50. Soong R, Brender JR, Macdonald PM, Ramamoorthy A. Association of highly compact type II diabetes related islet amyloid polypeptide intermediate species at physiological temperature revealed by diffusion NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 2009;131:7079–85.
51. Peinado JR, Sami F, Rajpurohit N, Lindberg I. Blockade of islet amyloid polypeptide fibrillation and cytotoxicity by the secretory chaperones 7B2 and proSAAS. *FEBS Lett.* [Internet]. NIH Public Access; 2013 [cited 2017 Apr 22];587:3406–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24042052>
52. Mukherjee A, Scheihing DM, Salvadores N, Gonzalez IM, Gonzalez C, Presse KT, et al. Induction of IAPP amyloid deposition and associated diabetic abnormalities by a prion-like mechanism *The Journal of Experimental Medicine.* 2017;2591–610.
53. Wiltzius JJW, Sievers SA, Sawaya MR, Eisenberg D. Atomic structures of IAPP (amylin) fusions suggest a mechanism for fibrillation and the role of insulin in the process. *Protein Sci.* 2009;18:1521–30.
54. Patel HR, Pithadia AS, Brender JR, Fierke CA, Ramamoorthy A. In search of aggregation pathways of IAPP and other amyloidogenic proteins: Finding answers through NMR spectroscopy. *J. Phys. Chem. Lett. American Chemical Society;* 2014. p. 1864–70.
55. Kaye R, Glabe CG. Conformation-dependent anti-amyloid oligomer antibodies. *Methods Enzym.* 2006. p. 326–44.
56. Kaye R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, et al. Common Structure of Soluble Amyloid Oligomers Implies Common Mechanism of Pathogenesis. *Science (80-.).* [Internet]. 2003 [cited 2016 Jul 16];300:486–9. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1079469>
57. Nicolls MR. The clinical and biological relationship between Type II diabetes mellitus and Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* p. 47–54.
58. Glabe C, Kaye R. Monoclonal antibodies specific for high molecular weight aggregation intermediates common to amyloids formed from proteins of differing sequence. 2004; Available from: <http://www.google.com/patents/US20070110750%5Cnpapers2://publication/uuid/C>

B69178E-C566-43FB-8775-3BC6D4A9C4B6

59. Udayasankar J, Kodama K, Hull RL, Zraika S, Aston-Mourney K, Subramanian SL, et al. Amyloid formation results in recurrence of hyperglycaemia following transplantation of human IAPP transgenic mouse islets. *Diabetologia*. 2009;52:145–53.
60. Haataja L, Gurlo T, Huang CJ, Butler PC. Islet amyloid in type 2 diabetes, and the toxic oligomer hypothesis. *Endocr. Rev.* 2008;29:303–16.
61. Mongraw-Chaffin M, Foster MC, Kalyani RR, Vaidya D, Burke GL, Woodward M, et al. Obesity severity and duration are associated with incident metabolic syndrome: Evidence against metabolically healthy obesity from the multi-ethnic study of atherosclerosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab. Endocrine Society*; 2016;101:4117–24.
62. Eckel N, Li Y, Kuxhaus O, Stefan N, Hu FB, Schulze MB. Transition from metabolic healthy to unhealthy phenotypes and association with cardiovascular disease risk across BMI categories in 90 257 women (the Nurses' Health Study): 30 year follow-up from a prospective cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* [Internet]. Lancet Publishing Group; 2018 [cited 2020 Sep 7];6:714–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29859908/>
63. Stefan N, Schick F, Häring HU. Causes, Characteristics, and Consequences of Metabolically Unhealthy Normal Weight in Humans. *Cell Metab.* 2017;26:292–300.
64. Stefan N, Häring HU, Schulze MB. Metabolically healthy obesity: the low-hanging fruit in obesity treatment? *Lancet Diabetes Endocrinol.* Lancet Publishing Group; 2018. p. 249–58.
65. Altamirano-Bustamante MM, Altamirano-Bustamante NF, Larralde-Laborde M, Lara-Martínez R, Leyva-García E, Garrido-Magaña E, et al. Unpacking the aggregation-oligomerization-fibrillization process of naturally-occurring hIAPP amyloid oligomers isolated directly from sera of children with obesity or diabetes mellitus. *Sci. Rep.* [Internet]. 2019;9:18465. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54570-8>
66. Shigihara N, Fukunaka A, Hara A, Komiya K, Honda A, Uchida T, et al. Human IAPP-induced pancreatic β cell toxicity and its regulation by autophagy. *J. Clin.*

Invest. [Internet]. 2014;124:3634–44. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25036706>

67. Eisenberg D, Jucker M. The amyloid state of proteins in human diseases. Cell

[Internet]. Elsevier Inc.; 2012;148:1188–203. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.022>

68. Arenaza L, Medrano M, Amasene M, Rodríguez-Vigil B, Díez I, Graña M, et al.

Prevention of diabetes in overweight/obese children through a family based intervention program including supervised exercise (PREDIKID project): Study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. BioMed Central Ltd.; 2017;18.

ANEXO1.FIGURAS

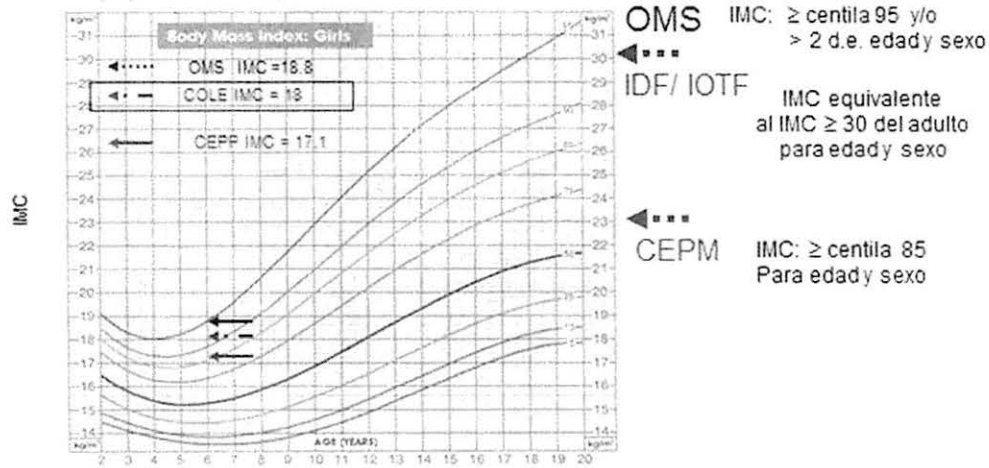


Figura 1. Criterios diagnósticos de obesidad. Se basa, a partir de los dos años de edad, en el comportamiento del índice de masa corporal (IMC), pero NO existe una definición internacionalmente aceptada. La Organización Mundial de la Salud (OMS) la define como un IMC para edad y sexo \geq centila 95 y/ $>$ 2 desviaciones estándar. La Federación Internacional de Diabetes (IDF) y la International Obesity Task Force (IOTF) se basan para definirlo de acuerdo con los criterios del adulto. El IMC equivalente al IMC \geq 30 del adulto para edad y sexo. Por ejemplo en una niña de 6 años se requiere un IMC mayor de acuerdo con la OMS para hacer el diagnóstico comparado con los criterios de la IDF (18.8 Kg/m² versus 18 Kg/m²). Como México es un país de alta prevalencia El Consenso de Endocrinólogos Pediatras (CEPM) estableció que obesidad en niños es un IMC \geq centila 85 para edad y sexo a partir de los dos años de edad, en aras de establecer el diagnóstico más temprano, en la niña de 6 años equvale a un IMC de 17.1 Kg/m². (Altamirano-Bustamante et al. 2014)

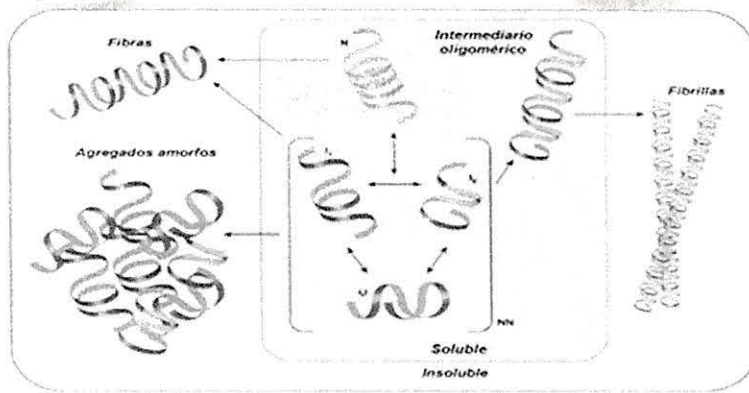


Figura 2. (modificado de Yerruri y col⁴²). Esquema del proceso de agregación. N es la estructura nativa, NN es la estructura no nativa. I1 e I2 son Intermedios y especies parcialmente plegadas. D es la forma desplegada de la proteína. Las estructuras no nativas tienden a asociarse entre ellas y formar agregados. Las formas solubles se muestran en el recuadro azul.

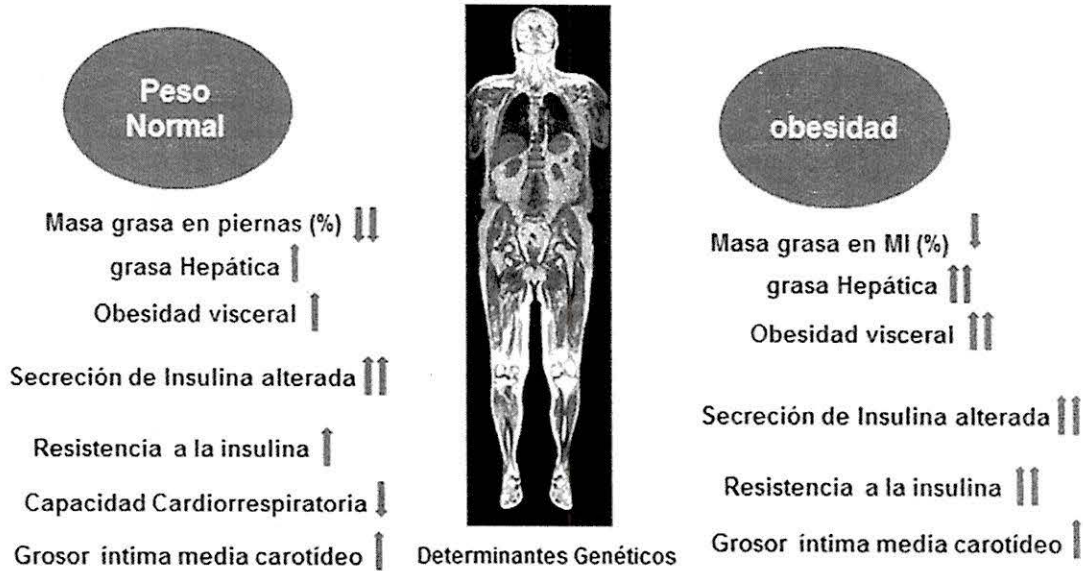


Figura 3. Fenotipos del sujeto «metabólicamente enfermo». Las flechas indican como es la expresión del fenotipo. Stefan N., et al. Cell Metabolism 2017; 26:292-300.

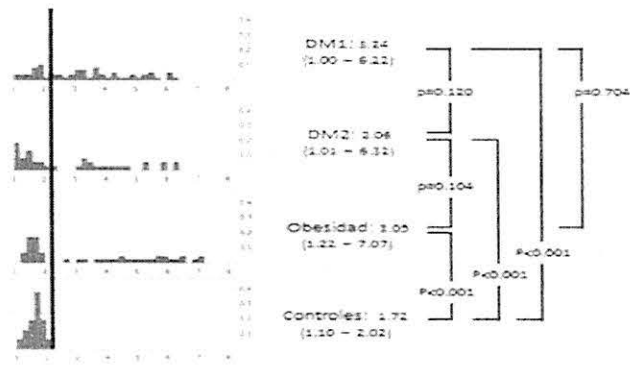


Figura 5 Distribución de los oligómeros citotóxicos en los cuatro grupo. La comparación de los resultados entre los grupos se realizó por prueba de Welch.

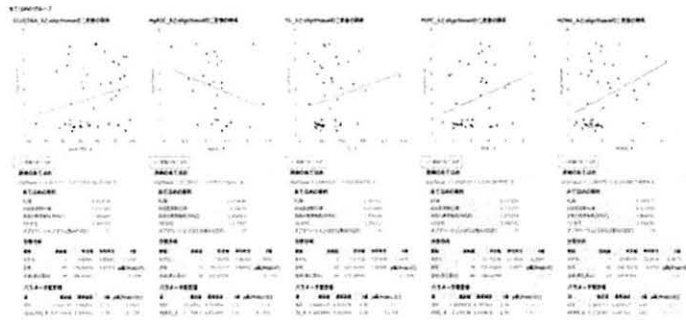


Figura 6: Regresión lineal del Efecto de gluco y lipotoxicidad sobre la concentración de oligómeros citotóxicos.

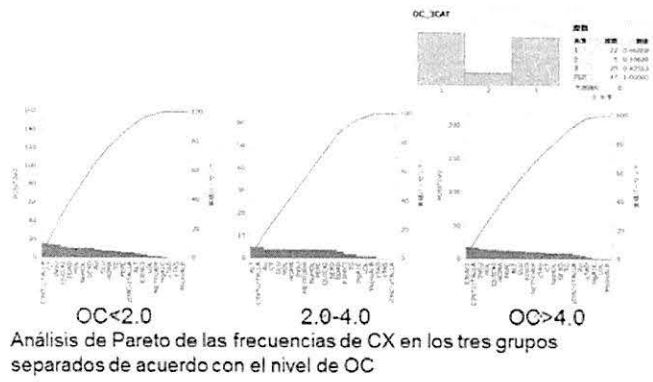


Figura 8. Análisis de Pareto para correlacionar complicaciones crónicas con las categorías de oligómeros citotóxicos.

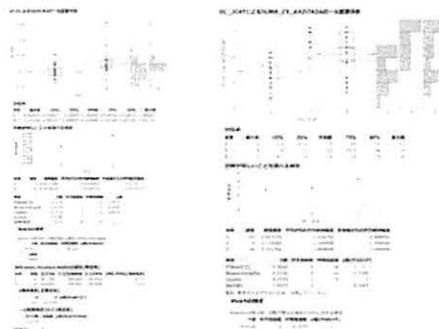


Figura 9. Suma de complicaciones de acuerdo con las categorías de oligómeros citotóxicos.

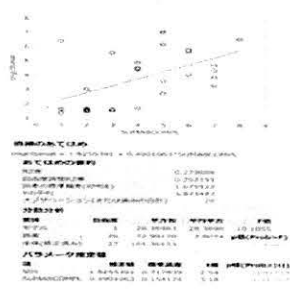


Figura 10. Relacion entre Suma de complicaciones y el valor de oligómeros citotóxicos.

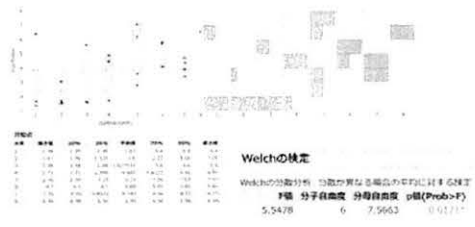


Figura 11. Relación entre comorbilidades y valor de oligómero citotóxico P = 0.071

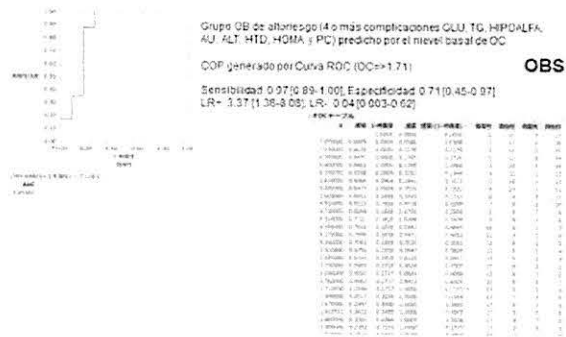


Figura 13. curva ROC. En presencia de ≥ 4 comorbilidades, el nivel de Oligómero citotóxico de 1.71 como el mejor punto de corte, el cual corresponde a la sensibilidad de 1.00 y especificidad de 0.73 $p=0.001$.

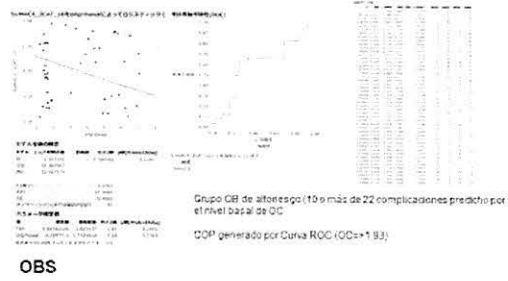


Figura 14 Análisis de regresión logística entre la presencia de $\geq 10/22$ comorbilidades y valor de oligómero citotóxico de 1.93 ($p=0.124$)

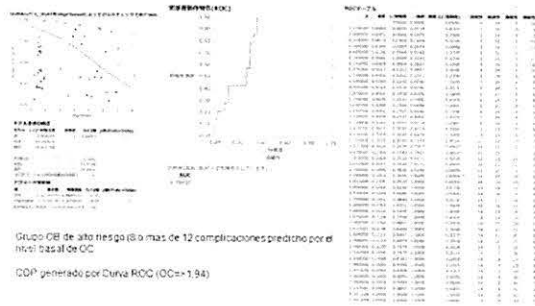


Figura 15. Analisis de regresión logística entre la presencia de 9/12 comorbilidades y valor de oligómero citotóxico y establece el punto de corte por curva ROC de (OC=>3.35) con una Sensibilidad de 0.100 y una especificidad de 0.74. (p = 0.001)

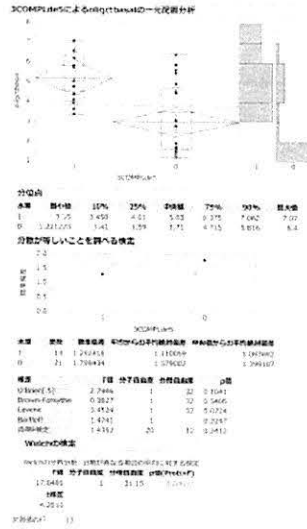


Figura 17. Si un niño presenta tres o más comorbilidades, la mediana de OC es mayor comparando con los niños con dos o menos (medianas: 5.02 [IQR: 2.3]; 1.71 [IQR: 3.1], Prueba de Welch: p<0.001)

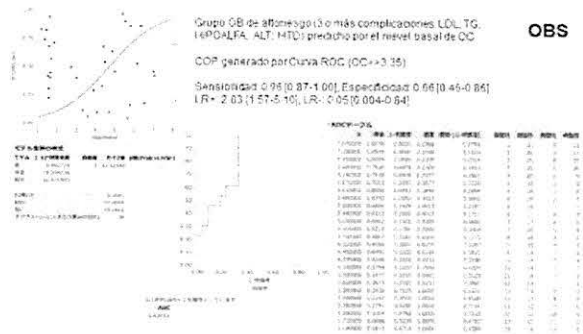


Figura 18. Regresión logística el nivel de OC permite identificar los caso con riesgo alto de daño a la célula beta (≥ 3 complicaciones presentes) (p<0.001). La curva ROC sugirió el nivel de OC de 3.35 como el mejor punto de corte, el cual corresponde a la sensibilidad de 0.96 y especificidad de 0.66.

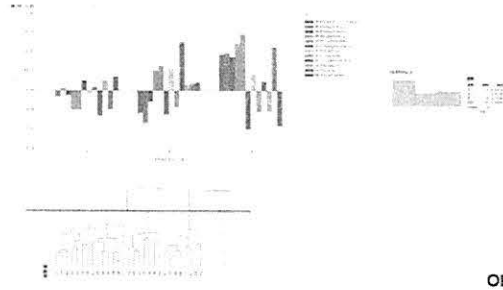


Figura 19. Análisis de conglomerado que nos permite distinguir 3 clusters que se pueden tipificar sus perfiles como: obesidad "sana", obesidad ginecoide; y obesidad androide.

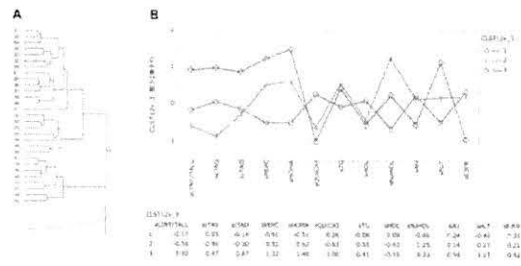


Figura 20. Análisis de conglomerado que nos permite distinguir pacientes con mayor daño a célula beta. A dendrograma obtenido por el método jerárquico. B. Perfil de los tres cluster de sujetos caracterizados por 12 variables incluidas en el análisis. Cluster 1. obesidad "sana"; Cluster 2. Obesidad ginecoide; Cluster 3. Obesidad androide.

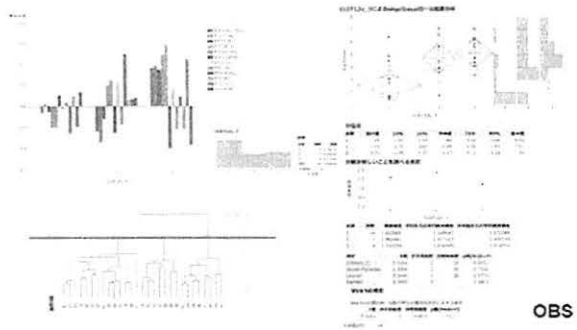


Figura 22. Asociación del valor de OC con cluster de bajo riesgo (obesidad sana) vs clusters de alto riesgo (obesidad androide+ obesidad ginecoide) ($p < 0.001$).

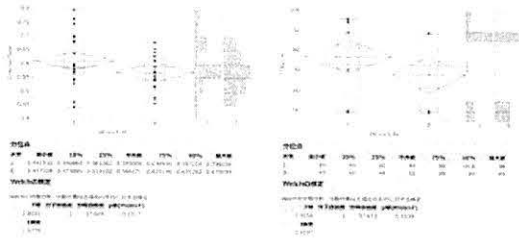


Figura 24. Relación cintura/talla tiende a ser mayor en el grupo de alto riesgo [0.585 (IQ 0.123) vs 0.566(IQ 0.101), p= 0.101].

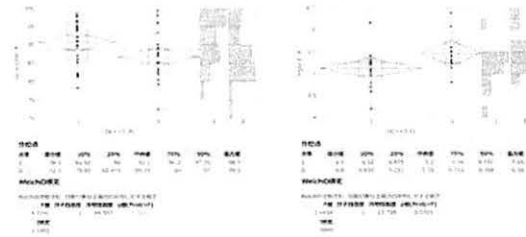


Figura 25. Glucosa más alta en el grupo de alto riesgo [92.1 (IQ 10.2) vs 85.3 (IQ 8.5), p= 0.034] Hb A1c limitrofe (p=0.07).

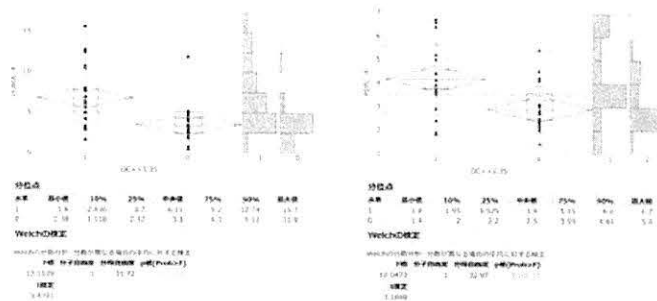


Figura 26. HOMA es mayor en el grupo de alto riesgo [6.1 (IQ 5.5) vs 3.3 (IQ 2.0), p= 0.001]. Péptido C más alto: [3.6 (IQ 1.6) vs 2.5 (IQ 1.4), p= 0.003].

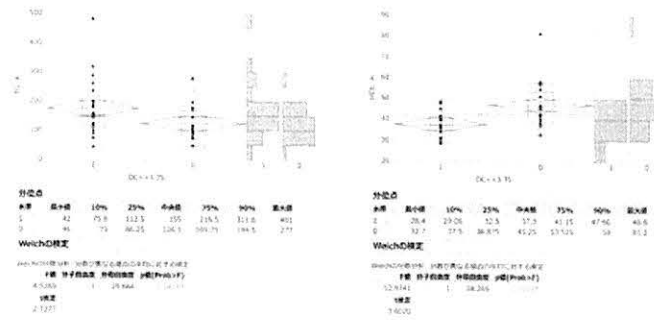


Figura 27. En el grupo de riesgo Triglicéridos: más altos [155 (IQ 104) vs 107 (IQ 83), p= 0.041]. Colesterol HDL más bajo. [37.5 (IQ 9) vs 45.2 (IQ 14), p< 0.001].

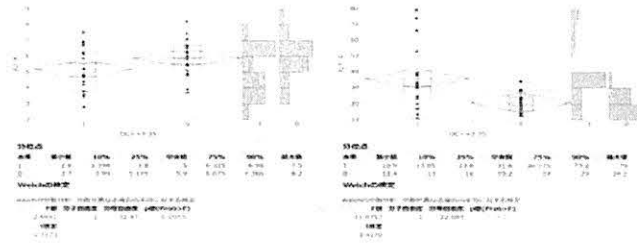


Figura 28. En el grupo de alto riesgo: Ácido úrico: tiende a ser más bajo; [5.0 (IQ 2.5) vs 5.9 (IQ 1.5), p= 0.095]. ALT más alta; [31.6 (IQ 14) vs 19.6 (IQ 9), p= 0.002].

ANEXO2.CUADROS

Componentes*	Definición en adultos ATP III-NHANES+ /Wildman*	IDF 10-16 AÑOS	IDF > 16 años	Perfil pediátrico crudo COOK	Perfil pediátrico ajustado NHANES III
1. Hipertensión**	≥ 150/95 mmHg o Tx con AHT	≥ 130/≥ 85	≥ 130/95	≥ centila 90 edad, sexo y talla	≥ centila 90 edad, sexo y talla
2. Triglicéridos ayuno**	≥ 150 mg/dL	≥ 150 mg/dL	≥ 150 mg/dL	≥ 110 mg/dL	≥ centila 90 edad y raza
3. Col-HDL ayuno**	$\begin{matrix} \geq 40 \text{ mg/dL} \\ \geq 50 \text{ mg/dL} \end{matrix}$ Tx con antilipemiantes	$\geq 40 \text{ mg/dL}$	$\begin{matrix} \geq 40 \text{ mg/dL} \\ \geq 50 \text{ mg/dL} \end{matrix}$	≤ 40 mg/dL	≤ centila 10 para edad y raza $\geq 40 \text{ mg/dL}$
4. Glucosa ayunas**	≥ 100 mg/dL o Tx con HPO o con insulina	≥ 100 mg/dL	≥ 100 mg/dL	≥ 100 mg/dL	≥ 100 mg/dL
Obesidad central + (cintura)	$\begin{matrix} > 102 \text{ cm}^2 \\ > 88 \text{ cm}^2 \end{matrix}$	Centila ≥ 90	$\begin{matrix} \geq 90 \text{ cm}^2 \\ \geq 80 \text{ cm}^2 \end{matrix}$	≥ centila 90 77	≥ centila 90 edad, sexo, raza
5. Proteína C reactiva *	≥ centila 90				
6. HOMA *	≥ centila 90				

Cuadro 1. Criterios diagnósticos de síndrome metabólico (SM). +1-4 Parámetros de SM definidos por el NCEP (National Cholesterol Education Program) y ATP III (Adult Treatment Panel III) (2005). *1-6 Componentes propuestos por Wildman et al. (2008) en base a NHANES III (Third National Health and Nutrition Examination Survey). IDF (Federación Internacional de Diabetes). Menos de dos componentes «metabólicamente sanos», SM. Presencia de 3 o más componentes. Tx tratamiento. HPO hipoglucemiantes orales. AHT antihipertensivos. Wildman et al. Arch. Intern. Med. 2008; 168: 1617-1624. Gabriel et al. J. Pediatric 2008; 152: 171-176.

WEISS	DE FERRANTI	VINER	COOK	NHANES III
Obesidad IMC \geq centila 97 edad, sexo	Cintura $>$ centila 75	IMC \geq centila 97	Cintura \geq centila	Cintura \geq centila 75 raza
Intolerancia a la glucosa (IG) en ayuno \geq 100 mg/dL	\geq 100 mg/dL	IG en ayuno o CTOG Insulina ayuno (\geq 15,30,20 mU/L)*	\geq 100 mg/dL	\geq 100 mg/dL
Presión arterial \geq centila 90 edad, sexo, raza	\geq centila 95 edad, sexo y talla	\geq centila 95 edad, sexo y talla	\geq centila 90 edad, sexo y talla	\geq centila 90 edad, sexo y talla
Triglicéridos \geq 150 mg/dL	\geq 100 mg/dL	\geq 150 mg/dL	\geq 110 mg/dL	\geq centila 90 edad y raza
Col-HDL \leq 40 mg/dL	\leq 50 mg/dL o $<$ 45mg/dL	\leq 35 mg/dL o CT \geq 200 mg/dL	\leq 40 mg/dL	\leq centila 10 para edad y raza

Cuadro 2. Criterios diagnósticos de síndrome metabólico en Pediatría. No existe una definición universalmente aceptada, pero el más utilizado es el modificado en base a NHANES III (Third National Health and Nutrition Examination Survey). La presencia de al menos tres componentes se requieren para el diagnóstico. IMC índice de masa corporal, CTOG curva de tolerancia a la glucosa, *insulina en prepuberal, pubertad temprana y postpuberal). Reinehr T et al. Atherosclerosis (2007), doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2007.09.041

	Control (N=16)	Obesidad (N=47)	DM2 (N=39)	DM1 (N=60)	P
Sex o/fem, n (%)	8 (50%)	23 (49%)	21 (54%)	28 (47%)	0,920
Edad [meses]	163 (109, 183)	159 (56, 201)	170 (36, 216)	161 (26, 217)	0,387
PZ/IMC (DE)	0,53 (-0,25, 1,00)	1,89 (-0,26, 3,96)	1,40 (-2,24, 3,52)	0,29 (-1,86, 2,40)	<0,001
Evolución [meses]	---	---	21 (0, 101)	36 (0, 168)	<0,001
Glucosa [mg/dL]	86 (71, 95)	88 (72, 99)	119 (77, 369)	233 (67, 619)	<0,001
HbA1c [%]	5,2 (4,8, 6,0)	5,2 (4,2, 6,4)	6,9 (5,0, 13,7)	9,7 (4,8, 14,8)	<0,001
Colesterol Total [mg/dL]	139 (74, 209)	157 (97, 239)	163 (100, 312)	171 (121, 437)	0,008
Colesterol-HDL [mg/dL]	50 (33, 61)	40 (28, 81)	42 (23, 72)	48 (30, 68)	0,005
Triglicéridos (mg/dL)	36 (52, 121)	120 (42, 481)	117 (38, 552)	82 (32, 913)	<0,001
Ácido Úrico (mg/dL)	4,7 (3,7, 6,8)	5,7 (2,8, 8,2)	4,9 (2,8, 9,1)	3,9 (2,0, 11,3)	<0,001
InsulinaTx.	---	---	16 (41%)	56 (93%)	<0,001
Dosis insulina (UI/Kg/día)	---	---	0,58 (0,22, 1,14)	0,71 (0,08, 1,84)	0,017

Cuadro 3. Características clínicas y metabólicas de la población. DM2 diabetes mellitus tipo 2, DM1 diabetes mellitus tipo 1, Fem femenino, PZ/IMC (DE) puntuación zeta del índice de masa corporal, desviación estándar, HbA1c Hemoglobina glucosilada, Tx tratamiento

	<2.0	2.0-4.0	>4.0
SEXOM	11/22 (50%)	4/5 (80%)	9/20 (45%)
EDAD ≥13años	11/22 (50%)	3/5 (60%)	11/20 (55%)
cTAS ≥P90	0/17 (0%)	0/5 (0%)	10/10 (100%)
cTAD ≥P90	0/17 (0%)	0/5 (0%)	3/20 (100%)
GLU >87.5	8/22 (36%)	4/5 (80%)	12/20 (60%)
HbA1C ≥5.7%	1/8 (12.5%)	1/4 (25%)	1/15 (7%)
Hiperinsulinemia Prez10, Puberz14	14/19 (74%)	4/5 (80%)	15/18 (83%)
PC ≥3.0	5/19 (26%)	4/5 (80%)	13/17 (76%)
HOMA Prez2.5, Puberz3.5	5/19 (26%)	4/5 (80%)	13/18 (72%)
TG >150	7/22 (32%)	2/5 (40%)	9/18 (50%)
CT >150	15/22 (68%)	4/5 (80%)	9/18 (50%)
HDL <45	11/22 (50%)	4/5 (80%)	14/18 (78%)
LDL ≥130	2/22 (9%)	1/5 (20%)	1/18 (6%)
No HDL ≥110	11/22 (50%)	4/5 (80%)	9/18 (50%)
AU >5.0	9/18 (50%)	4/5 (80%)	5/15 (40%)
ALT M>22, F>25	3/17 (29%)	5/5 (100%)	12/17 (71%)
MicroALB ≥20	0/1 (0%)	1/5 (20%)	1/12 (8%)
No Ejercicio	4/20 (20%)	2/5 (40%)	18/20 (90%)
Metformina Si	2/20 (10%)	4/5 (80%)	11/20 (55%)
SUMA C.X. 0 o más de 15	0 PX	4 PX	11PX

Cuadro 4. Características clínicas y metabólicas de acuerdo con concentración de oligómeros citotóxico divididos en tres categorías <2, 2-4 y >4.

OBS

	OR [95%CI]	P-Value
OC []	2.40 [1.37 – 4.36]	<0.001
OC \geq 3.35 [Yes]	51.32 [4.67 – 564.16]	0.001

Cuadro 5. Modelo por punto de corte de OC para grupos de riesgo alto (OC \geq 3.35) generó la razón de momios de 51.32 [IC95%: 4.67 – 564.16] (p=0.001).

Indicador	Chi cuadrado	p	Punto de corte	AUC	Sensibilidad	Especificidad
Glucosa	4.66	0.030	89.4 mg/dL	.669	0.65	0.71
Péptido C	9.54	0.002	3.5	.740	0.80	0.76
HOMA	12.25	<0.001	4.9	.794	0.67	0.80
Ácido úrico	3.02	0.081	4.9	0.643	0.50	0.80



Cuadro 6. Modelo de Regresión logística y curva ROC en búsqueda de punto de corte de 4 indicadores bioquímicos para identificar niños con obesidad de alto riesgo.

ANEXO 3. VARIABLES

Variable	Definición	Clasificación	Unidad
Formas de plegamiento anómalas (no nativas) del IAPP	Presencia de las formas de plegamiento anómalas	Cualitativa, Nominal, Dicotómica	0= No 1= Si
Formas de plegamiento anómalas (no nativas) del IAPP	Presencia de las formas de plegamiento anómalas	Cuantitativa numérica continua	valor
Grupo	Características Clínicas del sujeto	Cualitativa, Nominal, Politómica	4= DM2 3= DM1 2= obesidad 1= control
Pubertad femeninas	Estadio de Tanner mamario	Cualitativa ordinal	Estadio I Estadio II Estadio III Estadio IV Estadio V
Pubertad masculinos	Estadio de Tanner genital	Cualitativa ordinal	Estadio I Estadio II Estadio III Estadio IV Estadio V
Evolución de DM 1	Tiempo desde el diagnóstico de enfermedad	Cuantitativa Numérica discreta	Años cumplidos con meses
Evolución de DM 2	Tiempo desde el diagnóstico de enfermedad	Cuantitativa Numérica discreta	Años cumplidos con meses
HbA1c	Hemoglobina glucosilada	Cuantitativa Numérica, continua	Porcentaje
Sexo	Característica de los sujetos asociada a los sexocromosomas	Cualitativa, Nominal, Dicotómica	1= Femenino 2= Masculino
Edad	Tiempo transcurrido desde el nacimiento hasta el día de interés	Cuantitativa Numérica, Discreta	Años cumplidos con meses
IMC	Valor obtenido de dividir el peso entre el cuadrado de la talla	Cuantitativa Numérica, Continua	Kg/m ²
PZ IMC	Comparación del Valor obtenido de dividir el peso entre el cuadrado de la talla del paciente vs referencia	Cuantitativa Numérica, Continua	valor
Glucemia	Valores de glucosa en sangre	Cuantitativa Numérica, Continua	mg/dl
Dislipidemia	Presencia de hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia o hpoalfacolesterolemia	Cualitativa, Nominal, Dicotómica	0= No 1= Si

Colesterol total	Valores de colesterol total en sangre	Cuantitativa Numérica, Continua	mg/dl
Colesterol HDL	Valores de colesterol HDL en sangre	Cuantitativa Numérica, Continua	mg/dl
Colesterol LDL	Valores de colesterol LDL en sangre	Cuantitativa Numérica, Continua	mg/dl
Triglicéridos	Valores de triglic en sangre	Cuantitativa Numérica, Continua	mg/dl
insulina	Valor de insulina en ayunas	Cuantitativa Numérica, Continua	mUI/mL
HOMA	Valor obtenido de multiplicar glucosa por insulina en ayunas /405	Cuantitativa Numérica, Continua	valor
Síndrome metabólico	Presencia de síndrome metabólico de acuerdo con NHANES	Cualitativa, Nominal, Dicotómica	0= No 1= Si
Sobrepeso	De acuerdo con la OMS: IMC para edad y sexo \geq centila 75 pero $<$ centila 85	Cualitativa Numérica, Continua	0 = No 1 = sí
Obesidad	De acuerdo con la OMS: IMC para edad y sexo \geq centila 85	Cualitativa Numérica, Continua	0 = No 1 = sí
Diabetes mellitus tipo 1	destrucción autoinmune de las células β , que generalmente conduce a una deficiencia absoluta de insulina.	Cualitativa, Nominal, Dicotómica	0= No 1= Si
Diabetes mellitus tipo 2	pérdida progresiva de la secreción de insulina de las células β debido a resistencia a la insulina	Cualitativa, Nominal, Dicotómica	0= No 1= Si

ANEXO 4 HOJA DE CAPTURA



INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA

BIOMARCADORES TEMPRANOS DE FALLA DE LA CÉLULA β EN SUJETOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 1 Y SUJETOS CON OBESIDAD Y CON PREDIABETES

HOJA DE CAPTURA

NOMBRE _____ REGISTRO _____ CODIGO _____
 FECHA NACIMIENTO _____ SEXO _____ ENFERMEDAD PREVIA _____ ¿CUÁL? _____

No GESTA _____	SEG _____	PREMATURO/TERMINO _____	RCIU _____	PESO NACER _____	TALLA NACER _____
Edad telarca _____	Edad menarca _____	ciclos _____	FUR _____	Escolaridad _____	Promedio _____
AHF DM _____	AHF obesidad _____	AHF IAM/EVC _____	AHF HLP _____	AHF HTA _____	AHF GOTA/CANCER _____
APP ASMA _____					

	1ª Visita	Dx obesidad	Dx intolerancia	Dx DM	Inclusión
FECHA					
EDAD					
Tiempo evolución					
Talla					
Peso					
IMC					
Cintura					
Cadera					
TA					
Tanner M/G					
Glucosa/insulina ayuno					
Glucosa/insulina 120 min					
Péptico C ayuno/120 min					
HbA1c (%)					
Col total					
Col LDL					
Col HDL					
Triglicéridos					
Ac úrico					
Cambio de estilo de vida					
Alimentación					
Ejercicio					
Metformina					
Insulina					
IAAP nativo					
Formas de IAPP con plegamiento anómalo					

ANEXO 5



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

Carta de Consentimiento padres de adolescentes

Título del Estudio: BIOMARCADORES TEMPRANOS DE FALLA DE LA CÉLULA β EN SUJETOS CON DIABETES MELLITUS Y SUJETOS CON OBESIDAD O CON PREDIABETES.

México D.F. a _____ del mes _____ del año _____

El médico tratante de su hijo(a) Dra. _____, del Servicio de Endocrinología de este Instituto les invita para que su hijo(a) participe en un estudio de investigación. Este consentimiento es para que lo lea, entienda y firme si acepta y autoriza que su hijo(a) participe en este estudio.

¿Cuál es el propósito del estudio?

Los estudios de investigación se realizan para encontrar la mejor manera de resolver un problema. Se me ha informado que este estudio de investigación, es para saber **si existe algún marcador en la sangre de falla de las células beta del páncreas que producen la insulina para el diagnóstico temprano de diabetes mellitus.**

Los investigadores quieren averiguar si existe en la sangre una sustancia producida en la célula beta del páncreas que nos pueda ayudar a conocer en forma temprana, que la célula beta (la que produce insulina) se está destruyendo, es decir, antes de que el número de células beta muertas sea tan grande que no haya quien impida que se suba el azúcar en la sangre (glucosa sérica), o sea antes de que se diagnostique diabetes mellitus. Esto es un estudio de investigación. Se le está pidiendo autorización para que su hijo (a) participe en este estudio.

¿Tiene mi hijo(a) que estar en este estudio?

No. Sólomente participará si usted está de acuerdo. Aún si deciden aceptar, pueden dejarlo después si cambian de opinión, debe avisarle lo más rápido posible al médico. Tienen derecho a no participar en este estudio si no quieren, sin modificar la atención médica que recibe en esta institución. Pueden preguntar cualquier duda que tengan a la doctora encargada de este estudio de investigación.

¿Por qué fue elegido mi hijo(a) para participar en este estudio?

Porque es un paciente que recibe atención en el Servicio de Endocrinología de esta Institución, con diagnóstico de obesidad y con riesgo alto de presentar diabetes mellitus (azúcar alta en la sangre) o bien ya se confirmó el diagnóstico de diabetes mellitus tipo 1 (destrucción de la célula beta por lo que es dependiente de insulina) o tipo 2 (no insulino-dependiente).

¿Qué le sucederá en este estudio?

Debe su hijo(a) asistir en ayuno de 10 horas a una sola visita, al Servicio de Endocrinología, puede ser, si lo prefieren así, el día que ya tenga una cita programada o agendar una nueva fecha. Como es habitual en cada cita la doctora,

le preguntará cosas como su edad, que tratamiento lleva, que medicamentos toma, en qué momento está del desarrollo de niño a jovencito: “si ya huele a chivo en las axilas” o de niña a mujercita “si ya menstrua”. Le realizará exploración física completa: medición de peso, de talla, de cintura y de presión arterial. Buscará signos de daño a la célula beta (coloración negra en nuca, axila, entre las piernas), piel de gallina en brazos, muslos, pecho. Revisará los latidos de tu corazón y si respiran bien tus pulmones, características de tus pechos y de tus genitales.

Le tomará una muestra de sangre de una vena del brazo, de aproximadamente 3 cucharaditas, (menos de 9 mL), la que se meterá en una máquina tipo licuadora (centrífuga) para separar el suero, el cual se guardará en un tubo identificado por un código (no llevarán su nombre, es decir ningún dato confidencial). Estas muestras serán enviadas a la Dra. MMAB responsable del Laboratorio de Medicina Proteómica y Biocatálisis, de la Unidad de Investigaciones en Biología Molecular, del Hospital de Cardiología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, para almacenamiento y análisis posterior hasta el final de la investigación. Tendrán los resultados en 1 año aproximadamente. Estas muestras sólo serán utilizadas para los propósitos descritos en este asentimiento. No se realizarán estudios genéticos. Una vez que el estudio concluya las muestras serán desechadas de manera apropiada.

¿Le ayudará a mi hijo(a) estar en este estudio?

No hay ninguna garantía de que este estudio le ayudará. El daño a la célula beta puede estarse presentando, pero la investigación ser incapaz de demostrar la presencia de biomarcadores tempranos. La doctora responsable de su atención, ya le ha realizado los estudios necesarios a su hijo (a) y le ha dicho si tiene o no diabetes mellitus, grasas en la sangre altas y los valores de insulina normales o alterados y le ha dado el diagnóstico y el tratamiento específico.

Este estudio, podría contribuir a aumentar el conocimiento de cómo identificar el daño temprano de células beta y ésto podría beneficiar a otras personas en el futuro.

¿Quién paga por el estudio?

Todos los procedimientos relacionados con el estudio serán sin costo para usted o su familia. El cuidado médico que no está relacionado con el estudio seguirá siendo su responsabilidad.

¿Compensación?

No se les pagará por participar en este estudio de investigación.

¿Le puede pasar algo malo a mi hijo (a) si participa en este estudio?

Existe la posibilidad de que al tomarle la muestra con una aguja, pueda presentar dolor o malestar al momento del piquete, sudoración fría, sentirte mareado (a), moretón o infección en el sitio donde la aguja picó.

¿Qué sucede si algo sale mal?

El riesgo de infección es el más grave, pero también es rarísimo. Pero si se presenta su hijo(a) recibirá la atención inmediata y eficiente en su hospital para resolverlo sin costo para usted.

¿Qué sucederá con la información de mi hijo(a)?

Se les dará a conocer los resultados, independiente de si haya sido o no, exitosa la investigación: encontrar marcadores que en forma temprana hablen de daño a la célula beta. Su doctora tendrá la información registrada y la podrá compartir con otros

doctores en congresos de médicos o bien publicarla en revistas médicas para darla a conocer. Los resultados podrán tardarse hasta un año en obtenerse.

El nombre de su hijo(a) nunca será conocido, jamás lo diremos o lo publicaremos. Siempre se guardará la confidencialidad de la información de acuerdo con los reglamentos locales, protegiendo en todo momento la privacidad de su hijo(a).

Los investigadores participantes de este estudio necesitarán revisar la información médica disponible en el expediente clínico de su hijo(a) obtenida antes de la inclusión en este estudio y puede ser consultada y utilizada para los propósitos de este estudio si están de acuerdo en autorizar su participación en este estudio.

La información médica que será recolectada del expediente clínico incluye:

- Información obtenida de la historia clínica para determinar si puede ser seleccionado para participar en este estudio, para saber enfermedades familiares o enfermedades previas, cuántas semanas duró su gestación, peso al nacer, talla al nacer, tiempo de evolución de la obesidad, enfermedades asociadas.
- Resultados de estudios de laboratorio: glucosa e insulina en ayunas y después de la carga oral de glucosa, grasas en sangre, Hemoglobina glucosilada.
- Información sobre el tratamiento que está recibiendo y medicamentos que podría estar tomando.

De acuerdo con los reglamentos mexicanos pueden solicitar acceso o cancelación de su información personal por escrito a la doctora responsable de este estudio.

¿Puede ser retirado del estudio su hijo(a) sin su consentimiento?

No.

¿Con quién puedo platicar sobre el estudio?

Dra. Nelly F. Altamirano Bustamante _____ Servicio de Endocrinología, Instituto Nacional de Pediatría de 9:00 a 13:00 h, de lunes a viernes a los teléfonos: 10840900 ext. 1823.

Dra. Eulalia P. Garrido Magaña 9237313 _____ Servicio de Endocrinología, Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI Teléfono 56276900 ext 22292 de lunes a viernes de 8 a 14 h

Pueden preguntar sobre lo que es un estudio de investigación al Comité de Ética de su Institución. Si tienen dudas o preguntas sobre sus derechos al participar en un estudio de investigación:

Dra. Matilde Ruiz García, Presidente del Comité de Ética, Instituto Nacional de Pediatría. 10840999 ext 1581 en días y horas hábiles.

Responsables de la Comisión de Ética en Investigación del IMSS, a los Tel. 56276900-21216, de 9 a 16:00 hrs.; o si así lo prefiere al correo electrónico: conise@cis.gob.mx. La Comisión de Ética se encuentra ubicada en el Edificio del Bloque B, Unidad de Congresos piso 4, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Av. Cuauhtémoc 330 Colonia Doctores, C.P. 06725, México D.F.

Acepto y autorizo que mi hijo(a) participe en este estudio:

Nombre y firma del padre o tutor

Nombre y firma de la madre o tutora

Nombre y firma del Testigo 1

Nombre y Firma del Testigo 2

Nombre y firma de quien obtiene este consentimiento

Nombre y firma del Investigador responsable

ANEXO 6 CARTA DE ASENTIMIENTO INFORMADO



INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA

Carta de Asentimiento Adolescentes

Título del Estudio: BIOMARCADORES TEMPRANOS DE FALLA DE LA CÉLULA β EN SUJETOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2 Y EN SUJETOS CON OBESIDAD O CON PREDIABETES.

México D.F. a _____ del mes _____ del año _____

Tu médico tratante Dra. _____, del Servicio de Endocrinología de esta Instituto te ha invitado a ti _____ (nombre del niño) a participar en un estudio de investigación. Este asentimiento es para que lo leas, entiendas y firmes si quieres participar en este estudio.

¿Cuál es el propósito del estudio?

Los estudios de investigación se realizan para encontrar la mejor manera de resolver un problema. Se me ha informado que mis papás aceptaron que participe en un estudio de investigación, cuyo **objetivo** es: saber **si existe algún marcador en la sangre de falla de las células beta del páncreas que producen la insulina para el diagnóstico temprano de diabetes mellitus.**

Los investigadores quieren averiguar si existe en la sangre una sustancia producida en la célula beta del páncreas que nos pueda ayudar a conocer en forma temprana, que la célula beta (la que produce insulina) se está destruyendo, es decir, antes de que el número de células beta muertas sea tan grande que no haya quien impida que se suba el azúcar en la sangre (glucosa sérica), o sea antes de que se diagnostique diabetes mellitus. Esto es un estudio de investigación. Se te está pidiendo participar en este estudio.

¿Tengo que estar en este estudio?

No. Sólomente participarás si estás de acuerdo. Aún si decides aceptar, tú puedes dejarlo después si cambias de opinión, debes avisarle lo más rápido posible al médico. Tienes derecho a no participar en este estudio si no quieres, aún si tus padres han dado su permiso y nadie se enojará contigo. Puedes preguntar cualquier duda que tengas a tu doctora, encargada de este estudio de investigación.

¿Por qué fui elegido para participar en este estudio?

Porque soy un adolescente que asisto al Servicio de Endocrinología porque tengo obesidad y tengo riesgo alto de presentar diabetes mellitus (azúcar alta en la sangre) o ya tengo diabetes mellitus.

¿Qué me sucederá en este estudio?

Debes asistir en ayuno de 10 hrs a una sola visita, al Servicio de Endocrinología del Instituto Nacional de Pediatría o del Hospital de Pediatría del CMNSXXI, puede ser, si tú o tus padres lo prefieren así, el día que ya tengas una cita programada o agendar una nueva fecha. Como es habitual en cada cita tu doctora, te preguntará cosas como tu edad, en qué momento estás del desarrollo de niño a jovencito: " si

ya hueles a chivo en las axilas” o de niña a mujercita “si ya menstruas”. Te realizará exploración física completa: medición de peso, de talla, de cintura y de presión arterial. Buscará signos de daño a la célula beta (coloración negra en nuca, axila, entre las piernas), piel de gallina en brazos, muslos, pecho. Revisará los latidos de tu corazón y si respiran bien tus pulmones, características de tus pechos y de tus genitales.

Te tomará una muestra de sangre de una vena del brazo, de aproximadamente 3 cucharaditas, (menos de 9 mL, la que se meterá en una máquina tipo licuadora para separar el suero, el cual se guardará identificados por un código (no llevarán tu nombre, es decir ningún dato confidencial). Estas muestras serán enviadas a la Dra. MMAB responsable del Laboratorio de Medicina Proteómica y Biocatálisis, de la Unidad de Investigaciones en Biología Molecular, del Hospital de Cardiología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, para almacenamiento y análisis posterior hasta el final de la investigación. Tendrán los resultados en 1 año aproximadamente. Estas muestras sólo serán utilizadas para los propósitos descritos en este asentimiento. No se realizarán estudios genéticos. Una vez que el estudio concluya las muestras serán desechadas de manera apropiada.

¿Me ayudará estar en este estudio?

No hay ninguna garantía de que este estudio te ayudará. Tu daño a la célula beta puede estarse presentando, pero la investigación ser incapaz de demostrar la presencia de biomarcadores tempranos. Tu doctora ya te ha realizado los estudios necesarios y habituales y te ha dicho si tienes o no diabetes mellitus, grasas en la sangre y los valores de insulina normales o alterados y te ha dado el tratamiento específico.

Este estudio, podría contribuir a aumentar el conocimiento de cómo identificar el daño temprano de células beta y ésto podría beneficiar a otras personas en el futuro.

¿Quién paga por el estudio?

Todos los procedimientos relacionados con el estudio serán sin costo para tí o tu familia. El cuidado médico que no está relacionado con el estudio será responsabilidad de tus padres.

¿Compensación?

No se te pagará por participar en este estudio de investigación.

¿Me puede pasar algo malo en este estudio?

Existe la posibilidad de que al tomarte la muestra con una aguja, puedas presentar dolor o malestar al momento del piquete, sudoración fría, sentirte mareado, moretón o infección en el sitio donde la aguja picó.

¿Qué sucede si algo sale mal?

El riesgo de infección es el más grave, pero también es rarísimo. Pero si se presenta recibirás la atención inmediata y eficiente en tu hospital para resolverlo sin costo para tí o tu familia.

¿Qué sucederá con mi información?

Se te darán a conocer los resultados, independiente de si haya sido o no exitosa la investigación: encontrar sustancias que en forma temprana hablen de daño a la célula beta. Tu doctora tendrá tu información registrada y la podrá compartir con otros doctores en congresos de médicos o bien publicarla en revistas médicas para darla a conocer. Los resultados podrán tardarse hasta un año en obtenerse.

Tu nombre nunca será conocido, jamás lo diremos o lo publicaremos. Siempre se guardará la confidencialidad de tu información de acuerdo con los reglamentos locales, protegiendo tu privacidad.

Los investigadores participantes de este estudio necesitarán revisar la información médica disponible en tu expediente clínico antes de tu participación en este estudio y puede ser consultada y utilizada para los propósitos de este estudio si estás de acuerdo en participar.

La información médica que será recolectada de tu expediente clínico incluye:

- Información obtenida de tu historia clínica para determinar si puedes ser seleccionado para participar en este estudio, para saber enfermedades en tus familiares o en tí, cuántas semanas duró tu gestación, peso al nacer, talla al nacer, tiempo de evolución de la obesidad, enfermedades asociadas.
- Resultados de estudios de laboratorio: glucosa e insulina en ayunas y después de la carga oral de glucosa, grasas en sangre, grasas en sangre.
- Información sobre el tratamiento que estás recibiendo y medicamentos que podrías estar tomando.

De acuerdo con los reglamentos mexicanos puedes solicitar acceso o cancelación de tu información personal por escrito a tu doctora.

¿Puedes ser retirado del estudio sin tu asentimiento?

No.

¿Con quién puedo platicar sobre el estudio?

Dra. Nelly F. Altamirano Bustamante _____ Servicio de Endocrinología, Instituto Nacional de Pediatría de 9:00 a 13:00 h, de lunes a viernes a los teléfonos: 10840900 ext. 1823.

Dra. Eulalia P. Garrido Magaña
9237313 _____ Servicio de Endocrinología, Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI Teléfono 56276900 ext 22292 de lunes a viernes de 8 a 14 h

Puedes preguntar sobre lo que es un estudio de investigación al Comité de Ética de tu Institución. Si tienes dudas o preguntas sobre tus derechos al participar en un estudio de investigación:

Dra. Matilde Ruiz García, Presidente del Comité de Ética, Instituto Nacional de Pediatría. 10840999 ext 1581 en días y horas hábiles.

Responsables de la Comisión de Ética en Investigación del IMSS, a los Tel. 56276900-21216, de 9 a 16:00 hrs.; o si así lo prefiere al correo electrónico: conise@cis.gob.mx. La Comisión de Ética se encuentra ubicada en el Edificio del

Bloque B, Unidad de Congresos piso 4, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Av. Cuauhtémoc 330 Colonia Doctores, C.P. 06725, México D.F.

Acepto participar en este estudio:

Nombre y firma del Paciente: _____

Nombre y firma del padre o tutor _____

Nombre y firma de la madre o tutora _____

Nombre y firma del Testigo 1 _____

Nombre y Firma del Testigo 2 _____

Nombre y firma de quien obtiene este asentimiento

Nombre y firma del Investigador responsable _____