



**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 DIABETES MELLITUS TIPO 1”**

”

TESIS

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

**PRESENTA
DR. VICTOR HUGO GARCÍA OLMOS**

**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



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 OBESIDAD”**



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



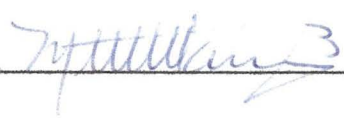
**DR. MANUEL ENRIQUE FLORES LANDERO
JEFE DEPARTAMENTO DE PRE Y POSTGRADO**



**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**

“IRÁS SOBRE LA VIDA DE LAS COSAS...

...Que todo deje en ti como una huella

misteriosa grabada intensamente”

Enrique González Martínez

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

INDICE

INDICE	4
RESUMEN	5
MARCO TEÓRICO	6
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
JUSTIFICACION	18
OBJETIVOS	21
HIPÓTESIS	22
MATERIAL Y METODOS	24
TAMAÑO DE MUESTRA	28
METODOLOGIA	34
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	36
CONSIDERACIONES ÉTICAS	38
RECURSOS	40
CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	41
RESULTADOS	43
DISCUSION	47
CONCLUSIONES	49
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
ANEXO 1 CUADROS	56
ANEXO 2 FIGURAS	59
ANEXO 3 VARIABLES	69
ANEXO 4 HOJA DE CAPTURA	72
ANEXO 5 CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO	73
ANEXO 6 CARTA DE ASENTIMIENTO INFORMADO	78

RESUMEN

Introducción: En la DM1 las células beta productoras de insulina tienen inflexibilidad metabólica que acelera su destrucción autoinmune, al momento del diagnóstico queda menos del 20%. 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: El daño al islote, se debe en parte a la agregación de formas de plegamiento anómalas del polipéptido pancreático del islote (hIAPP). Esto hace que el hIAPP se despliegue y entre en un estado competente de agregación, que desencadena un proceso cooperativo de auto y hetero-ensamblaje, formando oligómeros citotóxicos (OC), protofilamentos, y fibras bien definidas. Los agregados moleculares de hIAPP son citotóxicos y producen daño tisular en órganos blanco. Si estas formas anómalas de plegamiento del hIAPP (especies de agregados solubles), son detectados en líquidos corporales, se podrían usar como biomarcadores predictivos de falla temprana de la célula beta.

Planteamiento del problema: El depósito de amiloide en el islote puede ser un evento temprano en la patogenia de la DM 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 de la DM

Objetivo: Identificar formas de OC del hIAPP, en niños y adolescentes con DM1 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 DM1 de acuerdo con la ADA, sin otra enfermedad sistémica o síndrome genético y que aceptaron participar en el estudio.

Análisis estadístico: La distribución de las variables cuantitativas fue descrita por la mediana con el valor mínimo y máximo y de las cualitativas: describimos frecuencias simples (número y porcentaje). La diferencia entre los grupos y entre dos medias fue determinada por la prueba de Welch. La diferencia entre grupos de las variables categóricas se hizo por prueba chi-cuadrada. Se consideró significativa una $p < 0.05$. Utilizamos el software JMP11 de SAS Institute, Inc.

Resultados: Presentamos 60 pacientes, con DM1 comparados con 39 con DM2 vs 47 con obesidad (GO) vs 16 controles. La edad promedio de los pacientes con DM1. No encontramos diferencias en los OC del IAPP en los pacientes con DM1 [(3.34 (1-6.22)] al compararlos con el grupo de DM2 o con el GO pero sí con el grupo control [(1.71 (1.10-2.02) $p < 0.001$]. Aumentan la cantidad de OC: tiempo de evolución, hiperglucemia y la interacción hiperglucemia-hiperinsulinemia. Disminuyen la cantidad de OC: Hiperinsulinemia exógena, hipercolesterolemia, la interacción evolución-mal control metabólico y la interacción evolución-hipertrigliceridemia.

Conclusiones: Es un estudio pionero que demuestra que la DMI, es una enfermedad conformacional en edades pediátricas. Pudimos cuantificar a los OC de hIAPP en suero de niños con DM1, demostrar su citotoxicidad y su rol como biomarcadores de falla temprana de la célula beta. Los principales factores que modifican los OC son la glucolipototoxicidad, el tiempo de evolución y la presencia de complicaciones crónicas.

Marco Teórico

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 26 % y en adolescentes al 32% (Ensanut 2006). Dentro del panorama mundial en 1995 México tenía el noveno lugar con 4 millones de personas con diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y en el 2025 se estima que ocuparemos el 7º lugar con 12 millones, cifra que probablemente superaremos, y muchos de ellos habrán sido diagnosticados en la etapa pediátrica.

La Diabetes mellitus tipo 1 (DM1) y la diabetes mellitus 2 (DM2) son enfermedades metabólicas crónicas donde el control glucémico está gravemente afectado como resultado de la disfunción y pérdida de la masa de células beta de los islotes pancreáticos y/o por defectos en la acción de insulina. La hiperglucemia se asocia con complicaciones crónicas micro y macroangiopáticas, aun cuando los locus de susceptibilidad son distintos. Figura 1.

Los factores asociados con progresión a DM1 en individuos de alto riesgo son los genotipos leucocitarios humanos (HLA), edad de seroconversión de anticuerpos, aumento en el número de autoanticuerpos contra el islote y disfunción en la secreción de insulina estimulada por glucosa. (Atkinson, M.A., et al 2011).

Durante la progresión de la DM las células beta se desdiferencian. Talchai et al proponen que la pérdida de identidad más que la muerte de las células beta es la responsable de la pérdida de la masa de células beta reportada durante la progresión de la DM (Bluestone, J.A., et al 2010) Figura 2.

El factor de transcripción NKX2.2 parece ser una proteína reguladora maestra que es esencial para la adquisición y mantenimiento de la identidad monohormonal de célula beta, activando directamente genes críticos de la célula beta y reprimiendo activamente genes de otras líneas celulares endocrinas. Cuando está ausente condiciona desdiferenciación de la célula beta, provoca disfunción con pérdida de la capacidad de secreción de insulina por la célula beta y adquisición de la

capacidad para sintetizar otras hormonas como el polipéptido pancreático que provoca la acumulación de las placas amiloideas (β A) y se asocia con formación de fibrilos amiloideos depositados en las células β del páncreas con efecto citotóxico por lo que se le incluye dentro de las enfermedades conformacionales (Carrell RW et al. 1997; Carrell RW et al. 2002; Chrismanson et al. 1993; Clark A et al. 1987; Clark A et al. 2004; Fernandez-Busquet X et al. 2008; Hayden MR et al 2005; Hoppener JW et al. 2000; Hoppener JW et al. 2006; Lin JC et al. 2006; Talchai C, et al 2012).

Las enfermedades conformacionales (EC) (Gebbink M et al. 2004; Mendre C et al. 2010; Nam HB et al. 2010; Sandefur CI et al. 2011; Uversky VN 2007; Uversky VN et al 2008) tienen una base fisiopatológica común que es una alteración a nivel de las proteínas, ya sea en su tamaño, forma, plegamiento o conformación, que conlleva a la formación de fibras (Carrel W et al. 1997; Carrell RW et al. 2002; Chrismanson et al. 1993; Clark A et al. 1987; Clark A et al. 2004; Fernandez-Busquet X et al. 2008; Hayden MR et al 2005; Hoppener JW et al. 2000; Hoppener JW et al. 2006; Lin JC et al. 2006; Gow A et al. 2003). La formación de fibras puede comenzar intracelularmente por la agregación del polipéptido amiloide del islote en el lisosoma. Una vez formadas estas fibras que se originan tanto dentro o fuera de la célula β dan el estímulo requerido para facilitar la acumulación rápida de fibra amiloide en una segunda etapa. Esta segunda etapa se ha documentado correctamente in vitro y puede en el proceso de formación de fibras inducir citotoxicidad del exterior de la célula β por la destrucción de la membrana plasmática y resulta eventualmente en la formación de amiloides visibles in vivo (Wang F et al. 2001).

La identificación de los mecanismos involucrados a través de biomarcadores de regulación de la plasticidad o disfunción o desdiferenciación de la célula beta como causa primordial de la pérdida de la masa de células beta, en el desarrollo y progresión de la DM1 puede proporcionar claves para tratamiento viables para prevenirla o revertirla o bien enlentecerla.

DIABETES MELLITUS TIPO 1

En la DM1 la alteración en los mecanismos de tolerancia autoinmune provocan desconocimiento de la célula beta productora de insulina e induce su destrucción por células T autoreactivas y consecuentemente hiperglucemia.

La DM1 es una enfermedad autoinmune que para su desarrollo requiere de la acción combinada de factores genéticos y ambientales que permiten la disfunción y muerte de la célula beta. Más de 50 regiones del genoma humano confieren susceptibilidad para DM1. El antígeno leucocitario humano (HLA) es el locus de mayor susceptibilidad para DM1 con un riesgo genético estimado del 30-50%. Se han reportado alrededor de 40 polimorfismos de nucleótido simple (SNP) de genes no HLA que mejoran la predicción para el desarrollo de DM1 y de DM2 como el SNP *GLIS3* rs7020673, insulina, RAS guanyl nucleotide-releasing protein 1 (*RASGRP1*), cordon-bleu WH2 repeat protein (*COBL*), renalase y breast cancer anti-estrogen resistance 1 (*BCAR1*) (Xianjie W 2017)

La incidencia de Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) ha aumentado a una tasa de 3-5% por año a nivel mundial y ha obligado en los países de alta incidencia a cambiar sus sistemas de salud debido a que es hasta el momento una enfermedad incurable sin métodos reales de prevención, aunado a ello es cada vez menor la edad en que se diagnostica lo que aumenta el gasto en salud en billones de dólares debido a mayor riesgo de complicaciones crónicas micro y macroangiopáticas en las primeras tres década de la vida, ya que a pesar de los avances tecnocientíficos en las formulaciones de insulina, en el automonitoreo de glucosa muchos pacientes no logran el control glucémico recomendado para evitar o retardar las complicaciones crónicas. (Dabelea D et al. 2014; Patterson CC et al. 2009; Maahs DM et al. 2010)

Los adolescentes con DM1 tienen dificultad para lograr el control glucémico óptimo, que puede estar relacionado con resistencia a la insulina, especialmente durante la pubertad, y la presencia de resistencia a la insulina condiciona hiperinsulinemia que provoca lipólisis aumentada, mayor producción hepática de

glucosa, menor captura periférica de glucosa y dislipidemia, es decir, tienen los adolescentes con DM1 menor sensibilidad periférica, hepática y en tejido adiposo a la insulina, que puede deberse a disfunción mitocondrial muscular con menor tasa de fosforilación oxidativa, que puede empeorar si coexiste obesidad en el paciente con DM1, lo que aumenta el riesgo de complicaciones crónicas, particularmente la enfermedad cardiovascular, hasta 10 veces más la tasa de mortalidad. (Cree-Green M et al. 2018)

La pérdida de la identidad, la presencia de células polihormonales y la reprogramación celular emergen como factores importantes de la disfunción de la célula beta en pacientes con DM. En la DM1 las células beta productoras de insulina tienen una capacidad alterada para seleccionar sustratos para la fosforilación oxidativa o inflexibilidad metabólica que inicialmente condiciona disfunción, después desdiferenciación y por último destrucción acelerada mediada por autoinmunidad, de manera tal, que al momento del diagnóstico clínico hay disminución de la masa de células beta del páncreas funcionales (alrededor del 20%).

Lo que ha llevado a la búsqueda de biomarcadores de salud y de daño de célula beta en aras de identificar y monitorizar la disfunción de la célula beta, lo que permitiría mejorar nuestro entendimiento sobre la contribución de la disfunción de la célula beta en la historia natural de la DM1, de tal manera de ser capaces de detectarla en etapas preclínicas, en la fase denominada "autoinmunidad del islote" caracterizada por la aparición de autoanticuerpos contra autoantígenos del islote que incluyen insulina, descarboxilasa del ácido glutámico (GAD65), antígeno 2 del insulinoma (IA2) y transportador 8 del zinc (ZnT8), lo que permitiría la posibilidad de alternativas de tratamiento para modificar su progresión, sino también. para tener marcadores de disfunción de la célula beta en el desarrollo de las complicaciones crónicas identificado vías patológicas que permiten estrés de la célula beta, disfunción, desdiferenciación y muerte. (Scherm GM et al. 2019) (Sims KE et al. 2019)

FORMACION DE FIBRAS

Los monómeros de IAPP forman poros que son incorporados dentro de la membrana y alteran las propiedades fisicoquímicas de las mismas. La identificación de residuos que promueven y propagan esta oligomerización será un factor determinante para entender los mecanismos moleculares de la fibrillogénesis en la DM (Ahmad E et al. 2011).

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 ello, ya que la facultad de formar fibras no depende del estado nativo sino de la naturaleza del esqueleto de la proteína (Carrel W et al. 1997). Las concentraciones elevadas de glucosa y de zinc favorecen la formación de láminas β -cruzadas y la consecuente formación de fibras amiloides (Kajav AV et al. 2010).

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 (Carrel W et al. Christmanson L et al. 1993). Fig. 1 La toxicidad in vitro de los oligómeros solubles en la EA es inhibida por anticuerpos específicos contra dichos oligómeros (Kayed R et al. 2003). 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 (Christmanson L et al.

1993). Estas estructuras amiloideas son blancos terapéuticos para la búsqueda de nuevos tratamientos de estas enfermedades

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 (Hoppener JW et al. 2000; Hoppener JW et al. 2006; Hoppener JW et al. 1993; Hoppener JW et al. 1993). 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) (Hayden MR et al. 2005; Goldsbury C et al. 2000; Westermark P et al. 1990), dando lugar a su depósito tisular y causar una muerte celular inmediata y la acumulación de fibras pequeñas puede afectar la función (Ahmad E et al. 2011).

Estudios recientes indican que, la agregación del IAPP, especialmente los agregados pre-fibrilares (Kayed R et al. 2003; Bucciantini M et al. 2002; Bucciantini M et al. 2004) es un factor diabetogénico que produce citotoxicidad y falla progresiva de la célula β (Hoppener JW et al. 2006; Ahmad E et al. 2011; Rhodes CJ 2005; Janson J et al. 1999; Lorenzo A et al. 1999). 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 (Hayden MR et al. 2005; Hoppener JW et al. 2000; Hoppener JW et al. 2006; Hoppener JW et al. 1993; Hull RL et al. 2004; Kahn SE et al. 1999; Janson J et al. 1999; Jaikaran ET et al. 2001, Jaikaran J et al. 2001).

Hasta donde tenemos conocimiento, no se ha estudiado en las etapas preclínicas y clínicas de la DM1 ni de la DM2 la presencia de formas anómalas de plegamiento solubles, pero en la enfermedad de Alzheimer se han identificado

formas anómalas de plegamiento (Kayed R et al. 2003) y anticuerpos que reconocen diferentes epítopes conformacionales (formas anómalas de plegamiento) están en etapas de ensayos clínicos para probar su eficiencia terapéutica (Kayed R et al. 2003; Pul R et al. 2011).

Los agregados prefibrilares solubles pueden ser detectados por anticuerpos monoclonales (AMo). 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 (Kayed R et al. 2003; Pul R et al. 2011). 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 DM.

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 ejercicio) 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 diabetes esta regulación falla. Tanto en DM1 como en DM2 hay déficit en la masa de células β (Junker K et al. 1977; Meier JJ et al. 2005).

La contribución relativa y orden en que estos cambios se desarrollan son materia de controversia y en vista de la naturaleza heterogénea tanto de la DM1 como de la DM2 es probable que la contribución y el tiempo difieran grandemente entre individuos. Hasta que no se desarrolle un método sensible y específico para cuantificar la masa de célula β in vivo no es posible conocer la pérdida de masa de

células β al momento del diagnóstico de la DM. Desde un punto de vista pragmático es razonable predecir que la pérdida de función de células β precede a la pérdida de masa (Matveyenko AV et al. 2008).

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 con DM1, se podrían usar como biomarcadores de daño de célula beta y el riesgo de: 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.

PLEGAMIENTO DE PROTEINAS

El plegamiento de una proteína es un proceso de auto-ensamblaje definido por la secuencia de aminoácidos, ¿cómo se pliega una proteína tan rápido? es un problema aún no resuelto- y está en la interface de la química, la física y la biología. Algunas veces las proteínas no se pliegan de manera correcta y presentan errores en el plegamiento (plegamiento anómalo de estructuras no nativas (NN)). Las estructuras no nativas interactúan entre sí y forman agregados intra o extra celulares que eventualmente pueden formar fibras amiloides (Fig. 1), dando lugar a un amplio grupo de enfermedades (Carrell RW et al. 2002; Goldber AL 2003), como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, las enfermedades neurodegenerativas como el Mal de Parkinson (Perutz MF 1996), la enfermedad de Alzheimer (Rahimi F et al. 2008); las enfermedades crónicas (diabetes mellitus tipo 2) (Hayden MR et al. 2005; Kapurnoiotu A 2001) amiloidosis (Pepys MB 2001) relacionadas con hemodiálisis y la amiloidosis prostática (Soto C 2001). Carrell agrupó a estas enfermedades y las llamó enfermedades conformacionales (EC) (Carrell RW et al. 1997). Las EC tienen una base fisiopatológica común que es una alteración a nivel de las proteínas, ya sea en su tamaño, forma, plegamiento o conformación. 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 (Carrell RW et al. 1997; Fernandez-Busquets X et al. 2008; Lin JC et al. 2006; Kajava AV et al. 2010).

FORMACION DE FIBRAS

La formación de fibras puede comenzar intracelularmente por la agregación del polipéptido amiloide del islote en el lisosoma. Una vez formadas estas fibras que se originan tanto dentro o fuera de la célula β dan el estímulo requerido para facilitar la acumulación rápida de fibra amiloide en una segunda etapa. Esta segunda etapa se ha documentado correctamente in vitro y puede en el proceso de formación de fibras inducir citotoxicidad del exterior de la célula β por la destrucción de la membrana plasmática y resulta eventualmente en la formación de amiloides visibles in vivo (Wang F et al. 2001). (Fig 4).

Los monómeros de IAPP forman poros que son incorporados dentro de la membrana y alteran las propiedades fisicoquímicas de las mismas. La identificación de residuos que promueven y propagan esta oligomerización será un factor determinante para entender los mecanismos moleculares de la fibrillogénesis en la DM (Ahmad E et al. 2011).

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.

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 interaccionan 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 (Fig. 1) (Carrell RW et al. 1997; Fernandez-Busquets X et al. 2008; Lin JC et al. 2006; Kajava AV et al. 2010; Yerbury JJ et al. 2005).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Federación Internacional de Diabetes estima que el número de personas que viven con diabetes aumente de 366 millones en 2011 a 552 millones en 2030. Esto equivale aproximadamente tres nuevos casos cada diez segundos o casi diez millones por año y 183 millones no saben que tienen diabetes (<http://www.IDF.org/Home/index.cfm?node=264>. 2012).

La DM desde el punto de vista proteómico además de muchos otros factores de susceptibilidad puede considerarse una enfermedad compleja (Ahmad E et al. 2011) que se presenta cuando existe disfunción del islote, con disminución del número de células β , incremento de células α y depósito de amiloide, condicionando falla de la célula β incapaz de responder a la exigencia de compensar la resistencia a la insulina (Hasyden MR et al. 2005; Rhoder CJ 2005). Con el paso del tiempo, los niveles de glucosa de la sangre aumentan mientras que la secreción de insulina disminuye. Esto es principalmente debido a un daño gradual en la célula beta pancreática asociado a la formación de depósitos tóxicos de amiloide dentro de los islotes pancreáticos (Hoppener JW et al. 2002).

En reportes de autopsia, estos depósitos, que sustituyen a las células endocrinas en el islote, se han demostrado en el 90% de las personas con diabetes tipo 2. Estos depósitos tóxicos se reconocen ahora como una característica patológica de la enfermedad (Kahn SE et al. 1999).

Se ha demostrado una base fisiopatológica común que 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 del islote, o polipéptido con 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 (Hull RL et al. 2004). Esto sugiere que el depósito de amiloide en el islote puede ser un evento temprano en la patogenia de la DM 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 de la DM.

Lo que plantea preguntas como:

¿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

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 ejercicio) 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. Tanto en DM1 como en DM2 hay déficit en la masa de células β (Junker K et al. 1977; Butler AE et al. 2003; Lernmark A et al. 1995; Clark A et al. 1988; Gepts W et al 1978; Kloppel G et al. 1985; Butler AE et al. 2007; Kloppel G et al. 1984; Sakuraba H et al. 2002; Yoon KH et al 2003; Meier JJ et al. 2005).

La contribución relativa y orden en que estos cambios se desarrollan son materia de controversia y en vista de la naturaleza heterogénea tanto de la DM1 como de la DM2 es probable que la contribución y el tiempo difieran grandemente entre individuos. Hasta que no se desarrolle un método sensible y específico para cuantificar la masa de célula β in vivo no es posible conocer la pérdida de masa de células β al momento del diagnóstico de la DM. Desde un punto de vista pragmático es razonable predecir que la pérdida de función de células β precede a la pérdida de masa (Matveyenko AV et al. 2008).

La toxicidad del polipéptido β amiloide en la EA y la de otras proteínas amiloidogénicas depende de los oligómeros solubles intermediarios en la formación de las fibras (Hardy). Estos oligómeros solubles son partículas esféricas de 2.7 a 4.2 nm de diámetro y estructuras curvilíneas conocidas como profibrillas. Los oligómeros solubles se han encontrado en el líquido cefalorraquídeo de los pacientes con EA y correlacionan con el grado de severidad de la enfermedad (Kayed R et al. 2003). Kayed y colaboradores (Kayed R et al. 2003) 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 (Kayed R et al. 2003), son un factor diabetogénico que produce citotoxicidad y falla de la célula β (Hoppener JW et al 2006; Rhodes CJ et al. 2005; Lorenzo A et al. 1994).

Tomando en cuenta todos estos resultados podemos sugerir que los agregados de formas de plegamiento anómalas (estructuras no nativas) del IAPP son candidatos moleculares a ser biomarcadores para monitorear el progreso preclínico de la diabetes mellitus: antes del aislamiento de la célula β y el secuestro de sus proteínas secretadas (proinsulina 4%, péptido C e Insulina 96% y 100% amilina).

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 (Kayed R et al. 2003) y anticuerpos que reconocen diferentes epítopes conformacionales (formas anómalas de plegamiento) están en etapas de ensayos clínicos para probar su eficiencia terapéutica (Kayed R et al. 2003; Pul R et al. 2011). Nicolls demostró las relaciones clínicas y biológicas de la DM2 y la enfermedad de Alzheimer (Nicolls MR 2004).

Los agregados prefibrilares solubles pueden ser detectados por anticuerpos monoclonales (AMo). 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 (Kayed R et al. 2003; Pull R et al 2011). 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.

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.

Actualmente el diagnóstico de diabetes mellitus se basa en la medición de glucosa en ayunas y 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) (Pontiroli AE 2004; Weiss R et al. 2005).

En la literatura los marcadores actuales para predecir a mediano plazo el diagnóstico de DM2, 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 (Cardoso-Saldana G et al. 2007; Weiss R et al. 2004).

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 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.

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 niños y adolescentes 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 son marcadores en sangre 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 de uno a cinco años de evolución 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 menor tiempo de evolución.

DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Es un estudio prospectivo, transversal, observacional y comparativo.

MATERIAL Y MÉTODOS

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

Etapa I. Producción y purificación de formas anómalas de plegamiento a través de métodos químicos y fisicoquímicos. La cual se realizó en la unidad de investigación de enfermedades metabólicas (UIBCAR) IMSS y será coordinado 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 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, 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.

14.2.1 Material y métodos

Péptido IAPP

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 incubó 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, los 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 incubará a 37°C, en la oscuridad, 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.

Etapas 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 a 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 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-aminopterina-timidina, HAT)⁷⁹. La selección de los hibridomas productores de Igs 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 2 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 es 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 IMSS.

Nuestras determinaciones de las forma anómalas se hicieron en sangre, ya que el IAPP se sintetiza junto con la insulina y se espera en este fluido mayor concentración del IAPP, que es la forma más segura de cuantificarlo. 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.

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

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

Determinación de formas de plegamiento anómalas IAPP en las poblaciones de estudio.

Con los anticuerpos monoclonales purificados y seleccionados en la fase dos, se montaron ensayos de RIA, siguiendo el procedimiento reportado por Christmanson y colaboradores, para detectar formas de anómalas en suero de las poblaciones de estudio. Los niveles de IAPP nativo se determinaron en suero por radioinmunoanálisis (RIA) como se describe en Christmanson y col.

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

<i>P-p</i>	<i>N</i>
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, por lo que 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.-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 mneos Z detalla = $\pm 1d.e.$)
- 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
- glucosa en ayunas normal < 100 mg/dL e insulina < 20 mUI/mL, con HOMA < 3.5
- que aceptaron participar en el estudio.

Grupo 2. 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
- Datos clínicos de resistencia a la insulina (obesidad central, acantosis, hiperqueratosis)
- Con normoglucemia. (Criterios de ADA, glucemia de ayuno normal, < 100 mg/dl y/o glucemia post CTOG a las 2 h < 140 mg/dl.)
- Sin otra enfermedad sistémica o síndrome genético
- Sin ingesta de medicamentos

- Que aceptaron participar en el estudio

Grupo 3.- 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
- que aceptaron participar en el estudio

Grupo 4.- 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)
- perfil de lípidos completo
- sin otra enfermedad sistémica o síndrome genético
- sin ingesta de medicamentos
- que aceptaron participar en el estudio

Criterios de Exclusión todos los grupos :

Pacientes con antecedentes de otras enfermedades: Cáncer, Enfermedades del Sistema Nervioso Central, pacientes con VIH, pacientes con hepatitis B y C, diabetes mellitus tipo 1. Enfermedades del tejido conjuntivo o cáncer, pacientes con infecciones severas en los últimos 6 meses, pacientes que tomen tratamientos

con fármacos anticonvulsivantes, quimioterápicos, antidepresivos, glucocorticoides. Abuso de alcohol o drogas estimulantes.

Pacientes que no acepten participar en el estudio.

Se dividieron a los pacientes en 4 grupos ya mencionados

Grupo 1.- Grupo Control

Adolescentes sanos, que acepten participar en el estudio.

Grupo 2. Adolescentes con obesidad

Adolescentes con obesidad y datos clínicos de resistencia a la insulina y normogluceemia.

Grupo 3.- Adolescentes con DM1

Adolescentes con diagnóstico de DM1 se estratificaron por tiempo de evolución y presencia o ausencia de complicaciones crónicas

Grupo 4.- Adolescentes con DM2

Adolescentes con diabetes mellitus tipo 2 los cuales se estratificaron por tiempo de evolución de la enfermedad.

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 requiere carta de consentimiento informado y la extracción de sangre fue menor del 0.5% del volumen circulante de acuerdo con su edad y género. A todos los sujetos, previo consentimiento y asentimiento informado por escrito.

METODOLOGIA GENERAL DEL ESTUDIO

- Se incluyeron niños y adolescentes con diagnóstico de DM1 entre 4 a 18 años, atendidos en el Servicio de endocrinología del Instituto Nacional de Pediatría (INP), 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 (anexo 1 y 2)
- Se hizo historia clínica completa. Para obtener la información se revisaron los expedientes clínicos y se interrogará 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 tensión arterial, en el momento de la inclusión en el estudio con los instrumentos previamente calibrados y estandarizados con una diferencia inter observador menor del 1%. Se calculó el 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, 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, en

todos los pacientes, con una concordancia del 100%. Se determinó el grado de desarrollo puberal mediante la escala de Tanner.

- A todos los sujetos se les realizó bioquímica de la resistencia a la insulina: se les tomó una muestra de sangre con 10 horas de ayuno, de una vena del brazo (vena antecubital), de aproximadamente 9 ml, en una sola visita, el día que tuvieron cita programada al Servicio de Endocrinología. La sangre se fraccionó en dos tubos identificado por un código (no llevaron nombre, es decir ningún dato confidencial). El primero de 7 ml se centrifugó y la muestra de suero 4ml 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 cambio terapéutico de estilo de vida que incluye plan de alimentación fraccionada en quintos con equilibrio en macro y micronutrientes aunado al plan de ejercicio para optimizar mecánica de la respiración, corregir alteraciones de postura, fortalecimiento muscular y movilidad articular y mejorar capacidad cardiorrespiratoria la actividad física que debe realizar aunado a la enseñanza del ajuste de dosis de insulina diario más conveniente para el control de su DM1.
- A toda la población se les determinó formas de plegamiento anómalas IAPP (OC): Con los anticuerpos monoclonales purificados y seleccionados en la fase dos se montaron ensayos de RIA, siguiendo el procedimiento reportado por Christmanson et al, 1993, para detectar formas de anómalas en suero de las poblaciones de estudio. Los niveles de IAPP nativo se determinaron en suero por radioinmunoanálisis (RIA) como se describe en Christmanson et al, 1993.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Análisis Univariado

VARIABLES CUANTITATIVAS: Son las concentraciones plasmáticas de los marcadores biológicos y clínicos como: glucosa, triglicéridos, colesterol, tensión arterial, edad al diagnóstico, hemoglobina glucosilada, edad actual, oligómeros citotóxicos, además de las variables antropométricas (peso, talla, cintura,, pc peso, pc talla, pc de IMC, pc de cintura, relación cintura- cadera). 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.

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 fue determinada por la prueba de chi-cuadrada con las variables categóricas y por la prueba de Welch en la variable cuantitativas.

Análisis Bivariado

El análisis en esta fase se realizó en dos sentidos

Primero, se exploró la comparación de dos medias buscando una relación entre las variable continuas se realizaron pruebas de t pareada para comparación de medias de los marcadores bioquímicas y clínicos entre todas las categorías cualitativas categóricas.

- Segundo, se exploró la comparación de dos medias buscando una relación entre la variable dependiente cuantitativa continua (formas anómalas de plegamiento) y variables independientes cualitativas binarias (presencia ó ausencia de).

Tanto con las variables categóricas como con las variables numéricas continuas la comparación múltiple fue realizado de manera protegida, es decir, e 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 reconocido 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 de los diferentes padecimientos detectados durante el estudio, con seguimiento por la consulta externa del Servicio de Endocrinología. A los niños 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 diabetes mellitus, como una enfermedad conformacional, lo cual es posible que pueda 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 sí 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 solicitará 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 están de acuerdo, firmarla (anexo 5) Es conveniente mencionar que, una persona diferente solicitó el consentimiento, en los casos de pacientes en los cuales alguna de las investigadoras sea su médico

tratante. En casos de pacientes con edad de 12 a 18 años se solicitó y se obtuvo el consentimiento informado (anexo 6).

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 proyecto INP 091/2013 y está vigente (Diciembre 2020). También fue evaluado y aprobado por 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 la DM. Se cuenta con una infraestructura multi-institucional que se fortaleció con el financiamiento del CONACYT para consolidar esta red de expertos en DM en México.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

CRONOGRAMA DE TAREAS				
Actividad o tarea	1er. año		2do. año	
	1er. Semestre	2do. Semestre	3er. Semestre	4to. Semestre
<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</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>11. Purificación de otros AMOs</p> <p>12. Pruebas inmunológicas (ELISAS, RIA)</p>	

<p>plegamiento anómalo de IAPP.</p>		<p>10. Pruebas inmunológicas (ELISAS)</p>		
<p>Etapas III. Detección de formas de plegamiento anómalas de IAPP por radioinmunoanálisis en plasma de sujetos con diabetes mellitus tipo 2</p>		<p>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</p>	<p>3. Determinación por RIA de formas no nativas de plegamiento anómalo del IAPP en la población de estudio.</p>	
<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. Redacción de tesis de posgrado (especialidad y maestría)</p>

RESULTADOS

Presentamos 60 pacientes, con DM1 comparados con 39 con DM2 vs 47 con obesidad (GO) vs 16 controles. La edad promedio de los pacientes con DM1 fue de 13.42 años (2.2 a 18), el 47% eran femeninos, con mediana de evolución de tres años y en regular control glucémico (HbA1c 9.7 (4.8-14.8)%, todos requerían tratamiento con insulina exógena, excepto cuatro pacientes quienes se encontraban en período de luna de miel. 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 DM1 tenían mayor tiempo de evolución y peor control glucémico, pero menor PZ de IMC que los pacientes con DM2. Las características clínicas y bioquímica de los sujetos en los cuatro grupos se resumen en el cuadro 1.

La distribución del valor de OC en los cuatro grupos (grupo de niños sanos, niños con obesidad, niños con DM2 y niños con DM 1) por medio de histogramas. No encontramos diferencias en los OC del IAPPh en los pacientes con DM1 [(3.34 (1-6.22)] al compararlos con el grupo de DM2 [2.04 (1.01-6.32) $p= 0.120$] o con el Grupo de Obesidad [(3.09 (1.22-7.07) $p = 0.0.704$] pero sí con el grupo control [(1.71 (1.10-2.02) $p < 0.001$]. Figura 4.

Búsqueda de factores que modifican la cantidad de oligómeros citotóxicos

Al analizar la cantidad de oligómero con el modelo de regresión lineal encontramos factores e interacciones que modifican la cantidad de oligómeros:

Aumentan la cantidad de oligómeros:

a. Tiempo de evolución: mayor tiempo de evolución de la DM1 mayor cantidad de oligómeros ($p= 0.0138$). Figura 5.

b. Obesidad central: Z de índice de masa corporal mayor de 0 d.e. así como mayor diámetro de cintura se asocian con mayor cantidad de oligómeros ($p=0.0132$), con la interacción mayor z de talla –mayor z de índice de masa corporal mayor cantidad de oligómeros ($p= 0.0132$). Figura 5.

c. Hiperglucemia: mayor concentración de glucosa mayor concentración de oligómero $p = (0.0129)$.

d. Hipertrigliceridemia: La cantidad de oligómero aumenta si los triglicéridos se elevan ($p= 0.0381$).

e. Mal control glucémico: Se analizó la asociación entre glucosa y oligómero condicionado por el nivel de HbA1c. En los pacientes con buen control, determinado con un valor de HbA1c <8%, no observamos asociación entre el nivel de glucosa y oligómero, sin embargo, en aquellos con mal control glucémico, determinado por glucosa en ayunas > de 350 mg/dl y HbA1c > 9%, se observó la asociación entre mayor nivel de glucosa mayor nivel de oligómero. Si bien el modelo global no es significativo, el término de interacción se considera significativa de acuerdo con la recomendación de algunos autores (Servin), con una $p=0.07$.

f. Hiperglucemia-Hiperinsulinemia exógena: Se analizó la asociación entre glucosa y oligómero condicionado por la dosis de insulina. En los pacientes con dosis bajas (menos de 0.6 U/kg) no se observó la asociación entre el nivel de glucosa y oligómero, pero en pacientes con dosis altas (>0.7 U/kg) si se observó asociación estadísticamente significativa encontrando que a mayor valor de glucosa (> 350 mg/dL) con mayor dosis de insulina, mayor el valor de oligómero ($p<0.001$). Figura 6.

h. Tiempo de evolución-Hipertrigliceridemia: la asociación entre triglicéridos y oligómero condicionado por el tiempo de evolución muestra significancia estadística con un valor de $p <0.001$. En pacientes con evolución menor a 4 años a mayor valor de triglicéridos (>100 mg/dL) mayor el valor de oligómero.

Disminuyen la cantidad de oligómeros citotóxicos

a. Z talla. Cuando la Z de talla es mayor de 0 d.e. la cantidad de oligómeros disminuye ($p= 0.024$)

b. Tiempo de evolución-relación cintura/talla: Existe asociación cuando el tiempo de evolución es mayor de 5 años y la relación de cintura/talla > 0.45 la cantidad de oligómeros disminuye.

c. Tiempo de evolución-mal control glucémico: Encontramos asociación entre tiempo de evolución mayor de 5 años y mal control glucémico (hiperglucemia (>250mg/dL) y Hb1Ac mayor de 10%) menor cantidad de oligómero citotóxico ($p= 0.06$)] Figura 7.

d. Variabilidad de glucosa: Encontramos Asociación entre la variabilidad de la glucosa y la cantidad de OC. Pacientes con hipoglucemia (glucosa < 70 mg/dl) pero con mal control glucémico medido por HbA1 (>10%) menor cantidad de OC. Figura 8.

Tiempo de evolución-dislipidemia: En pacientes con evolución mayor de 4 años, con triglicéridos altos menor fue el valor de oligómero. El nivel de colesterol

total presenta un efecto negativo para el valor de oligómero, siendo este efecto independiente de los meses de evolución y del nivel de triglicérido al estudio.

Hipertensión arterial: Se analizó la asociación entre la centila de tensión arterial sistólica y el valor del oligómero condicionado por el tiempo de evolución, encontrándose interacción significativa en aquellos pacientes con evolución mayor de 6 años con una centila alta de tensión arterial sistólica el valor de oligómero fue menor ($p=0.002$). Figura 9.

Hipercolesterolemia-Nefropatía: El nivel de LDL y de microalbuminuria presenta un efecto negativo para el valor del oligómero, siendo este efecto independiente de los meses de evolución. Figura 10.

En suma, se construyó un modelo de regresión lineal múltiple con las variables: sexo; edad; tiempo de evolución; dosis de insulina; glucosa; triglicéridos y HbA1c, con términos de interacción entre dos variables. Al someterse en el procedimiento de selección de variables hacia atrás (backward stepwise method), se quedaron el modelo las variables: tiempo de evolución; dosis de insulina; glucosa; HbA1c y dos términos de interacción, una, tiempo de evolución y HbA1c, y otra, glucosa y dosis de insulina. Con respecto a la interacción entre tiempo de evolución y HbA1c, se observó que en los pacientes con menor tiempo de evolución (<7 años) no se presenta asociación entre HbA1c y oligómero, mientras que con evolución prolongada (≥ 7 años) se observó la asociación entre estas variables: mayor Hb1Ac, menor oligómero. Con respecto a la interacción entre glucosa e insulina, en los pacientes con glucosa baja (<200mg/dL) mayor dosis de insulina, menor oligómero, y con glucosa alta (>350mg/dL), al incrementarse la dosis de insulina, se incrementa el oligómero. Cuadro 2

La interacción entre las variables “meses de evolución” y “triglicéridos al estudio” fue significativa, es decir, de acuerdo con los meses de evolución DM, entre triglicérido y oligómero se observa asociaciones diferentes. Si un paciente tiene evolución de DM menor de 4 años, el valor de oligómero basal es mayor, si el valor de triglicérido es elevado, esta asociación deja observarse. El nivel de colesterol total presenta un efecto negativo para el valor de oligómero, siendo este

efecto independiente de los meses de evolución y del nivel de triglicéridos al estudio. Cuadro 3.

DISCUSIÓN

El considerar a la DM1 como enfermedad conformacional implica un cambio de paradigmas diagnóstico, terapéutico y de salud pública. Los homo y hetero-oligómeros citóxicos del péptido amiloide del islote (hIAPP), son las moléculas relevantes (Raleigh et al. 2017; Altamirano-Bustamante et al. 2019).

El proceso de agregación-oligomerización-fibrilación se desencadena porque la homeostasis proteica se satura y es incapaz de controlar el mal plegamiento de las proteínas (Sontag et al. 2017); es decir aumenta la agregación proteica y disminuye la capacidad de plegamiento de las proteínas a través de los sistemas de chaperoninas moleculares, exocitosis y sistema de ubiquitina (Chiti et al. 2017). Lo que da como resultado las enfermedades conformacionales, de las cuales la más relevantes en niños es la diabetes mellitus (Altamirano-Bustamante et al. 2019).

Nuestro grupo de investigación translacional integrado por médicos especialistas en endocrinología, investigadores biomédicos, ingenieros físicos, inmunólogos entre otros, desarrolló un inmunoensayo confiable y altamente específico para detectar estos oligómeros a través de un Elisa indirecto. Este inmunoensayo es fácil de implementar en cualquier clínica u hospital en los tres niveles de atención sanitaria. La cuantificación de oligómeros circulantes y la historia clínica completa son herramientas fundamentales para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la DM1.

En este estudio que incluyó 60 pacientes con DM1, por primera vez demostramos que los homo y hetero-oligómeros son circulantes en el torrente sanguíneo, se pueden cuantificar en plasma, el proceso de agregación es activo, son neurotóxicos y son biomarcadores tempranos de falla de la célula beta y un heraldo de la presencia de complicaciones crónicas.

Los pacientes con DM1 presentan niveles elevados de oligómeros de hIAPP circulantes y tienen diferencias significativas con respecto al grupo control que son niños y adolescentes sanos [(1.71 (1.10-2.02) $p < 0.001$] Figura 4. Este resultado es un parteaguas en la fisiopatología de la DM1, ya que se pueden explicar la multidimensionalidad de los factores que se han reportado en la literatura como agentes causales de la DM1.

La pérdida de la homeostasis proteica condiciona un estado latente de agregación de proteínas, que hace que el fenómeno de agregación sea cooperativo, es decir, que una vez que una proteína en este caso el hIAPP se agrega, desencadena la homo-agregación (formación de hIAPP oligómeros: trímeros, hexámeros, dodecámeros, etc) y, también la co-agregación, es decir que proteínas diferentes

al hIAPP que entran en contacto con sus oligómeros, empiezan a co-agregarse con el hIAPP (Altamirano-Bustamante et al. 2019), dando una plétora de alteraciones celulares, como por ejemplo en el caso de la DM1 desequilibrio en el sistema inmunitario (Chiti and Dobson 2017; Sontag et al. 2017; Tan et al. 2018), la glucotoxicidad y lipotoxicidad (Figuras 6-8,10), que provocan daño celular, desdiferenciación y finalmente apoptosis de la célula beta.

Este trabajo abre el horizonte epistémico de manera multidimensional, por un lado demuestra que la DM1 es una enfermedad conformacional, similar a la DM2, demostrado por la ausencia de diferencias significativas de la cuantificación de los oligómeros entre ambos tipos de DM (Figura 4), y al hecho de que demostramos la presencia de oligómeros en ambas. En segundo lugar, se proponen nuevos biomarcadores moleculares (los diferentes estados de agregación del hIAPP: homo y hetero- oligómeros, protofibrillas y fibras). Los nuevos biomarcadores tienen como característica principal: i). Son marcadores moleculares de diferentes etapas del proceso de falla de la célula beta (hay marcadores tempranos, pronósticos y tardíos). ii) Las características morfológicas de estos biomarcadores pueden estudiarse por métodos espectroquímicos y microscópicos. iii). Son estables a pH alcalinos, por lo cual pueden cuantificarse efectivamente por inmunoensayos robustos costo-efectivos. iv) Correlacionados con una excelente historia clínica, pueden disminuir el número de pruebas de laboratorio necesarios para el diagnóstico, pronóstico, evolución y respuesta al tratamiento de la DM1.v). Son nuevos blancos terapéuticos.

Lo precedente estimula una nueva era en el estudio de la DM1 y será el hilo conductor para acelerar la investigación de esta enfermedad que es catastrófica desde el punto de vista económico y social.

CONCLUSIONES

Es el primer estudio que demuestra la presencia de oligómero citotóxico del IAPP β en niños con DM1. Se encontraron factores que modifican la concentración de oligómeros citotóxicos, a saber la gluco-lipotoxicidad, el tiempo de evolución y la presencia de complicaciones crónicas.

A mayor tiempo de evolución, mayor nivel de glucosa, Mal control glucémico (HbA1c >9%), triglicéridos y dosis altas de insulina exógena se asocian con mayor cantidad de oligómeros citotóxicos.

El Mal control metabólico: hiperglucemia (glucosa > 350 mg/dl + HbA1c > 9%) + hipoglucemia (glucosa < 70 mg/dL) con mal control glucémico (HbA1c >9%) +dislipidemia (triglicéridos > 150 mg/dL y/o colesterol total > 150 mg/dL) se asocia con menor cantidad de oligómeros.

La presencia de complicaciones crónicas como hipertensión arterial o nefropatía determinada por microalbuminuria positiva mayor de 20 mcg/min se asoció con menor valor de oligómero.

Los oligómeros citotóxicos del IAPP β son biomarcadores de daño de célula β y su disminución el heraldo de complicaciones crónicas en pacientes con DM1.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad E, Ahmad A, Singh S, Arshad M, Khan AH, Khan RH. A mechanistic approach for islet amyloid polypeptide aggregation to develop anti-amyloidogenic agents for type-2 diabetes. *Biochimie* 2011;93:793-805.
- Altamirano-Bustamante MM, Altamirano-Bustamante NF, Larralde-Laborde M, et al (2019) 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* 9:18465. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54570-8>
- Atkinson, M.A., Bluestone, J.A., Eisenbarth, G.S., Hebrok, M., Herold, K.C., Accili, D., 2011. How does type 1 diabetes develop?: the notion of homicide or beta-cell suicide revisited. *Diabetes* 60(5):1370e1379.
- Bluestone, J.A., Herold, K., Eisenbarth, G., 2010. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature* 464(7293):1293e1300.
- Bucciantini M, Calloni G, Chiti F et al. Prefibrillar amyloid protein aggregates share common features of cytotoxicity. *J Biol Chem* 2004;279:31374-31382.
- Bucciantini M, Giannoni E, Chiti F et al. Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature* 2002;416:507-511.
- Butler AE, Galasso R, Meier JJ, Basu R, Rizza RA, Butler PC. Modestly increased beta cell apoptosis but no increased beta cell replication in recent-onset type 1 diabetic patients who died of diabetic ketoacidosis. *Diabetologia* 2007;50:2323-2331.
- Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 2003;52:102-110.
- Cardoso-Saldana G, Juarez-Rojas JG, Zamora-Gonzalez J et al. C-reactive protein levels and their relationship with metabolic syndrome and insulin resistance in Mexican adolescents. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2007;20:797-805.
- Carrell RW, Lomas DA. Alpha1-antitrypsin deficiency--a model for conformational diseases. *N Engl J Med* 2002;346:45-53.
- Carrell RW, Lomas DA. Conformational disease. *Lancet* 1997;350:134-138.
- Chiti F, Dobson CM (2017) Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annu Rev Biochem* 86:27-68. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045115>
- Chiti F, Dobson CM, Dikic I, et al (2017) Structural Studies of Amyloid Proteins at the Molecular Level. *Annu Rev Biochem* 86:193-224. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem>

- Christmansson L, Betsholtz C, Leckstrom A et al. Islet amyloid polypeptide in the rabbit and European hare: studies on its relationship to amyloidogenesis. *Diabetologia* 1993;36:183-188.
- Clark A, Cooper GJ, Lewis CE et al. Islet amyloid formed from diabetes-associated peptide may be pathogenic in type-2 diabetes. *Lancet* 1987;2:231-234.
- Clark A, Nilsson MR. Islet amyloid: a complication of islet dysfunction or an aetiological factor in Type 2 diabetes? *Diabetologia* 2004;47:157-169.
- Clark A, Wells CA, Buley ID et al. Islet amyloid, increased A-cells, reduced B-cells and exocrine fibrosis: quantitative changes in the pancreas in type 2 diabetes. *Diabetes Res* 1988;9:151-159.
- Cree-Green M, Stuppy, J.J., Thurston, J., Bergman, C. B., Coe, V.G., Baumgartner, D.A., Bacon, S., Scherzinger, a., Pyle, L and Nadeau J.K. Youth With Type 1 Diabetes Have Adipose, Hepatic, and Peripheral Insulin Resistance *J Clin Endocrinol Metab*, October 2018, 103(10):3647–3657
- Dabelea D, Mayer-Davis EJ, Saydah S, et al. Prevalence of type 1 and type 2 diabetes among children and adolescents from 2001 to 2009. *JAMA*. 2014; 311:1778–1786. [PubMed: 24794371]
- Fernandez-Busquets X, de Groot NS, Fernandez D, Ventura S. Recent structural and computational insights into conformational diseases. *Curr Med Chem* 2008;15:1336-1349.
- Gebbink M, Bouma B, Kranenburgo O, Kroon L, inventors. Cross-beta structure comprising amyloid binding proteins and methods for detection of the cross-beta structure, for modulating cross-beta structures fibril formation and for modulating cross-beta structure-mediated toxicity. (WO2004004698). 2004.
- Gepts W, De MJ. Islet cell survival determined by morphology. An immunocytochemical study of the islets of Langerhans in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes* 1978;27 Suppl 1:251-261.
- Goldberg AL. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 2003;426:895-899.
- Goldsbury C, Goldie K, Pellaud J et al. Amyloid fibril formation from full-length and fragments of amylin. *J Struct Biol* 2000;130:352-362.
- Gow A, Sharma R. The unfolded protein response in protein aggregating diseases. *Neuromolecular Med* 2003;4:73-94.
- Hayden MR, Tyagi SC, Kerklo MM, Nicolls MR. Type 2 diabetes mellitus as a conformational disease. *JOP* 2005;6:287-302.
- Hoppener JW, Oosterwijk C, Verbeek SJ et al. IAPP/amylin transgenic mice as an in vivo model system for type-2 diabetes mellitus? *Biochem Soc Trans* 1993;21:28S.

- Hoppener JW, Verbeek JS, de Koning EJ et al. Chronic overproduction of islet amyloid polypeptide/amylin in transgenic mice: lysosomal localization of human islet amyloid polypeptide and lack of marked hyperglycaemia or hyperinsulinaemia. *Diabetologia* 1993;36:1258-1265.
- Hoppener JW, Ahren B, Lips CJ. Islet amyloid and type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 2000;343:411-419.
- Hoppener JW, Nieuwenhuis MG, Vroom TM, Ahren B, Lips CJ. Role of islet amyloid in type 2 diabetes mellitus: consequence or cause? *Mol Cell Endocrinol* 2002;197:205-212.
- Hoppener JW, Lips CJ. Role of islet amyloid in type 2 diabetes mellitus. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38:726-736.
- Hull RL, Westermark GT, Westermark P, Kahn SE. Islet amyloid: a critical entity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:3629-3643.
- Jaikaran ET, Clark A. Islet amyloid and type 2 diabetes: from molecular misfolding to islet pathophysiology. *Biochim Biophys Acta* 2001;1537:179-203.
- Jaikaran ET, Higham CE, Serpell LC et al. Identification of a novel human islet amyloid polypeptide beta-sheet domain and factors influencing fibrillogenesis. *J Mol Biol* 2001;308:515-525.
- Janson J, Ashley RH, Harrison D, McIntyre S, Butler PC. The mechanism of islet amyloid polypeptide toxicity is membrane disruption by intermediate-sized toxic amyloid particles. *Diabetes* 1999;48:491-498.
- Junker K, Egeberg J, Kromann H, Nerup J. An autopsy study of the islets of Langerhans in acute-onset juvenile diabetes mellitus. *Acta Pathol Microbiol Scand A* 1977;85:699-706.
- Kahn SE, Andrikopoulos S, Verchere CB. Islet amyloid: a long-recognized but underappreciated pathological feature of type 2 diabetes. *Diabetes* 1999;48:241-253.
- Kajava AV, Baxa U, Steven AC. Beta arcades: recurring motifs in naturally occurring and disease-related amyloid fibrils. *FASEB J* 2010;24:1311-1319.
- Kapurniotu A. Amyloidogenicity and cytotoxicity of islet amyloid polypeptide. *Biopolymers* 2001;60:438-459.
- Kayed R, Head E, Thompson JL et al. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 2003;300:486-489.
- Kloppel G, Drenck CR, Oberholzer M, Heitz PU. Morphometric evidence for a striking B-cell reduction at the clinical onset of type 1 diabetes. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1984;403:441-452.
- Kloppel G, Lohr M, Habich K, Oberholzer M, Heitz PU. Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited. *Surv Synth Pathol Res* 1985;4:110-125.

- Lernmark A, Kloppel G, Stenger D et al. Heterogeneity of islet pathology in two infants with recent onset diabetes mellitus. *Virchows Arch* 1995;425:631-640.
- Lin JC, Liu HL. Protein conformational diseases: from mechanisms to drug designs. *Curr Drug Discov Technol* 2006;3:145-153.
- Lorenzo A, Razzaboni B, Weir GC, Yankner BA. Pancreatic islet cell toxicity of amylin associated with type-2 diabetes mellitus. *Nature* 1994;368:756-760.
- Maahs DM, West NA, Lawrence JM, Mayer-Davis EJ. Chapter 1: epidemiology of type 1 diabetes. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2010; 39:481-497. [PubMed: 20723815]
- Matveyenko AV, Butler PC. Relationship between beta-cell mass and diabetes onset. *Diabetes Obes Metab* 2008;10 Suppl 4:23-31.
- Meier JJ, Bhushan A, Butler AE, Rizza RA, Butler PC. Sustained beta cell apoptosis in patients with long-standing type 1 diabetes: indirect evidence for islet regeneration? *Diabetologia* 2005;48:2221-2228.
- Meier.JJ., Butler PC. *Insulin secretion*. 5th ed. DeGroot LJ, 2005.
- Mendre C, Mouillac B. [Pharmacological chaperones: a potential therapeutic treatment for conformational diseases]. *Med Sci (Paris)* 2010;26:627-635.
- Nam HB, Kouza M, Zung H, Li MS. Relationship between population of the fibril-prone conformation in the monomeric state and oligomer formation times of peptides: insights from all-atom simulations. *J Chem Phys* 2010;132:165104.
- Nicolls MR. The clinical and biological relationship between Type II diabetes mellitus and Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2004;1:47-54.
- Patterson, C.C., Dahlquist, G.G., Gyürüs, E., Green, A., Soltész, G., 2009. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. *The Lancet* 373(9680):2027e2033.
- Pepys MB. Pathogenesis, diagnosis and treatment of systemic amyloidosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001;356:203-210.
- Perutz MF. Glutamine repeats and inherited neurodegenerative diseases: molecular aspects. *Curr Opin Struct Biol* 1996;6:848-858.
- Pontiroli AE. Type 2 diabetes mellitus is becoming the most common type of diabetes in school children. *Acta Diabetol* 2004;41:85-90.
- Pul R, Dodel R, Stangel M. Antibody-based therapy in Alzheimer's disease. *Expert Opin Biol Ther* 2011;11:343-357.

- Rahimi F, Shanmugam A, Bitan G. Structure-function relationships of pre-fibrillar protein assemblies in Alzheimer's disease and related disorders. *Curr Alzheimer Res* 2008;5:319-341.
- Raleigh D, Zhang X, Hastoy B, Clark A (2017) The β -cell assassin: IAPP cytotoxicity. *J Mol Endocrinol* 59:R121–R140. <https://doi.org/10.1530/JME-17-0105>
- Rhodes CJ. Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? *Science* 2005;307:380-384.
- Sakuraba H, Mizukami H, Yagihashi N, Wada R, Hanyu C, Yagihashi S. Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese Type II diabetic patients. *Diabetologia* 2002;45:85-96.
- Sandefur CI, Schnell S. A model of threshold behavior reveals rescue mechanisms of bystander proteins in conformational diseases. *Biophys J* 2011;100:1864-1873.
- Scherm G.M., Serr I., Kaestner H.K, Daniel C. The role of T cell miRNAs for regulatory T cell induction in islet autoimmunity. *Mol Metab* 27 (2019) S122eS128.
- Sims K.E., DiMeglio, A.L. Cause or effect? A review of clinical data demonstrating beta cell dysfunction prior to the clinical onset of type 1 diabetes. *MOLECULAR METABOLISM* 27 (2019) S129eS138.
- Sims, K.E., Linda A. DiMeglio A. L., Molecular Cause or effect? A review of clinical data demonstrating beta cell dysfunction prior to the clinical onset of type 1 diabetes *Metabolism* 27 (2019) S129eS138.
- Sontag EM, Samant RS, Frydman J (2017) Mechanisms and Functions of Spatial Protein Quality Control. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem>
- Soto C. Protein misfolding and disease; protein refolding and therapy. *FEBS Lett* 2001;498:204-207.
- Talchai C, Xuan S, Lin HV, Sussel L, Accili D. Pancreatic β cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic β cell failure. *Cell*. 2012;150(6):1223–1234.
- Tan CSH, Go KD, Bisteau X, et al (2018) Thermal proximity coaggregation for system-wide profiling of protein complex dynamics in cells. *Science* (80-) 359:1170–1177. <https://doi.org/10.1126/science.aan0346>
- Uversky VN, Oldfield CJ, Dunker AK. Intrinsically disordered proteins in human diseases: introducing the D2 concept. *Annu Rev Biophys* 2008;37:215-246.
- Uversky VN. Nanoimaging in protein-misfolding and -conformational diseases. *Nanomedicine (Lond)* 2007;2:615-643.
- Wang F, Hull RL, Vidal J, Cnop M, Kahn SE. Islet amyloid develops diffusely throughout the pancreas before becoming severe and replacing endocrine cells. *Diabetes* 2001;50:2514-2520.

- Weiss R, Dziura J, Burgert TS et al. Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. *N Engl J Med* 2004;350:2362-2374.
- Weiss R, Taksali SE, Tamborlane WV, Burgert TS, Savoye M, Caprio S. Predictors of changes in glucose tolerance status in obese youth. *Diabetes Care* 2005;28:902-909.
- Westermarck P, Engstrom U, Johnson KH, Westermarck GT, Betsholtz C. Islet amyloid polypeptide: pinpointing amino acid residues linked to amyloid fibril formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:5036-5040.
- World Health Organization. Preventing chronic disease: A vital investment. 2005.
- Xianjie W. Emerging roles of GLIS3 in neonatal diabetes, type 1 and type 2 diabetes. *Journal of Molecular Endocrinology* (2017) 58, R73–R85
- Yerbury JJ, Stewart EM, Wyatt AR, Wilson MR. Quality control of protein folding in extracellular space. *EMBO Rep* 2005;6:1131-1136.
- Yoon KH, Ko SH, Cho JH et al. Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2300-2308.

ANEXO 1 CUADROS

	Control (N=16)	Obesidad (N=47)	DM2 (N=39)	DM1 (N=60)	P
Sexo [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 (4.5, 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 (35, 61)	40 (28, 81)	42 (23, 72)	48 (30, 68)	0.005
Triglicéridos [mg/dL]	86 (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
Tx. con insulina.	---	---	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 1. 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

	θ (SE)	t-ratio	P-value
Intercepto	3.0466 (0.8705)	3.50	<0.001
Evolución [meses]	0.0100 (0.0041)	2.46	0.017
Insulina [UI kg/día]	-0.4697 (0.5130)	-0.92	0.364
Glucosa al estudio [mg/dL]	0.0051 (0.0016)	3.26	0.002
HbA1c al estudio [%]	-0.1076 (0.0870)	-1.24	0.221
Evolución*HbA1c	-0.0038 (0.0020)	-1.89	0.064
Glucosa*Insulina	0.0138 (0.0036)	3.83	<0.001

θ : coeficiente de regresión, SE: error estándar. R^2 ajustado=0.29, Modelo total: $P < 0.001$

Cuadro 2. Modelo de regresión lineal múltiple para determinar las variables que presentan la asociación con el valor de oligómero beta1 en pacientes con DM1

	β (SE)	t-ratio	P-value
Intercepto	4.7708 (0.7720)	6.18	<0.001
Meses de evolución	0.0076 (0.0043)	1.76	0.083
Triglicéridos al estudio	0.0049 (0.0017)	2.93	0.005
Colesterol al estudio	-0.0133 (0.0051)	-2.59	0.012
Meses de evolución*Triglicérido al estudio	-0.0001 (5.2x10 ⁻³)	-2.27	0.027

β : coeficiente de regresión, SE: error estándar. R² ajustado= 0.21, Modelo total: P<0.001

Cuadro 3. Modelo de regresión lineal múltiple para determinar las variables que presentan la asociación con el valor de oligómero basal en pacientes con DM1

DM1

ANEXO 2. FIGURAS

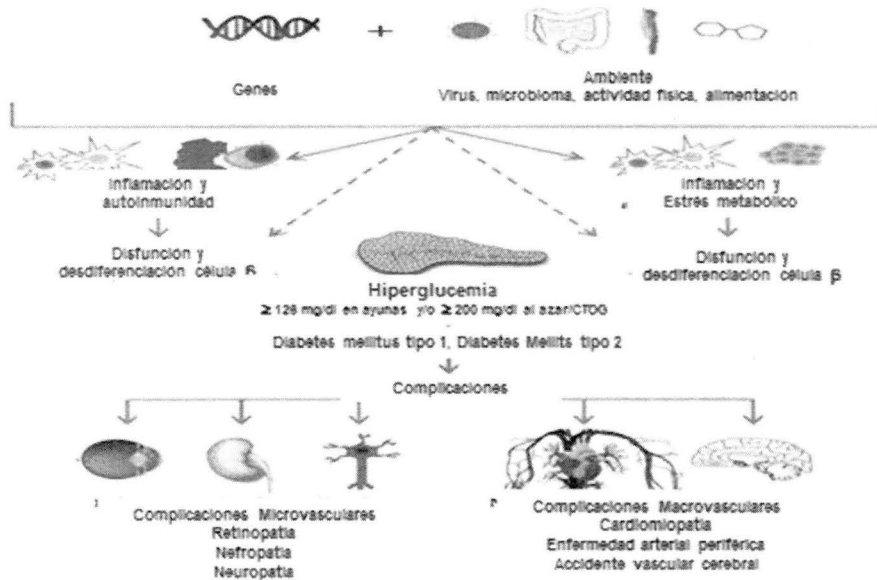


Fig 1. Factores genéticos y ambientales que provocan inflamación, estrés metabólico e inducen disfunción, desdiferenciación y muerte de célula β en DM tipo 1 y tipo 2. CTOG: 2 horas en curva de tolerancia oral a la glucosa. Tomado de: Skyler SJ et al. Differentiation of Diabetes by Pathophysiology, Natural History, and Prognosis. Diabetes 2017; 66 (2): 241-255

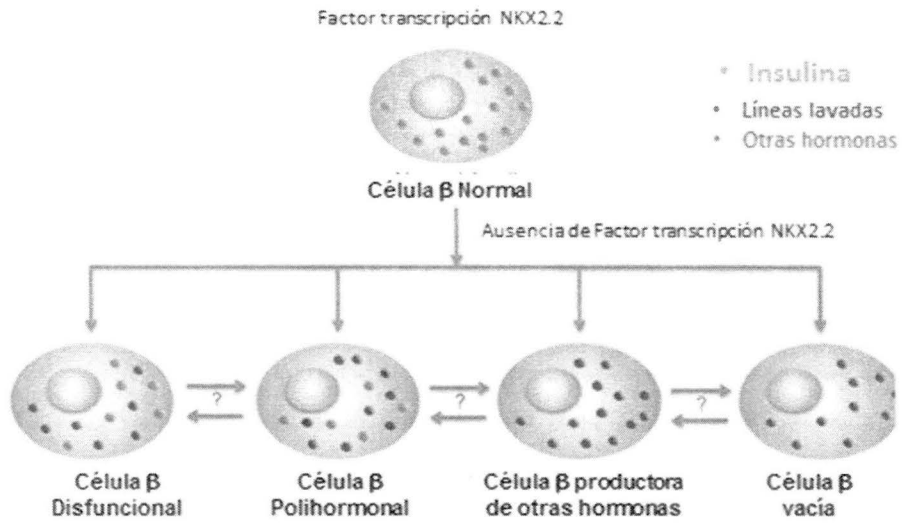


Fig 2 Mecanismo de NKX2.2 sobre la dediferenciación de la célula beta adulta, disfunción con menor producción de insulina (disfuncional), mayor producción de polipéptido pancreático (polihormonal), o pérdida de capacidad secretora (Vcía). Se ignora si estas poblaciones se originan independientemente o son capaces de interconvertirse. Tomado de Domínguez-Gutiérrez G. Pancreatic β cell identity requires continual repression of non- β cell programs. Clin investigation 2017; 127 (1): 244-259.

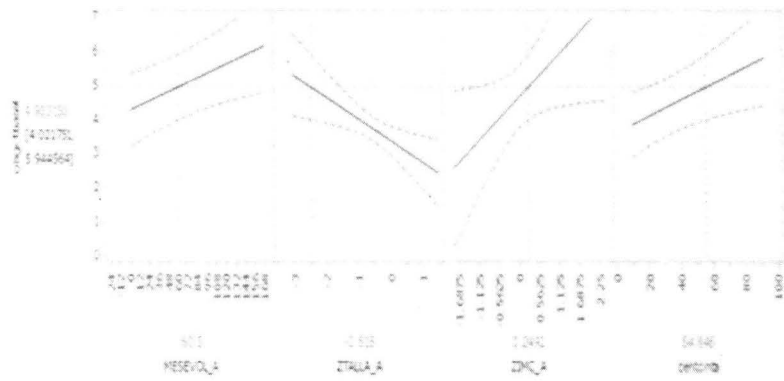


Figura 5. Encontramos que la cantidad de oligómeros aumenta conforme aumenta el tiempo de evolución, la Z de índice de masa corporal y la centila de cintura. ($p < 0.05$)

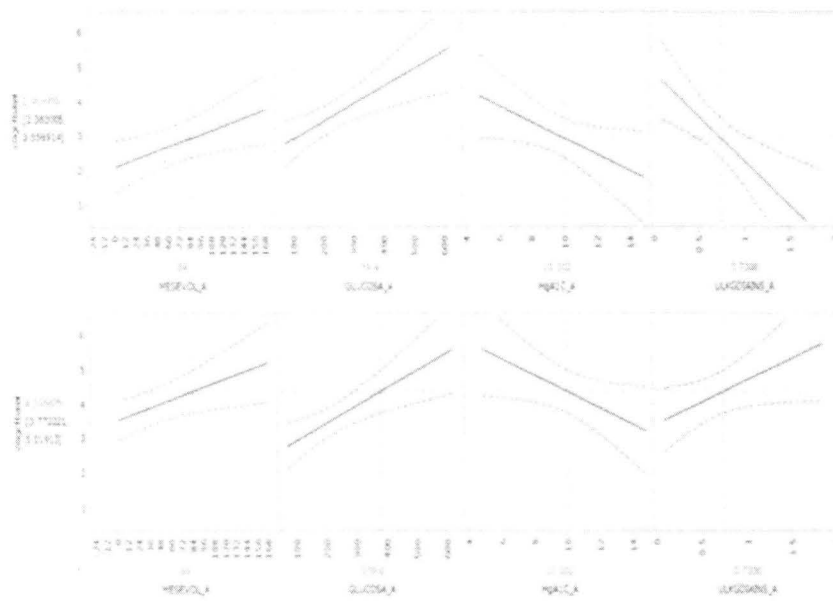


Figura 6. Interacción entre glucosa –dosis de insulina exógena. Encontramos que la cantidad de oligómeros aumenta cuando la glucosa es mayor de 300 mg/dL y la dosis de insulina mayor de 0.7 UI/Kg/día ($p = 0.001$).

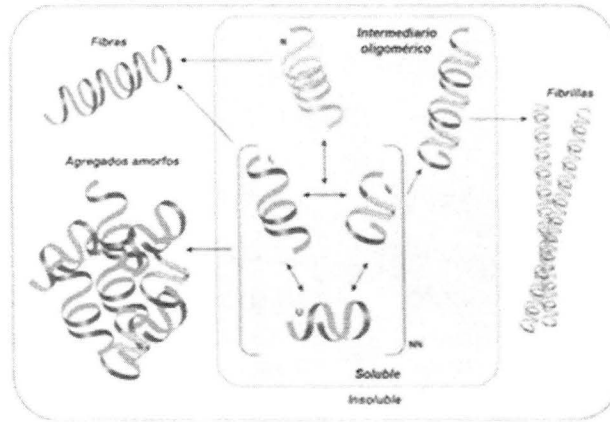


Fig. 3 (modificado de Yerburi y col.²⁴). Esquema del proceso de agregación. N es la estructura nativa, N_N es la estructura no nativa. I1 e I2 son intermediarios y especies parcialmente plegadas. D es la forma desplegada de la proteína. Las estructuras no nativas tienden a asociarse entre ellas y formar agregados. Las formas solubles se muestran en el recuadro azul.

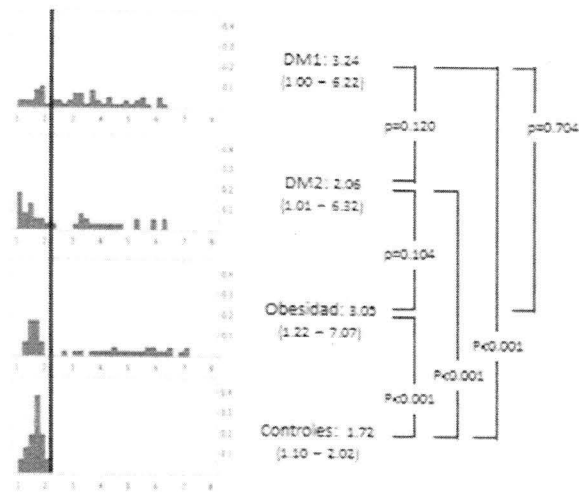


Figure 4. Distribución de los oligómeros citotóxicos en los cuatro grupos. La comparación de los resultados entre los grupos se realizó por prueba de Welch. DM1 Diabetes mellitus tipo 1, DM2 diabetes mellitus tipo 2.

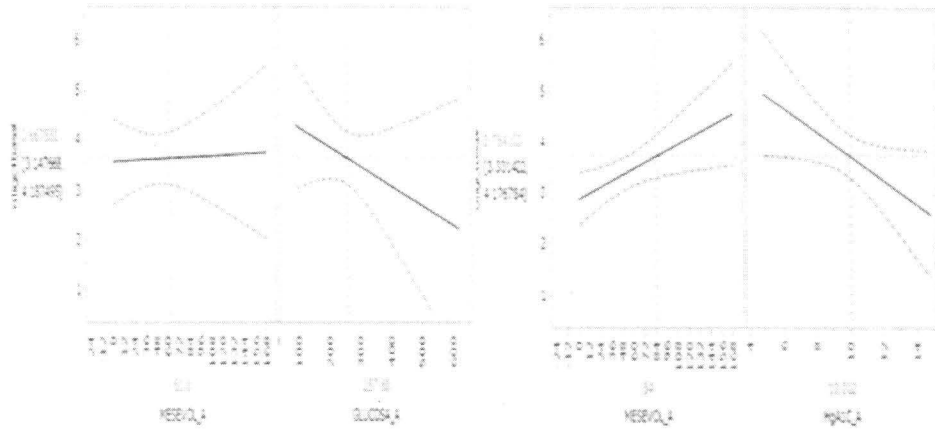


Figura 7. Modelo regresión lineal general. Asociación entre tiempo de evolución, descontrol glucémico y oligómeros oxidados (OC). En Evolución mayor de 5 años con mal control glucémico (glucosa mayor de 250 mg/dL, y HbA1c mayor de 10% la cantidad de OC disminuye.

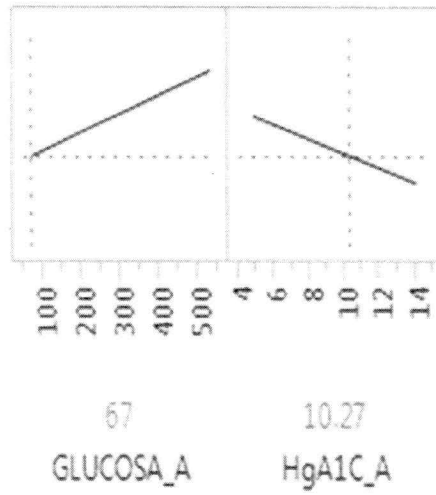


Figura 8. Encontramos Asociación entre la variabilidad de la glucosa y la cantidad de OC. Pacientes con hipoglucemia (glucosa < 70 mg/dl) pero con mal control glucémico medido por HbA1 (>10%) menor cantidad de OC.

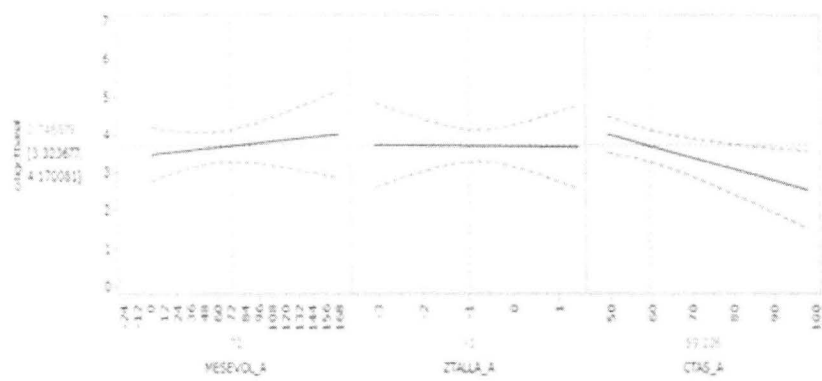


Figura 9. Modelo regresión lineal general. Asociación entre tiempo de evolución, hipertensión arterial y oligómeros cistatinicos (OC). En Evolución mayor de 7 años con presión arterial mayor de la centila 90 la cantidad de OC disminuye ($p = 0.0015$).

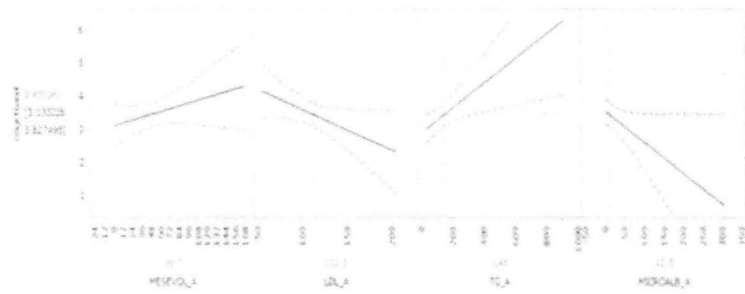


Figura 10. Encontramos Asociación entre el aumento de colesterol de LDL (>110 mg/dl) y de microalbuminuria positiva (>20 mcg/min) y disminución en la cantidad de oligómeros. $p < 0.05$

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 la enfermedad	Cuantitativa Numérica discreta	Años cumplidos con meses
Evolución de DM 2	Tiempo desde el diagnóstico de la 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	Cuantitativa Numérica,	valor

insulina en ayunas /405 Continua

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 PEDIATRÍA

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 IAAP 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 hrs 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 esto 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 esto 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.

¿Puedo 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 _____