UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

ASOCIACIÓN DE LOS AGREGADOS OLIGOMÉRICOS DEL POLIPÉPTIDO AMILOIDE DEL ISLOTE CON MARCADORES DE INFLAMACIÓN SISTÉMICA EN NIÑOS Y ADOLESCENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 1 COMPARADOS CON PACIENTES CON OBESIDAD Y DIABETES MELLITUS TIPO 2

TESIS PARA OBTENER EL TITULO DE SUBESPECIALISTA EN ENDOCRINOLOGÍA PEDIÁTRICA

PRESENTA

MIGUEL ÁNGEL BLANCO URIARTE

DRA. NELLY FRANCISCA ALTAMIRANO BUSTAMANTE
TUTOR T E Ó R I C O

DRA. MYRIAM MARLENNE ALTAMIRANO BUSTAMANTE
COTUTOR TEÓRICO

M en C CHIHARU MURATA
TUTOR METODOLOGICO

CIUDAD DE MÉXICO 2025

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

"ASOCIACIÓN DE LOS AGREGADOS OLIGOMÉRICOS DEL POLIPÉPTIDO AMILOIDE DEL ISLOTE CON MARCADORES DE INFLAMACIÓN SISTÉMICA EN NIÑOS Y ADOLESCENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 1 COMPARADOS CON PACIENTES CON OBESIDAD Y DIABETES MELLITUS TIPO 2"

DR. AARÓN PACHECO RÍOS
ENCARGADO DE LA DIRECCIÓN DE ENSEÑANZA

DRA. NANCY EVELYN AGUILAR GÓMEZ
ENCARGADA DE LA SUBDIRECCIÓN DE PROGRAMACIÓN Y EVALUACION EDUCATIVA

DRA. CECILIA EUGENIA LÓPEZ ANDRADE
JEFA DEL DEPTO. DE PRE Y POSGRADO

DR. RAÚL CALZADA LEÓN
PROFESOR TITULAR DEL CURSO

DRA. NELLY F. ALTAMIRANO BUSTAMANTE
TUTOR DE TESIS

DRA. MYRIAM M. ALTAMIRANO BUSTAMANTE
COTUTOR

M. EN C. CHIHARU MURATA
ASESOR METODOLÓGICO

ÍNDICE

RESUMEN *1*

MARCO TEÓRICO *4*

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA *17*

JUSTIFICACIÓN *18*

OBJETIVO *19*

HIPÓTESIS *20*

MATERIALES Y MÉTODO *21*

ANÁLISIS ESTADÍSTICO *26*

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES *29*

RESULTADOS *30*

DISCUSIÓN *33*

CONCLUSIONES *35*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS *36*

RESUMEN

Introducción: La diabetes Tipo 1 (DT1) es una enfermedad crónica que constituye una de las principales causas de morbilidad y mortabilidad a nivel global, con una incidencia creciente en las últimas décadas. Una característica de la DT1 es la deficiencia total de insulina producida por las células β del páncreas. En la diabetes tipo 2 (DT2) es claro que la célula β se ve dañada por el depósito de un agregado proteíco derivado de la amilina o h*IAPP*, al que llamamos *RIAO* real human islet amyloid polypeptide amyloid Oligomers. El papel del *RIAO* en DT1 es menos claro, pero se ha encontrado (en trabajos de este grupo de investigación) presente en el suero de niños con DT1. Hay evidencia de que la presencia de este material proteíco actúa como un potente agente inflamatorio, destacando la relación entre la inflamación sistémica y los agregados proteícos en enfermedades metabólicas. Además, los depósitos de amiloide en el páncreas se consideran marcadores clave de progresión de diabetes, por lo que se busca correlacionar la cantidad de *RIAO* en nuestros diferentes pacientes con la concentración sérica de citocinas inflamatorias. Los resultados obtenidos en este estudio posicionan y demuestran que *RIAO* es un biomarcador temprano de falla de la célula β y que junto con los biomarcadores inflamatorios, como las interleucinas, describen la fisiopatología de la apoptosis de la célula β.(N. F. Altamirano-Bustamante et al., 2020b; Calderón-Hernández et al., 2021a)

Justificación: En la DT1, el daño por autoinmunidad a la célula β conduce a una deficiencia absoluta de insulina. Es bien conocido el papel de los derivados citotóxicos proteícos de h*IAPP* o amilina (conocidos como *RIAO*) en el daño a la célula β en DT2, de tal forma que ya se considera una proteinopatía. Previamente, en este grupo de investigación se descubrió que los niveles de *RIAO* también están elevados en el suero de pacientes con DT1 que presentan un mal control glucémico. Sin embargo, no está claro si la presencia de *RIAO* ocasiona inflamación sistémica, especialmente en niños con DT1. La presencia de citocinas inflamatorias ocasiona daño celular, lo que podría explicar la participación de *RIAO* como evento causante de daño en DT1. En un futuro podrían existir tratamientos cuyo objetivo sea la

inhibición de *RIAO*, evitando así el daño celular y la mejor del manejo de la enfermedad.

Planteamiento del problema: En la literatura, los biomarcadores de falla temprana de las células β en DT1 son, principalmente, marcadores de inflamación sistémica. En un estudio previo demostramos que los agregados oligoméricos del polipéptido amiloide del islote (*RIAO*) condiciona daño al islote y puede utilizarse como un marcador sensible y específico de diabetes mellitus como enfermedad conformacional. Con el fin de mejorar nuestro entendimiento sobre la contribución de la disfunción de la célula β en la historia natural de la DT1, realizamos este estudio para conocer la asociación entre *RIAO* y citocinas sistémicas, considerando ambos como posibles marcadores tempranos de daño en la célula β.

Objetivo general: Identificar la asociación entre los agregados oligoméricos del polipéptido amiloide del islote (*RIAO*, real human islet amyloid polypeptide amyloid Oligomers) y las interleucinas 2, 4, 5, 6, 10, 13, TNF2 IFN- γ en niños y adolescentes con DT1 como biomarcadores moleculares del daño a las células β**.**

Objetivos específicos:

1. Identificar la asociación entre la presencia de *RIAO* y citocinas inflamatorias sistémicas.

2. Identificar si la concentración de citocinas proinflamatorias aumenta conforme progresa el daño a las células β medido por el control glucémico.

3. Valorar si la concentración de citocinas proinflamatorias cambia con la presencia de complicaciones de la Diabetes.

Tipo de estudio: Estudio de cohorte histórica, transversal, observacional, analítico, descriptivo y comparativo.

Criterios de selección: Se revisaron los expedientes de niños y adolescentes de 4-18 años de edad con diagnóstico de DT1, que tengan determinación de *RIAO* y cuenten con una alícuota congelada que se usó para la determinación de citocinas sistémicas inflamatorias mediante el método de perlas de captura y lectura con citometría de flujo.

Análisis estadístico: La distribución de las variables cuantitativas se describió por la mediana con el valor mínimo y máximo, mientras que las variables cualitativas se describieron con frecuencias simples (número y porcentaje). La diferencia entre medias fue determinada mediante la prueba de Welch. La diferencia entre grupos de las variables categóricas se realizó utilizando la prueba chi-cuadrada. Se construyeron modelos mixtos de análisis de regresión múltiples o por conglomerados para buscar la asociación con la presencia de complicaciones. Se consideró significativa una $p<0.05$. El análisis se realizará utilizando el software JMP11 de SAS Institute, Inc.

MARCO TEÓRICO

El término “Diabetes Mellitus” (DM) decribe un trastorno metabólico caracterizado por hiperglucemia crónica, resultado de defectos en la secreción de insulina, la acción de la insulina, o ambas (“Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2022,” 2022).

La clasificación de la DM se basa en aspectos etiopatogénicos, es decir, en la causa subyacente de la enfermedad y se divide de la siguiente manera (“Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2022,” 2022):

1. Diabetes tipo 1 (DT1): Ocurre destrucción de células β, generalmente debido a un proceso autoinmune, lo que ocasiona deficiencia absoluta de insulina.
2. Diabetes tipo 2 (DT2): Deficiencia relativa de insulina junto con resistencia a esta.
3. Diabetes Gestacional (DMG): Diagnosticada durante el embarazo.
4. Otros tipos de Diabetes: Incluyen MODY, Diabetes Neonatal y otras formas de diabetes causadas por defectos genéticos o condiciones específicas.

EPIDEMIOLOGÍA DE LA DT1.

Hay una necesidad urgente de contar con mejores datos epidemiológicos sobre la DT1 infantil a nivel mundial. Se estima, mediante modelos matemáticos, que actualmente en el mundo existen 1.48 millones de personas, de entre 0 y 19 años, con DT1 (Gregory et al., 2022).

El proyecto “T1D Index” es un estudio prospectivo que actualmente se lleva a cabo para conocer epidemiología de la DT1, financiado por organizaciones como *Life For A Child, Juvenile Diabetes Research Foundation* y la ISPAD. La primera publicación de este estudio (T1D index) apareció en la revista *The Lancet* en 2022, presentando datos donde se utiliza un modelo de Markov de tiempo discreto para proyectar cuál

será la prevalencia y la carga de la enfermedad hasta el año 2040 (Gregory et al., 2022). Este modelo, además de la prevalencia, estima la incidencia, mortalidad y expectativa de vida en todos los países, incluso cuando no se cuente con datos epidemiológicos.

De acuerdo con este modelo matemático, para el año 2040 habrá 17.4 millones de personas en el mundo viviendo con DT1. De acuerdo con este mismo estudio, en la actualidad existen alrededor de 8.7 millones de casos de DT1, por lo que existirá un aumento del 107% en la prevalencia de la enfermedad.

Se estima que hubo 510,000 casos incidentes de DT1 en 2021. La edad media al diagnóstico fue de 32 años, mientras que la mediana fue de 29 años. Se observó un primer pico de incidencia global entre los 10 y 14 años de vida. Se estima que en 2021 ocurrieron 175,000 muertes atribuibles a DT1, de las cuales 40,000 tuvieron lugar en África Subsahariana y 42,000 en el sur de Asia. Se estima que la falta de diagnóstico es responsable de hasta el 68% de las muertes por DT1 en el grupo de menores de 25 años (Gregory et al., 2022).

En México se estimó una prevalencia de 89,408 casos de DT1 en 2021, de los cuales, 11,414 (el 12.7%) eran menores de 20 años (Gregory et al., 2022).

Los estudios que evalúan la expectativa de vida de los pacientes con esta condición presentan resultados heterogéneos. En algunos países de África, la expectativa de vida después del diagnóstico es de tan solo 7 años, mientras que en países desarrollados supera los 70 (Ogle et al., 2023).

ETIOLOGÍA Y PATOGENIA

La etiología de la DT1 es multifactorial e involucra tanto la susceptibilidad genética (haplotipos de HLA DR3/DR4, DQ2/DQ8) como factores ambientales, tales como infección por enterovirus o rubeola congénita.

Por ejemplo, entre el 30–50% de los niños con DT1 tienen el haplotipo combinado DR3-DQ2 y DR4-DQ8 (Pociot & Lernmark, 2016). Los factores de riesgo (genéticos y ambientales) inician una secuencia de eventos que activan células T autoreactivas y, posteriormente, causan la pérdida de la secreción de insulina por daño a la célula β.

La masa de células β pancreáticas puede ser calculada por morfología volumétrica y se estima que va de 250,000 a 1,000,000 de islotes (equivalentes a 250 millones a 1000 millones de células β). Aunque no puede ser medida en sujetos vivos, se sabe que la sensibilidad y la secreción de insulina están directamente correlacionados con la masa de células β (Weir et al., 2020).

La DT1 se divide en cuatro etapas que van desde la autoinmunidad silente hasta la diabetes establecida y de larga evolución (Tabla 1).

Tabla 1. Etapas de progresión de la DT1 (Besser et al., 2022).

Etapa	Característica
Etapa 1	Seroconversión (> 2 auto-anticuerpos), normoglucemia.
Etapa 2	Seroconversión y disglucemia.
Etapa 3	Etapa sintomática. Autoinmunidad y Diabetes.
Etapa 4	Diabetes de larga evolución.

Actualmente, el tratamiento de la DT1 se basa en el reemplazo de la insulina faltante con análogos de esta y no en el tratamiento de la causa de la disfunción de la célula β. Las citocinas inflamatorias contribuyen a la destrucción de la célula β y son candidatas al desarrollo de terapia inmunológica.

Con la posibilidad actual de definir a los individuos que están en riesgo de DT1, basado en el HLA de alto riesgo y las seropositividad a autoanticuerpos, el entendimiento del período prediabético de la enfermedad ha mejorado significativamente.

Existen estudios prospectivos que siguen desde el nacimiento a niños con riesgo incrementado de DT1, los cuales revelan que los anticuerpos para GAD65, IA-2 o para la pérdida de la capacidad para secretar insulina en respuesta a glucosa puede desarrollarse muchos años antes del diagnóstico de diabetes (Krischer et al., 2019). Las manifestaciones clínicas no ocurren hasta que existe una pérdida de 80 a 90% de la reserva de células β.

MECANISMOS DE DAÑO A LA CÉLULA β

La evidencia de que la muerte de la célula β es un evento clave en la patogenia de la DT1 deriva de estudios histopatológicos que comparan el páncreas de sujetos con DT1 y sujetos sanos. Muchos factores contribuyen a la muerte de la célula β durante la progresión de la diabetes, entre los cuales seincluyen (N. Mukherjee et al., 2021):

1. Autoinmunidad.
2. Depósito de amiloide en el islote.
3. Señalización de citocitnas proinflamatorias.
4. Estrés del retículo endoplásmico.
5. Estrés oxidativo.
6. Elevación de la concentración sérica de glucosa y ácidos grasos.

Se piensa que la DT1 es producto de la destrucción de células β sanas por células T auto-reactivas (células T CD4+, CD8+). En 1974 se detectaron por primera vez anticuerpos contra proteínas de las células del islote en el suero de pacientes con DT1 (Bottazzo et al., 1974).

Los anticuerpos que se encuentran en individuos con DT1 incluyen:

1. Anticuerpo contra la proteína citoplásmica de las células del islote (ICA).
2. Anticierpo contra insulina (IAA).
3. Anticuerpo contra la decarboxilasa de ácido glutámico (GAD65).
4. Anticuerpo contra la proteína antigeno 2 del insulinoma (IA-2).
5. Anticuerpo contra el transportador de Zinc 8 (ZnT8).

La presencia de alguno de estos anticuerpos se encuentra en al menos el 95% de los individuos con DT1 (N. Mukherjee et al., 2021).

El exceso de glucosa incrementa la producción de superóxido mitocondrial, una especie reactiva de oxígeno. Este incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno crea un ambiente tóxico para el islote e impide tanto la expresión del gen de la insulina como la secreción de insulina. A este fenómeno se le conoce como glucotoxicidad (Poitout & Robertson, 2008).

La diabetes comúnmente se acompaña de niveles elevados de colesterol, triglicéridos y ácidos grasos libres. La exposición prolongada de la célula β a estos ácidos inhibe la expresión del gen de la insulina (Poitout & Robertson, 2008).

Las células β dependen de antioxidantes para combatir el daño causado por especies reactivas de oxígeno, pero a diferencia al resto de la células, carecen de niveles sustanciales de glutatión peroxidasa o catalasa, que son poderosos antioxidantes endógenos.

La disfunción y pérdida de las células β está asociada con la acumulación de agregados protéicos de polipéptido amiloide del islote humano (h*IAPP*), que consisten en oligómeros fibrilares, tanto solubles como insolubles, en el islote pancreático (Wirth et al., 2023).

LAS ENFERMEDADES CONFORMACIONALES

Una enfermedad conformacional (proteinopatía) ocurre cuando una proteína experimenta un plegamiento anómalo, lo que lleva a la agregación o acumulación de proteínas que afectan la función celular (Kopito & Ron, 2000). Este plegamiento incorrecto puede causar un proceso biológico disfuncional, resultando en una enfermedad, ya sea por citotoxicidad aumentada o por deficiencia de proteínas funcionales.

Cuando los controles de calidad en el plegamiento de las proteínas no son suficientemente eficientes, se acúmulan complejos proteícos citotóxicos. Algunos ejemplos de enfermedades conformacionales son:

1. Enfermedad de Alzheimer
2. Enfermedad de Parkinson
3. Encefalopatía espongiforme.
4. Diabetes tipo 2

LA DIABETES MELLITUS TANTO LA TIPO 1 COMO LA TIPO 2 SON UNA ENFERMEDAD CONFORMACIONAL

En 1901, Eugene Opie reportó una forma de degeneración hialina en los islotes pancreáticos asociada con la diabetes (Opie, 1901), fenómeno que hoy se entiende como depósito de amiloide. El amiloide se refiere a los depósitos proteináceos, anormales, fibrosos y extracelulares encontrados en órganos y tejidos. Las fibrillas de amiloide son formadas por proteínas normalmente solubles que se ensamblan anormalmente para formar fibrillas insolubles que son resistentes a la degradación.

La DT2 es un trastorno crónico-metabólico caracterizado por la resistencia a la insulina y pérdida progresiva de células β, lo que resulta en deficiencia de insulina y, eventualmente, en hiperglucemia (Petersmann et al., 2019). Es bien reconocida en la DT2 la formación de amiloide (derivado del polipéptido amiloide del islote

h*IAPP*) como un factor clave para generar daño a la célula β (Denroche & Verchere, 2018).

La muerte de la célula β (en DT2) se acompaña de la acumulación y agregación del *IAPP* o amilina, la cual se co-secreta con la insulina y forma amiloide en la mayoría de las personas que viven con DT2 (se encuentra material amiloide derivado del *IAPP* en 90% de las personas que viven con DT2) (A. Mukherjee et al., 2015) (Wirth et al., 2023).

El polipéptido amiloide del islote (*IAPP*) humano (h*IAPP*) es amiloidogénico y se puede agregar en estructuras que incluyen oligómeros, protofibrillas y, eventualmente, fibrillas de amilodie (M. M. Altamirano-Bustamante et al., 2019a).

EL POLIPÉPTIDO AMILOIDE DEL ISLOTE HUMANO (h*IAPP*)

También conocido como amilina, *IAPP* es una hormona peptídica de 37 aminoácidos que juega un papel fundamental en la regulación de la homeostasis de la glucosa. Se secreta por la célula β del páncreas junto con la insulina en una proporción 1:100 y participa en la regulación de la saciedad, el vaciamiento gástrico, la captación de glucosa por los músculos y el tejido adiposo, así como en la inhibición de la síntesis hepática de glucosa, ayudando a estabilizar los niveles de glucosa en el periodo postprandial (Zhang et al., 2016). Otra de las funciones de *IAPP* es encargarse de suprimir la secreción de glucagon estimulado por nutrientes, lo que lo convierte en regulador de la saciedad y el vaciamiento gástrico (Lutz, 2010).

En situaciones de prediabetes/diabetes se observa inicialmente un aumento en la secreción de insulina, y se acompaña de incremento en los niveles de *IAPP*. Se cree que este aumento de *IAPP* no procesado en la célula β lo vuelve suceptible a la malplegación (Raimundo et al., 2020). Cuando *IAPP* empieza a agregarse, forma intermediarios citotóxicos que resultan en depósito de amiloide (Lutz, 2012).

Se reconoce que hay relación entre el depósito de amiloide (h*IAPP*) e hiperglucemia en DT2 (Butler et al., 2003), pero otros estudios, incluidos los de nuestro grupo, sugieren que también puede contibuir a la pérdida de células β en DT1 (G. T. Westermark et al., 2008). El h*IAPP* es uno de los péptidos más suceptibles a agregación en el cuerpo humano, y si se presentan pequeñas variaciones en sus niveles pueden llevar a la formación de oligómeros que son dañinos para la célula β productora de insulina.

Los oligómeros citotóxicos del h*IAPP*, o *RIAO*, están presentes en los islotes de casi *todos los pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 2 (A. Mukherjee et al., 2015)(Birol et* al., 2018).

Se ha encontrado una variante en el gen humano que codifica *IAPP* (sustitución de aminoácidos S20G) y que se asocia con una mayor propención a agregación y a riesgo de DT2 (Sakagashira et al., 2000).

EL *IAPP* Y SU IMPLICACIÓN EN LA DT1

Se sabe que el h*IAPP* es el principal componente del amiloide en el islote en los pacientes con DT2, aunque cada vez se reconoce más su papel como factor que contribuye a la disfunción de la célula β no solo en la DT2, sino también en la DT1. Sin embargo, la información sobre su implicación en la patogénesis de la DT1 sigue siendo limitada.

En un estudio previo de este grupo de trabajo, se ha encontrado que los agregados anómalos de h*IAPP* existen en el suero en formas grandes, medianas y pequeñas. Se encontro que los niños con DT1 tenían una mayor cantidad de estos agregados en comparación con los niños sanos (M. M. Altamirano-Bustamante et al., 2019ª).

Se ha sugerido que el *IAPP* es un autoantígeno del islote reconocido por las células T, lo que desencadena una potente respuesta pro-inflamatoria para desencadenar

autoinmunidad. Ya han sido reconocidos en humanos células T autoreactivas a epítopos derivados de *IAPP* (Denroche & Verchere, 2018). En el contexto del transplante de islotes en pacientes con DT1, se ha visto que rápidamente en estos se forman agregados de *RIAO*, postulando así que también en la DT1 la amiloidosis contribuye a la falla en la célula β (Denroche & Verchere, 2018).

Dado que en la DT1 ya establecida (etapas 3 y 4) hay tanto deficiencia de insulina como de *IAPP*, diversos estudios clínicos han evaluado la utilidad del reemplazo de *IAPP* con un análogo de insulina como parte del tratamiento. Este análogo de *IAPP*, el Pramlintid, tiene la propiedad de limitar la hiperglucemia postprandial, retrasando el vaciamiento gástrico y suprimiendo la hiperglucagonemia.

Aunque existe una mutación causante de enfermedad en el gen que se codifica para h*IAPP*, la mayoría de los individuos no la tiene. Esto sugiere que la patología asociada a h*IAPP* está relacionada más con el desdoblamiento anómalo y la agregación del péptido, en lugar de con una mutación genética (Johnson et al., 1991).

Además, los oligómeros de h*IAPP* inducen daño celular, formando poros en la membrana celular (Birol et al., 2018). Estos no solo afectan la integridad celular, sino que también son capaces de inducir la producción de citocinas de macrófagos y células dendríticas mediante la activación del inflamasoma NLRP3 (Birol et al., 2018).

El *IAPP* ES INFLAMATORIO.

La agregación del *IAPP*, al inducir una respuesta citotóxica, genera inflamación. Las fibrillas formadas por el h*IAPP* agregado desencadenan la liberación de citocinas inflamatorias, especialmente IL-1B (Javed et al., 2019).

Además, en estudios *in vitro* se ha demostrado que la presencia de fibrillas de h*IAPP* agregado activan el receptor tipo toll-2 (TLR-2), lo que a su vez produce la activación del factor nuclear Kappa (NF-κB) e induce la producción de más citocinas infalamatorias (Westwell-Roper et al., 2016).

Se ha asociado la presencia de depósitos de amiloide en la célula β con niveles incrementados de citocinas (IL-1B, TNF-A, IL-6) (Sheedy et al., 2013). También se ha identificado a IL-1B como mediador de la muerte de la célula β ante la presencia de amiloide (Sheedy et al., 2013).

EXPOSICIÓN DE LA CÉLULA β A CITOCINAS INFLAMATORIAS

La exposición crónica a citocinas inflamatorias, como IL-1B, TNF-A e IFN-y, ocasiona disfunción y apoptosis de la célula β. La exposición a otras citocinas, como adiponecitna y visfatina, ejercen acciones protectoras de la función de las células β. Las citocinas pueden clasificarse por sus efectos sobre la célula β como proinflamatorias (IL-1, IL-6, TNF-α) o antinflamatorias (IL-10, TGF-β) (Rosenzwajg et al., 2015).

La interleucina 2 se considera promotora de la proliferación de la célula β en modelos animales, y a bajas dosis favorece la proliferación de células T reguladoras. Se le considera un potencial tratamiento para modificar el inicio o la progresión de esta enfermedad (Grinberg-Bleyer et al., 2010).

Las células dendríticas derivadas de la médula ósea y los marcófagos liberan IL-1B inducida por exposición a h*IAPP*, un proceso dependiente de la fagocitosis de agregados de h*IAPP*, de la activación del inflamosoma NLRP3 y de la caspasa 1 (Sheedy et al., 2013).

La inhibición farmacológica de NLRP3 con gliburide inhibe la secreción de IL-1B secundaria a h*IAPP* (Westwell-Roper et al., 2011). Sin embargo, no está aún bien dilucidado el mecanismo por el cual h*IAPP* activa al inflamosoma NLRP3.

Los agregados de h*IAPP* más pequeños, considerados prefibrilares, miden menos de 100nm e inducen la mayor secreción de IL-1B después de la incubación en el extracelular durante una noche (Masters et al., 2010).

La exposición de la célula β a la IL-1B activa la expresión de la Oxido Nítrico Sintetasa Inducible (iNOS), lo que lleva a un aumento en la producción de óxido nítrico e interfiere con la cadena de transporte de electrones al no permitir la producción mitocondrial de ATP, además de que activa la expresión de genes pro-inflamatorios.

Ante esto, se propone que ciertas citocinas pudieran llegar a ser blancos terapéuticos para mediar el daño al islote. El bloqueo del factor de necrosis tumoral-alfa resulta en la preservación de la función de la célula β en niños con DT1 recién instaurada (Mastrandrea et al., 2009), y que el tratamiento con IL-2 puede incrementar la proporción de células T reguladoras en pacientes con DT1 (Rosenzwajg et al., 2015).

En 2020, Quattrin et al. Publicaron en The New England Journal of Medicine un ensayo clínico fase 2 con 84 participantes en el que se utiliza un anticuerpo monoclonal contra factor de necrosis tumoral alfa llamado Golimumab. Se encontró que este mejoró la prodcucción endógena de insulina y disminuyó los requerimientos de insulina exógena.

El interferon gamma (IFN-γ) es una citocina crucial en varias respuestas inmunitarias y ha sido considerado por mucho tiempo un contribuyente al desarrollo de Diabetes autoinmune (Arif et al., 2004). Se ha visto que la expresión de IFN-γ se correlaciona en humanos con la progresión de la enfermedad (Arif et

al., 2004). Así mismo, hay evidencia de que el IFN-γ participa en una respuesta autoreguladora que puede inhibir el desarrollo de DT1.

El uso de algunos agentes inmunoestimuladores como el Bacilo de Calmette-Guérin inhiben el desarrollo de DT1 con una respuesta en la que participa IFN-γ (Qin, 2004). Dado que el IFN-γ puede ejercer tanto un papel supresor de DT1 como favorecedor de su desarrollo, se ha hipotetizado que su bloqueo puede promover respuestas patogénicas a través de las células T CD8+.

POSIBLES ESTRATEGIAS PARA EVITAR LA FORMACIÓN DE AGREGADOS DE AMILOIDE.

Siendo reconocida la citotoxicidad ocasionada por esta amiloidosis, es necesario diseñar estrategias para prevenir su formación o su daño celular asociado.

La mayoría de las terapias de diabetes no se enfocan en la prevención o reversión del daño celular causado por los oligómeros de h*IAPP*. Incluso, al usar terapias como secretagogos de insulina (co-secretada con h*IAPP*), es posible exacerbar la producción de oligómeros de h*IAPP* (Johnson et al., 1991). Recientemente, en 2019, se probaron “inhibidores químicos de molécula pequeña”, que son moléculas que evitan la formación de agregados de amiloide y su citotoxicidad (Saravanan et al., 2019).

Un anticuerpo monclonal contra los agregados de h*IAPP* ha demostrado prevenir la pérdida de células β asociada al amiloide en DT2 (Roesti et al., 2020); de funcionar, sería uno de los avances científicos más importantes para combatir la epidemia de DT2.

En 2023 se presentaron resultados de un ensayo en modelo murino en el que, mediante un anticuerpo monoclonal contra h*IAPP*, se logró disminuir la cantidad de amiloide en la célula β y mejorar el control glucémico. Esto sugiere que la

terapia farmacológica para disminuir los agregados de h*IAPP* es una estrategia adecuada para mejorar la función de la célula β en DT2 (Wirth et al., 2023).

BIOMARCADORES DE DAÑO CELULAR

Identificar biomarcadores de daño temprano a la célula β ayuda a reconocer casos de la enfermedad en etapas más tempranas, lo que ayudaría a evitar casos de cetoacidosis diabética y, posiblemente, instaurar tratamientos preventivos (Brenu et al., 2023).

Se ha encontrado desregulación en proteínas y lípidos en individuos que progresan a DT1. Niños con autoinmunidad anti-islote tienen mayores niveles de lípidos séricos que aquellos sin autoanticuerpos del islote (Pflueger et al., 2011). Además, se han identificado péptidos que predicen la futura progresión a DT1, incluyendo al factor H del complemento, el activador del factor de crecimiento de los hepatocitos y la ceruloplasmina (von Toerne et al., 2017).

La expresión de ciertos microRNA (secuencias pequeñas de RNA no codificante) también ha demostrado ser un marcador temprano de seroconversión a DT1. Se regularon a la alta 11 microRNA, y 6 fueron regulados a la baja en sujetos con autoanticuerpos del islote comparados con sujetos sanos (Santos et al., 2022).
Es frente a ello que ahora se propone la búsqueda de ciertos microRNA que predicen seroconversión o progresión a DT1.

Este grupo de investigación percibe a la DT1 como enfermedad conformacional, las cuales comparten una base fisiopatológica común relacionada con alteraciones en proteínas, ya sea en su tamaño, forma, plegamiento o conformación.

La apoptosis de la célula β comienza con un estado de desequilibrio de la proteostasis que genera el aceleramiento de la agregación-oligomerización-fibrilación del *IAPP*, produciendo *RIAO* que circulan por el torrente sanguíneo, que

pueden aislarse y cuantificarse, y que producen muerte celular por destrucción de la membrana plasmática. Esto lleva a un estado de inflamación permanente que se caracteriza por la presencia de las interleucinas y biomarcadores de la inflamación. La inflamación, a su vez, produce y desencadena una cascada de comorbilidades, como la diabetes, enfermedades cardiovasculares o neurológicas y algunos tipos de cáncer (N. F. Altamirano-Bustamante et al., 2020b; Calderón-Hernández et al., 2021a).

Este estudio busca confirmar que las formas anómalas de plegamiento de la amilina (*RIAO*) funcionan como biomarcador temprano de daño de célula β y que tienen asociación positiva con los marcadores actualmente utilizados, como son la citocinas inflamatorias sistémicas. El reto es identificar de forma temprana qué niños y adolescentes con obesidad desarrollarán DM, para así implementar estrategias terapeúticas más firmes para resolver los problemas de salud futura.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La DM es una enfermedad conformacional que presenta daño al islote pancreático por la agregación de formas parcialmente plegadas del polipéptido del islote, o polipéptido con errores en el plegamiento o parcialmente degradadas (plegamiento anómalo). Desencadenan un proceso cooperativo de auto asociación o auto ensamblaje que forma protofilamentos antes de formar fibras bien definidas y producir daño tisular, ya sea por citotoxicidad aumentada o por deficiencia de proteínas funcionales que favorecen la progresión de la disfunción, desdiferenciación y muerte de la célula β durante la progresión clínica de la DM.

En un estudio previo demostramos que los agregados oligoméricos del polipéptido amiloide del islote *RIAO* condicionan daño a este y pueden utilizarse como un marcador sensible y específico de diabetes mellitus como enfermedad conformacional. Sin embargo, *RIAO* no ha sido relacionado con la presencia de citocinas inflamatorias sistémicas, por lo que pretendemos llevar a cabo el presente

estudio en aras de identificar si las citocinas inflamatorias sistémicas se asocian positivamente con la concentración sérica de agregados oligoméricos del polipéptido amiloide del islote como marcadores tempranos de daño a las células β, y, por lo tanto con el desarrollo de complicaciones crónicas en los pacientes con obesidad o con DM. Este estudio busca generar las herramientas para idenficar de manera temprana aquellos niños y adolescente con obesidad que desarrollarán DM, y, por ende, complicaciones crónicas, y así poder optar por estrategias terapéuticas tempranas más agresivas en estos pacientes.

SE PLANTEA LA SIGUIENTE PREGUNTA:

¿Existe asociación entre los agregados oligoméricos del polipéptido amiloide del islote [*RIAO* (Real h*IAPP* Amyloid Oligomers)] y las citocinas inflamatorias sistémicas (interleucinas 2, 4, 5, 6, 10, 13, TNFα, IF gama) en niños y adolescentes con DT1 comparados con niños y adolescentes con obesidad, DT2 y grupo control atendidos en hospitales pediátricos de tercer nivel de la Ciudad de México en el periodo comprendido del 2013 al 2020?

JUSTIFICACIÓN

La cuantificación y evaluación de la disminución de la masa de células β in vivo es un problema vigente y un desafío para los investigadores biomédicos y clínicos. Una alternativa es identificar la pérdida de función de células β, ya que esta precede a la pérdida de masa. En este contexto, los biomarcadores de falla temprana de la célula β cobran su real relevancia para detectar de manera oportuna a la población en riesgo de DT1 y síndrome metabólico.

La DM es una enfermedad conformacional en la que el polipéptido pancreático, proteína que forma agregados oligoméricos, presenta una alta capacidad citotóxica que acelera la destrucción de la célula β en pacientes con obesidad, y por lo tanto, lo sitúa en más riesgo de desarrollar DM.

Nuestro grupo de investigación demostró que los agregados oligoméricos del polipéptido amiloide del islote *RIAO* pueden ser detectados por anticuerpos monoclonales (AMo) en suero de pacientes, emergiendo así como un biomarcador temprano de falla de célula β fácilmente detectable, con bajo costo, efectivo y que puede sustituir a varios estudios bioquímicos utilizados actualmente para detectar esta falla temprana.

Este estudio busca identificar la asociación entre las concentraciones de citocinas inflamatorias sistémicos (cuya elevación es marcadora de daño a la célula β) y *RIAO*. Los resultados nos permitirían identificar tempranamente a los pacientes con mayor riesgo de daño a las células β, por lo que se podrían implementar en ellos opciones terapéuticas más agresivas para mejorar o alargar la temporalidad de manifestación de las complicaciones crónicas de pacientes diagnosticados con DT1, además de generar recomendaciones terapéuticas estandarizadas con las cuales se disminuya la frecuencia de internamientos y costos de atención hospitalaria, lo que se vería reflejado en la reducción de gastos e incremento en la calidad de vida y atención sanitaria.

POBLACIÓN DE ESTUDIO

Niños y adolescentes con Diabetes Mellitus tipo 1, tipo2, obesidad infantil y grupo control con determinación de los agregados oligoméricos del polipéptido amiloide del islote [*RIAO* (Real h*IAPP* Amyloid Oligomers)] que cuenten con una alícuota congelada del suero para determinación de citocinas inflamatorias. Deben estar siendo atendidos en la Clínica de Diabetes del Servicio de Endocrinología del Instituto Nacional de Pediatría durante el periodo de 2013 al 2020.

OBJETIVO

Identificar la asociación entre el cuantificado de agregados oligoméricos del polipéptido amiloide del islote [*RIAO* (Real h*IAPP* Amyloid Oligomers)] y los

marcadores de inflamación sistémica (interleucinas 2, 4, 5, 6, 10, 13, 3, TNF-α, IFN-γ) como biomarcadores moleculares de daño a la célula β en niños y adolescentes con DT1, DT2, y obesidad, atendidos en hospitales pediátricos de tercer nivel de la Ciudad de México en el periodo comprendido del 2013 al 2020.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar la asociación entre la presencia de agregados oligoméricos del polipéptido amiloide del islote [*RIAO* (Real h*IAPP* Amyloid Oligomers)] y las citocinas inflamatorias sistémicas (interleucinas 2, 4, 5, 6, 10, 13, TNF-α, IFN-γ).

2. Determinar si la concentración de citocinas (interleucinas 2, 4, 5, 6, 10, 13, TNF-α, IFN-γ) aumenta conforme progresa el daño a células β medido por el control glucémico (concentración de glucosa, hemoglobina glucosilada).

3. Valorar si la concentración de citocinas inflamatorias (interleucinas 2, 4, 5, 6, 10, 13, TNF-α, IFN-γ) cambia con la presencia de complicaciones (obesidad central, dislipidemia, síndrome metabólico, hipertensión arterial, hígado graso, hiperuricemia, concentración de colesterol, triglicéridos, acido úrico, ALT, AST y microalbuminuria).

HIPÓTESIS

Los agregados oligoméricos del polipéptido amiloide del islote [*RIAO* (Real h*IAPP* Amyloid Oligomers)] se asocian positivamente con las citocinas inflamatorias sistémicas (interleucinas 2, 4, 5, 6, 10, 13, TNF-α, IFN-γ) como biomarcadores tempranos de falla de las células β del páncreas, en niños y adolescentes con con DT1, DT2 y obesidad infantil.

HIPÓTESIS ESPECÍFICAS:

La concentración de citocinas inflamatorias sistémicas (interleucinas 2, 4, 5, 6, 10, 13, TNF2, IF gama) es mayor en población con diabetes (DT1 y DT2) y obesidad comparado con población control.

Existe asociación positiva de los agregados oligoméricos del polipéptido amiloide del islote [*RIAO* (Real h*IAPP* Amyloid Oligomers)] con la concentración de citocinas inflamatorias sistémicas (interleucinas 2, 4, 5, 6, 10, 13, TNF-α, IFN-γ).

La concentración de citocinas inflamatorias sistémicas (interleucinas 2, 4, 5, 6, 10, 13, TNF-α, IFN-γ) es mayor (+ 30%) en niños y adolescentes con Diabetes Mellitus con mal control glucémico (HbA1c > 10%), comparado con niños y adolescentes con obesidad o DM con buen control glucémico ((HbA1c < 10%).

El tiempo de la evolución de DT1 y el desarrollo de complicaciones crónicas (obesidad central, dislipidemia, síndrome metabólico, hipertensión arterial, hígado graso, hiperuricemia, concentración de colesterol, triglicéridos, acido úrico, ALT, AST y microalbuminuria) tienen una correlación positiva con la concentración de citocinas inflamatorias sistémicas (interleucinas 2, 4, 5, 6, 10, 13, TNF-α, IFN-γ) en niños y adolescentes con DT1, comparados con niños y adolescentes con obesidad, DT2 o grupo control, atendidos en hospitales pediátricos de tercer nivel de la Ciudad de México en el periodo comprendido del 2013 al 2020.

MATERIALES Y MÉTODO

Diseño del Estudio

1. Por intervención: observacional
2. Por temporalidad: transveral
3. Por seguimiento: transversal
4. Por fuente de datos: ambilectiva
5. Tipo de análisis: Comparativo

6. Por tipo de muestra: heterodémica
7. Muestreo: no probabilístico
8. Asignación: no aplica
9. Tipo de comparación: Histórica
10. Medición: Abierta

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

1. Expedientes de niños y adolescentes de cualquier sexo.
2. Edad ≤ 18 años.
3. IMC < percentil 85 para edad y sexo.
4. Diagnóstico de DT1 (de acuerdo con los criterios de la ADA: glucosa en ayuno ≥ 126 mg/dL o por curva de tolerancia oral a la glucosa con glucemia a las 2 h post carga ≥ 200 mg/dL y/o HbA1c ≥ 6.5%, péptido C estimulado < 1, autoanticuerpos contra islote positivoss) en diferentes tiempos de evolución.
5. Contar con la medición en suero por inmunoensayo (Elisa indirecto) del valor de *RIAO*.
6. Que el expediente contara con el 80% de la información deseada al momento del diagnóstico.
7. Contar con una alícuota congelada para determinación de citocinas inflamatorias

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Sujetos que no tuvieron alícuota congelada del suero en que se determinaron los agregados oligoméricos del polipéptido amiloide del islote [*RIAO* (Real h*IAPP* Amyloid Oligomers)].

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

Expedientes de pacientes de quienes no cuenten con seguimiento en la Clínica de Diabetes del INP.

TABLA DE VARIABLES

Variable	**Definición**	**Categoría**	**Escala**	**Unidad de medición**
RIAO	Presencia de las formas de plegamiento anómalas de *IAPP*.	Cuantitativa	Continua.	µg/ml
Interleucina 1	Citocina proinflamatoria	Cuantitativa	continua	pg/mL
Interleucina 2	Citocina proinflamatoria	Cuantitativa	Continua	pg/mL
Interleucina 5	Citocina proinflamatoria	Cuantitativa	Continua	pg/mL
Interleucina 6	Citocina proinflamatoria	Cuantitativa	Continua	pg/mL
Interleucina 12	Citocina proinflamatoria	Cuantitativa	Continua	pg/mL
Interleucina 13	Citocina antiinflamatoria	Cuantitativa	Continua	pg/mL
Factor de necrosis tumoral	Citocina antiinflamatoria producida por macrófagos.	Cuantitativa	continua	pg/mL
Evolución de DT1	Tiempo desde el diagnóstico de la enfermedad	Cuantitativa	Discreta	Años cumplidos en meses
Tensión sistólica	Valor de presión arterial sistólica	Cuantitativa	Continua	mm/Hg
Percentil Tensión sistólica	Percentil presión arterial sistólica de acuerdo con sexo, edad y talla	Cuantitativa	Continua	percentil
Tensión diastólica	Valor de presión arterial diastólica	Cuantitativa	Continua	mm/Hg
Percentil Tensión diastólica	Percentil presión arterial diastólica de acuerdo con sexo, edad y talla	Cuantitativa	Continua	percentil
Tanner femenino	Estadio de Tanner mamario	Cualitativa	Ordinal	1= Estadio I 2= Estadio II 3= Estadio III 4= Estadio IV 5= Estadio V
Acantosis nigricans	Presencia de placa elevada, hiperpigmentada anfractuosa con hiperqueratosis, en piel del cuello, axila, región inguinal	Cualitativa	Dicotómica.	0= No 1= Si

Tanner masculino	Estadio de Tanner genital	Cualitativa	Ordinal	1= Estadio I 2= Estadio II 3= Estadio III 4= Estadio IV 5= Estadio V
Cintura/talla	Cociente entre diámetro de cintura y talla de pie	Cuantitativa	Continua	valor
HbA1c	Hemoglobina glucosilada	Cuantitativa	Continua	Porcentaje
Sexo	Característica de los sujetos asociada a los sexo cromosomas	Cualitativa	Nominal, Dicotómica	1= Femenino 2= Masculino
Edad	Tiempo transcurrido desde el nacimiento hasta el día de interés	Cuantitativa	Discreta	Años cumplidos con meses
IMC	Valor obtenido de dividir el peso entre el cuadrado de la talla	Cuantitativa	Continua	Kg/m2
Z IMC	Se calcula dividiendo la resta del valor antropométrico real menos la mediana entre la desviación estándar	Cuantitativa	Continua Se calcula dividiendo la resta del valor antropométrico real menos la mediana entre la desviación estándar APP Growth Chart utilizando datos OMS >=2 años	Desviación estándar
Glucemia	Valores de glucosa en sangre	Cuantitativa	Continua, Cromatografía	mg/dl
Dislipidemia	Presencia de hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia o hpoalfacolesterolemia	Cualitativa	Dicotómica, Colorimétrico de punto final	0= No 1= Si
Colesterol total	Valores de colesterol total en sangre	Cuantitativa	Continua, Enzimático, Colorimétrico de punto final	mg/dl
Colesterol HDL	Valores de colesterol HDL en sangre	Cuantitativa	Continua, Colorimétrico de punto final	mg/dl
Colesterol LDL	Valores de colesterol LDL en sangre	Cuantitativa	Continua, Colorimétrico de punto final	mg/dl
insulina	Valor de insulina en ayunas	Cuantitativa	Continua,	mUI/mL
HOMA	Valor obtenido de multiplicar glucosa por insulina en ayunas /405	Cuantitativa	Continua	Porcentaje
Péptido C	Valor de insulina en ayunas	Cuantitativa	Continua,	ng/mL
ALT	Valores de aspartato aminotransferasa en sangre	Cuantitativa,	Continua, Enzimático, Colorimétrico de punto final	IU/L
AST	Valores de alanino aminotransferasa en sangre	Cuantitativa	Continua	IU/L

			Enzimático, Colorimétrico de punto final	
Microabuminuria	Valores de albúmina en orina 24 horas	Cuantitativa	Continua, Enzimático, Colorimétrico de punto final	µ/min
Ejercicio	Cualquier movimiento corporal producido por los músculos esqueléticos que exija gasto de energía.	Cualitativa	Dicotómica Mediante interrogatorio, si realiza o no, basados en criterios de la OMS (60 min o más al por día)	No realiza: <3 veces por semana Sí realiza:>3 veces por semana
Tratamiento con insulina	Requiere para el control glucémico de administración de insulina exógena.	Cualitativa	Dicotómica Mediante interrogatorio, si se aplica insulina	No: no se aplica insulina Sí : Se aplica insulina basal y/o prandial
Dosis de insulina basal	Insulina acción lenta	cuantitativa	continua	UI/Kg/día
Dosis de insulina prandial	Insulina acción ultrarrápida	cuantitativa	continua	UI/Kg/día

DISEÑO GENERAL DEL ESTUDIO

- Se identificaron en los sueros de los sujetos con DT1 a quienes se les determinó por inmunoensayo (Elisa indirecto) los agregados oligoméricos del polipéptido amiloide del islote [*RIAO* (Real h*IAPP* Amyloid Oligomers)] que tenían una alícuota congelada para determinar por ELISA la concentración de citocinas inflamatorias sistémicas (interleucinas 2, 4, 5, 6, 10, 13, TNF-α, IFN-γ).

- De la base de datos del megaproyecto se obtuvieron el diagnóstico, edad, sexo y valor de *RIAO* (µg/ml) de los sujetos de los 4 grupos.

- Se revisaron los expedientes clínicos de los pacientes con DT1, y se recabaron los siguientes datos de aquellos que cumplieron con los criterios de selección: variables demográficas (edad, sexo, edad al diagnóstico de

la DT1, tiempo de evolución), clínicas (peso, sexo, talla, IMC, relación cintura-talla, fondo de ojo, presión arterial, tratamiento, se calculará puntuación Z de talla e IMC y percentils de TA sistólica y diastólica) y bioquímicas (concentración de glucosa, Insulina, Péptido C ayunas, hemoglobina glucosilada, colesterol total, Colesterol HDL, colesterol LDL, Colesterol no HDL, triglicéridos, ácido úrico, ALT. AST y de microalbuminuria de 24 horas), así como presencia de complicaciones crónicas (obesidad central, dislipidemia, síndrome metabólico, hipertensión arterial, hígado graso, hiperuricemia y microalbuminuria).

- Se llevó a cabo la determinación de citocinas inflamatorias sistémicas (interleucinas 2, 4, 5, 6, 10, 13, TNF-α, IFN-γ) mediante el sistema de perlas de caputra con el equipo LEGEND PLEX (BIOLEGEND) Catálogo 740730 y lectura de resultados en citometría de flujo.

MATERIAL Y MÉTODOS.

La información se registró en una hoja de captura de datos y posteriormente fue vaciada en una base de datos Excel. Se analizaron los datos registrados con el software JMP11 de SAS Institute, Inc.

TAMAÑO DE MUESTRA

Muestra a conveniencia por ser una cohorte histórica. Por lo menos 5 sujetos por cada grupo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Análisis Univariado

Variables Cuantitativas: Son las concentraciones plasmáticas de los marcadores clínicos y bioquímicos, como glucosa, triglicéridos, colesterol, tensión arterial, edad al diagnóstico, hemoglobina glucosilada, edad actual, *RIAO* y citocinas inflamatorias

(interleucinas 2, 4, 5, 6, 10, 13, TNF-α, IFN-γ), 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 será descrita por la compatibilidad en la mayoría de las variables estudiadas.

Variables Cualitativas: Consiste 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, obesidad categórico, dislipidemia categórico, hiperuricemia categórico, hígado graso categórico, microalbuminuria 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 las variables cuantitativas.

Se exploró la comparación de dos medias, buscando una relación entre la variable dependiente cuantitativa continua (*RIAO*) y las citocinas inflamatorias sistémicas.

Se analizó la asociación entre los valores de *RIAO* con la presencia de cada uno de las citocinas inflamatorias mediante el cálculo de razón de momios e intervalo de confianza al 95% de manera individual, y entre grupos por la comparación por U. Mann Whitney, Ji cuadrada.

Con análisis de regresión logística, regresión lineal simple, anova de múltiples vías y análisis por conglomerado se analizó la asociación de las variables significativas con la finalidad de calcular la probabilidad de presentar el desenlace y así crear el modelo matemático para determinar los coeficientes de regresión parcial e integrarlos en un modelo general de probabilidad.

En todas las pruebas estadísticas, la significancia estadística fue nivel de $p<0.05$. Todos los parámetros estimados se presentaron con un 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 artículo 17 de la ley general de investigación, este estudio tiene un riesgo menor que el mínimo, por lo que no requirió carta de consentimiento informado. A pesar de ello, todos los sujetos cuentan con consentimiento y asentimiento informado por escrito para el megaproyecto.

La información obtenida es estrictamente confidencial y utilizada sólo para fines del presente estudio, 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.

Este proyecto esta anclado al estudio titulado “Biomarcadores tempranos de falla de célula β en niños y adolescentes con obesidad, diabetes mellitus y prediabetes” aprobado en el INP con el número 091/2013, está vigente. También fue evaluado y aprobado por la Comisión de Ética en Investigación del IMSS

RECURSOS Y FACTIBILIDAD

Se trató de un proyecto trans-disciplinario que contó con recursos humanos, con la experiencia científica para realizarlo y así estar en condiciones de enfrentar el desafío de diagnosticar tempranamente la DT1, DT2 y sus complicaciones. Se contó con una infraestructura multi-institucional que se fortaleció con el financiamiento del CONACYT para consolidar esta red de expertos en DM en México.

Recursos materiales

- Expedientes físicos de los pacientes que cumplan con los criterios de inclusión
- Computadora
- Gráficas de curvas de crecimiento por edad y sexo CDC.

- Lápices, bolígrafos, papel bond, computadora portatil, tableta electrónica, impresora, libros y artículos relacionados con DM2.
- Laboratorio equipado para la determinación de citocinas inflamatorias

Recursos humanos

- Médico adscrito al servicio de Endocrinología Pediátrica del Instituto Nacional de Pediatría, quien diseñó y planeó el proyecto, además de que participará en el análisis, discusión y redacción del manuscrito.
- Doctor en ciencias, quien diseñó, planeó y realizó la determinación de *RIAO*; participará en el análisis, discusión y redacción del manuscrito.
- Doctor en ciencias, quien determinará las citocinas inflamatorias; participará en el análisis, discusión y redacción del manuscrito.
- Doctor en ciencias, quien determinará el metaboloma y participará en el análisis, discusión y redacción del manuscrito.
- Médico residente del Servicio de Endocrinología Pediátrica, quien participa en la revisión d ellos expedientes, realizará la base de datos de los pacientes que cumplan los criterios de inclusión, participará en el análisis, discusión de resultados y redacción del manuscrito.
- Metodólogo y bioestadísta, quien llevará a cabo la planeación y el análisis estadístico de los resultados del proyecto de investigación.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDADES	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC	ENE	FEB
Búsqueda bibliográfica	15-31								
Marco Teórico		02-30							
Justificación, Objetivos			01-15						

Material y métodos.				02-15					
Plan de análisis					02-27				
Recolección de información						01-15			
Procesamiento de información							02-30		
Análisis de la información								02-15	
Redacción de tesis								15-30	
Presentación de tesis									02-15

RESULTADOS

ANEXO 1. HOJA DE CAPTURA

ANEXO 2 CONSENTIMIENTO INFORMADO

ANEXO 3. TABLA 1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y BIOQUÍMICAS DE LOS PACIENTES.

ANEXO 4. TABLA 2. ASOCIACIÓN DE *RIAO* CON INTERLEUCINAS.

ANEXO 5. FIGURA 1. CONGLOMERADO DE PACIENTES EN FUNCION DE CONCENTRACIÓN DE CITOCINAS.

ANEXO 6. FIGURA 2. AGRUPACIÓN DE PACIENTE EN CONGLOMERADOS EN FUNCIÓN DE SU CONCENTRACIÓN DE INTERLEUCINAS Y SU RIESGO CARDIOMETABÓLICO.

CARACTERÍSTICAS POBLACIONALES.

Presentamos los resultados de 57 muestras de 27 pacientes con DT1, 10 con DT2, 15 con obesidad y 5 controles. No encontramos diferencias con edad, Z de talla ni delta de Z talla – Z de IMC. Los pacientes con DT1 tenían mal control metabólico medido por hiperglucemia y hemoglobina glucosilada, en tanto que en los pacientes con DT2 tenían en promedio buen control. Las características clínicas y bioquímicas se muestran en la Tabla 1 (Ver Anexo 3).

ASOCIACIÓN *RIAO* CON INTERLEUCINAS.

En pacientes con DT1 sólo encontramos asociación negativa marginal de *RIAO* con IL 6 e IL 4. Se efectuó la transformación de Box-Cox para que la variable dependiente, *RIAO*, se aproxime a la forma de distribución normal, con el fin de que satisfaga el supuesto del modelo lineal sin alcanzar significancia estadística (Ver Anexo 4).

En el Anexo 4 (Tabla 2) podemos observar que en DT1, la asociación de IL4 e IL6 con *RIAO* tuvieron una tendencia limítrofe negativa (con R^2 bajo), tanto en la regresión lineal como en el análisis de transformación; mientras que en obesidad, la IL4, si bien el R^2 es bajo, las p (0.002 y 0.005) son estadísticamente significativas en ambos análisis, lo que puede describirse como una asociación positiva. Lo anterior implica que la IL4 tiene un valor predictivo en la obesidad y puede estar relacionada con el papel regulador de la IL4 en el tejido adiposo, así como en la respuesta inflamatoria asociada al estado metabólico.

En pacientes con DT2 encontramos asociación negativa estadísticamente significativa de *RIAO* con IF-y, TNF α e IL 2. Con IL4 e IL6, sólo asociación negativa marginal que no alcanza significancia con la transformación de Box-Cox (Anexo 4, Tabla 2).

En los controles en la IL-6 hay un R^2 alto, lo que implica una asociación positiva, con una p (0.0032 y 0.0016) estadísticamente significativa en ambos enfoques, por lo que podría ser una variable predictiva de protección en las enfermedades conformacionales (Anexo 4, Tabla 2).

Mediante análisis de conglomerados se identificaron tres grupos para estratificar a los pacientes en relación con el riesgo cardio-metabólico. El grupo 1 se caracteriza por una concentración de interleucinas bajas, el grupo 2 con concentración de interleucinas altas y el grupo 3 con IL-4, IL-6, IL-13 e IFN-γ altas pero IL-2 y TNF-α bajos (Ver Anexo 5).

En la Figura 2 (Ver Anexo 6) se estratifica a los pacientes en función de su concentración de interleucinas y el riesgo cardiometabólico.

El grupo 1, con valores de interleucinas bajos, encontramos pacientes del sexo femenino que no realizan ejercicio y cuyos valores de HbA1c, Triglicéridos, colesterol total, HDL, LDL son elevados, lo que implica un riesgo cardiometabólico mayor. Se acompaña con menor riesgo de complicaciones crónicas como la nefropatía (microalbuminuria negativa), la esteatosis hepática (ALT menor de 22 UI/L) y menor hiperuricemia. En cuanto al tratamiento, usan Metformina y se aplican mayores dosis de insulina por día.

El grupo 2, los pacientes con concentraciones de interleucinas altos son del sexo masculino, que no realizan ejercicio, con talla alta, aumento de índice corporal, percentil de TA sistólica y diastólica alta, y sólo dos con hipertensión arterial. Con valores bajos de glucosa HbA1c, triglicéridos, colesterol total, HDL, LDL, lo que implica un riesgo cardiometabólico menor. Tienen mayor riesgo de complicaciones crónicas como esteatosis hepática (ALT elevada) y nefropatía (microalbuminuria positiva), además de que se aplican menor dosis de insulina por día.

El grupo 3, con concentraciones de interleucinas variables, hay pacientes de ambos sexos que realizan ejercicio, con mayor edad, mayor tiempo de evolución, menor Z talla, con baja percentil TA y con perfil de lípidos baja, lo que implica un riesgo cardiometabólico moderado. Se tiene menor riesgo de complicaciones crónicas, como la nefropatía (microalbuminuria negativa), la esteatosis hepática (ALT menor de 22 UI/L) y menor hiperuricemia.

DISCUSIÓN

Esta investigación demuestra por primera vez la asociación entre *RIAO* y las interleucinas, lo que se puede traducir a nivel molecular entre la proteostasis y la respuesta inflamatoria en la obesidad y diabetes como enfermedades conformacionales (Sontag et al., 2017a).

La proteostasis, también llamada homeostasis proteíca, es un proceso que involucra la síntesis, el plegamiento, la distribución y degradación de las proteínas (Dikic, 2017a)(Chiti & Dobson, 2006). Este proceso es muy costoso para la célula y requiere de mucha energía, además de que su equilibrio es vital para la función celular y la salud (Riek & Eisenberg, 2016).

El proceso de agregación-oligomerización del h*IAPP* (Divakara et al., 2019; P. Westermark et al., 2011) que lleva a la formación de *RIAO*, biomarcador temprano de falla de la célula β, es un factor clave de la proteostasis en la obesidad y la DM como enfermedades conformacionales (M. M. Altamirano-Bustamante et al., 2019b; N. F. Altamirano-Bustamante et al., 2020a).

RIAO circula en todo el torrente sanguíneo y produce apoptosis celular cuando los sistemas de control de la proteostasis, como las chaperonas, la degradación de las proteínas mal plegadas reguladas por el sistema ubiquitina-proteasoma y la autofagia, fallan (M. M. Altamirano-Bustamante et al., 2019b; Dikic, 2017b; Sontag et al., 2017b). Lo anterior condiciona un estado de agregación permanente que tiene consecuencias graves, como son las enfermedades conformacionales. El

desequilibrio de la homeostasis proteíca desencadena procesos inflamatorios y de estrés celular. En este contexto, las citoquinas toman un papel relevante (Calderón-Hernández et al., 2021b; Ryba-Stanisławowska et al., 2014).

El proceso de inflamación activo mediado por interleucinas aumenta la degradación de proteínas mal plegadas (en este estudio sería *RIAO*). En esta investigación demostramos que en DT1 hay una asociación negativa límitrofe entre *RIAO* con las IL-4 y 6, mientras que en DT2 hay una asociación negativa estadísticamente significativa entre *RIAO* y IFγ, TNFα, IL-2. IL-4 IL-6. En obesidad, la IL 4 tiene un rol en la regulación del tejido adiposo y en la respuesta inflamatoria. Llama la atención que en los controles, la IL6 protege a la célula β (Marek-Trzonkowska, Myśliwiec, Iwaszkiewicz-Grześ, Gliwiński, Derkowska, Żalińska, et al., 2016; Marek-Trzonkowska, Myśliwiec, Iwaszkiewicz-Grześ, Gliwiński, Derkowska, Zalińska, et al., 2016). Estos hallazgos son de gran relevancia ya que se ha descrito que la IL-6 tiene un rol esencial en la proteostasis al afectar el equilibrio del plegamiento de proteínas a través de la vía de respuesta al estrés del Retículo Endoplásmico, el cual consiste en aumentar la síntesis de chaperonas y disminuir las proteínas mal plegadas (Gerst et al., 2017).

En este estudio se logra estratificar a los pacientes de acuerdo con los niveles de interleucina y el riesgo cardio-metabólico (RCM), uicándolos en un Grupo de concentración de IL bajas y alto RCM, Grupo de niveles de interleucina altas y bajo RCM, y un grupo mixto en el que algunas IL están elevadas y otras bajas con moderado RCM. Si bien *RIAO* no muestra diferencias significativa, demostramos que los niveles de *RIAO* son más elevados en el grupo de concentración baja de interleucinas comparado con el grupo mixto (4.3 [1.9-6.1] vs 3.2 [1.9-4.4], $p = 0.26$). Lo anterior implica que el bajo nivel de IL produce un alto riesgo de comorbilidades, como lo demuestra este estudio.

En la siguiente figura se sintetizan todos los hallazgos y se incorporan a una actualización de lo que es la DT1 como enfermedad conformacional.

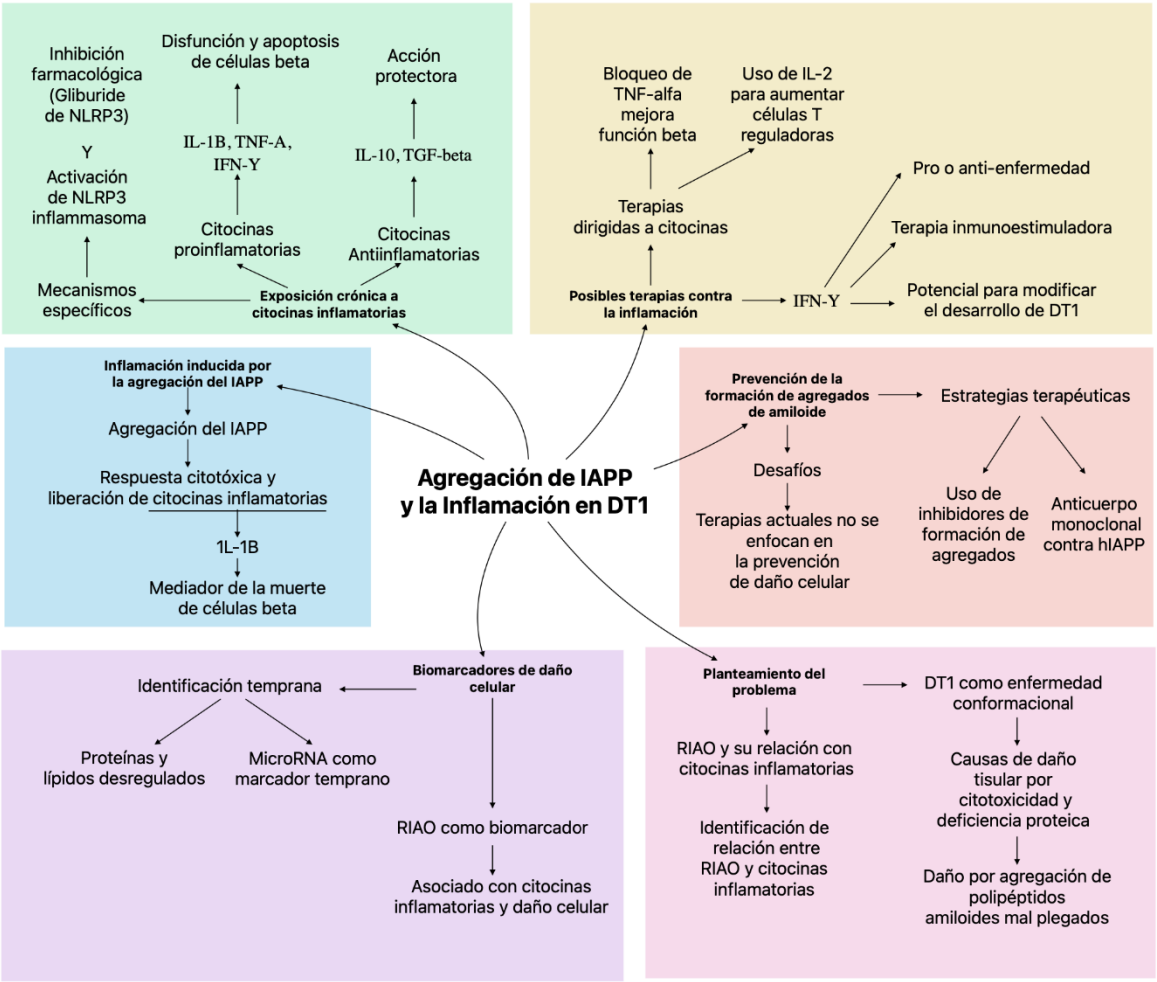

Figura 3. Interacción entre la agregación de *IAPP*, inflamación y disfunción de células β en la Diabetes tipo 1. La figura ilustra la compleja relación entre la agregación del *IAPP* con la inflamación. La formación de agregados de *IAPP* desencadena una respuesta inflamatoria, llevando a la activación del inflamasoma NLRP3. Esta activación libera citocinas proinflamatorias como IL-1B y TNF-α, que a su vez amplifican la respuesta inflamatoria y dañan directamente las células β productoras de insulina. La figura también explora posibles biomarcadores y estrategias terapéuticas dirigidas a modular la inflamación y proteger las células β.

CONCLUSIONES

Las Interleucinas juegan un papel preponderante en la proteostasis vía la regulación del estrés celular, la producción de chaperonas y la degradación de proteínas.

Los valores elevados de Interleucinas protegen a la célula β al disminuir las concentraciones de proteínas mal plegadas (en este caso *RIAO*).

Este estudio promueve la búsqueda de mecanismos más eficaces para identidicar daño a la célula β, así como un cambio de paradigma al voltear a ver a la Diabetes Mellitus en general como una enfermedad por malplegamiento protéico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altamirano-Bustamante, M. M., Altamirano-Bustamante, N. F., Larralde-Laborde, M., Lara-Martínez, R., Leyva-García, E., Garrido-Magaña, E., Rojas, G., Jiménez-García, L. F., Revilla-Monsalve, C., Altamirano, P., & Calzada-León, R. (2019a). Unpacking the aggregation-oligomerization-fibrillization process of naturally-occurring h*IAPP* amyloid oligomers isolated directly from sera of children with obesity or diabetes mellitus. *Scientific Reports*, *9*(1), 18465. https://doi.org/10.1038/s41598-019-54570-8

Altamirano-Bustamante, M. M., Altamirano-Bustamante, N. F., Larralde-Laborde, M., Lara-Martínez, R., Leyva-García, E., Garrido-Magaña, E., Rojas, G., Jiménez-García, L. F., Revilla-Monsalve, C., Altamirano, P., & Calzada-León, R. (2019b). Unpacking the aggregation-oligomerization-fibrillization process of naturally-occurring h*IAPP* amyloid oligomers isolated directly from sera of children with obesity or diabetes mellitus. *Scientific Reports*, *9*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-019-54570-8

Altamirano-Bustamante, N. F., Garrido-Magaña, E., Morán, E., Calderón, A., Pasten-Hidalgo, K., Castillo-Rodríguez, R. A., Rojas, G., Lara-Martínez, R., Leyva-García, E., Larralde-Laborde, M., Domíguez, G., Murata, C., Margarita-Vazquez, Y., Payro, R., Barbosa, M., Valderrama, A., Montesinos, H., Domínguez-Camacho, A., García-Olmos, V. H., … Altamirano-Bustamante, M. M. (2020a). Protein-conformational diseases in childhood: Naturally-occurring h*IAPP* amyloid-oligomers and early $β$-cell damage in obesity and diabetes. In *PLoS ONE* (Vol. 15, Issue 8 August). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237667

Altamirano-Bustamante, N. F., Garrido-Magaña, E., Morán, E., Calderón, A., Pasten-Hidalgo, K., Castillo-Rodríguez, R. A., Rojas, G., Lara-Martínez, R., Leyva-García, E., Larralde-Laborde, M., Domíguez, G., Murata, C., Margarita-Vazquez, Y., Payro, R., Barbosa, M., Valderrama, A., Montesinos, H., Domínguez-Camacho, A., García-Olmos, V. H., … Altamirano-Bustamante, M. M. (2020b). Protein-conformational diseases in childhood: Naturally-occurring h*IAPP* amyloid-oligomers and early β-cell damage in obesity and diabetes. *PLOS ONE*, *15*(8), e0237667. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237667

Arif, S., Tree, T. I., Astill, T. P., Tremble, J. M., Bishop, A. J., Dayan, C. M., Roep, B. O., & Peakman, M. (2004). Autoreactive T cell responses show proinflammatory polarization in diabetes but a regulatory phenotype in health. *Journal of Clinical Investigation*, *113*(3), 451–463. https://doi.org/10.1172/JCI19585

Besser, R. E. J., Bell, K. J., Couper, J. J., Ziegler, A., Wherrett, D. K., Knip, M., Speake, C., Casteels, K., Driscoll, K. A., Jacobsen, L., Craig, M. E., & Haller, M. J. (2022). <scp>ISPAD</scp> Clinical Practice Consensus Guidelines 2022: Stages of type 1 diabetes in children and adolescents. *Pediatric Diabetes*, *23*(8), 1175–1187. https://doi.org/10.1111/pedi.13410

Birol, M., Kumar, S., Rhoades, E., & Miranker, A. D. (2018). Conformational switching within dynamic oligomers underpins toxic gain-of-function by diabetes-associated amyloid. *Nature Communications*, *9*(1), 1312. https://doi.org/10.1038/s41467-018-03651-9

Bottazzo, G., Florin-Christensen, A., & Doniach, D. (1974). ISLET-CELL ANTIBODIES IN DIABETES MELLITUS WITH AUTOIMMUNE POLYENDOCRINE DEFICIENCIES. *The Lancet*, *304*(7892), 1279–1283. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(74)90140-8

Brenu, E. W., Harris, M., & Hamilton-Williams, E. E. (2023). Circulating biomarkers during progression to type 1 diabetes: A systematic review. *Frontiers in Endocrinology*, *14*. https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1117076

Butler, A. E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R. A., & Butler, P. C. (2003). β-Cell Deficit and Increased β-Cell Apoptosis in Humans With Type 2 Diabetes. *Diabetes*, *52*(1), 102–110. https://doi.org/10.2337/diabetes.52.1.102

Calderón-Hernández, M. F., Altamirano-Bustamante, N. F., Revilla-Monsalve, C., Mosquera-Andrade, M. B., & Altamirano-Bustamante, M. M. (2021a). What can we learn from β-cell failure biomarker application in diabetes in childhood? A systematic review. *World Journal of Diabetes*, *12*(8), 1325–1362. https://doi.org/10.4239/wjd.v12.i8.1325

Calderón-Hernández, M. F., Altamirano-Bustamante, N. F., Revilla-Monsalve, C., Mosquera-Andrade, M. B., & Altamirano-Bustamante, M. M. (2021b). What can we learn from β-cell failure biomarker application in diabetes in childhood? A systematic review. *World Journal of Diabetes*, *12*(8), 1325–1362. https://doi.org/10.4239/wjd.v12.i8.1325

Chiti, F., & Dobson, C. M. (2006). Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. *Annual Review of Biochemistry*, *75*(1), 333–366. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901

Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2022. (2022). *Diabetes Care*, *45*(Supplement_1), S17–S38. https://doi.org/10.2337/dc22-S002

Denroche, H. C., & Verchere, C. B. (2018). *IAPP* and type 1 diabetes: implications for immunity, metabolism and islet transplants. *Journal of Molecular Endocrinology*, *60*(2), R57–R75. https://doi.org/10.1530/JME-17-0138

Dikic, I. (2017a). Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. *Annual Review of Biochemistry*, *86*(1), 193–224. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044908

Dikic, I. (2017b). Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. *Annual Review of Biochemistry*, *86*(1), 193–224. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044908

Divakara, M. B., Martinez, D., Ravi, A., Bhavana, V., Ramana, V., Habenstein, B., Loquet, A., & Santosh, M. S. (2019). Molecular mechanisms for the destabilization of model membranes by islet amyloid polypeptide. *Biophysical Chemistry*, *245*, 34–40. https://doi.org/10.1016/j.bpc.2018.12.002

Gerst, F., Wagner, R., Kaiser, G., Panse, M., Heni, M., Machann, J., Bongers, M. N., Sartorius, T., Sipos, B., Fend, F., Thiel, C., Nadalin, S., Königsrainer, A., Stefan, N., Fritsche, A., Häring, H. U., Ullrich, S., & Siegel-Axel, D. (2017). Metabolic crosstalk between fatty pancreas and fatty liver: effects on local inflammation and insulin

secretion. *Diabetologia*, *60*(11), 2240–2251. https://doi.org/10.1007/s00125-017-4385-1

Gregory, G. A., Robinson, T. I. G., Linklater, S. E., Wang, F., Colagiuri, S., de Beaufort, C., Donaghue, K. C., Magliano, D. J., Maniam, J., Orchard, T. J., Rai, P., Ogle, G. D., Harding, J. L., Wander, P. L., Zhang, X., Li, X., Karuranga, S., Chen, H., Sun, H., … Ma, R. C. (2022). Global incidence, prevalence, and mortality of type 1 diabetes in 2021 with projection to 2040: a modelling study. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, *10*(10), 741–760. https://doi.org/10.1016/S2213-8587(22)00218-2

Grinberg-Bleyer, Y., Baeyens, A., You, S., Elhage, R., Fourcade, G., Gregoire, S., Cagnard, N., Carpentier, W., Tang, Q., Bluestone, J., Chatenoud, L., Klatzmann, D., Salomon, B. L., & Piaggio, E. (2010). IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine*, *207*(9), 1871–1878. https://doi.org/10.1084/jem.20100209

Javed, I., He, J., Kakinen, A., Faridi, A., Yang, W., Davis, T. P., Ke, P. C., & Chen, P. (2019). Probing the Aggregation and Immune Response of Human Islet Amyloid Polypeptides with Ligand-Stabilized Gold Nanoparticles. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *11*(11), 10462–10471. https://doi.org/10.1021/acsami.8b19506

Johnson, K. H., O'Brien, T. D., & Westermark, P. (1991). Newly Identified Pancreatic Protein Islet Amyloid Polypeptide: What Is Its Relationship to Diabetes? *Diabetes*, *40*(3), 310–314. https://doi.org/10.2337/diab.40.3.310

Kopito, R. R., & Ron, D. (2000). Conformational disease. *Nature Cell Biology*, *2*(11), E207–E209. https://doi.org/10.1038/35041139

Krischer, J. P., Liu, X., Vehik, K., Akolkar, B., Hagopian, W. A., Rewers, M. J., She, J.-X., Toppari, J., Ziegler, A.-G., Lernmark, Å., Rewers, M., Bautista, K., Baxter, J., Felipe-Morales, D., Driscoll, K., Frohnert, B. I., Gallant, M., Gesualdo, P., Hoffman, M., … Triplett, E. (2019). Predicting Islet Cell Autoimmunity and Type 1 Diabetes: An 8-Year TEDDY Study Progress Report. *Diabetes Care*, *42*(6), 1051–1060. https://doi.org/10.2337/dc18-2282

Lutz, T. A. (2010). The role of amylin in the control of energy homeostasis. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *298*(6), R1475–R1484. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00703.2009

Lutz, T. A. (2012). Control of energy homeostasis by amylin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *69*(12), 1947–1965. https://doi.org/10.1007/s00018-011-0905-1

Marek-Trzonkowska, N., Myśliwiec, M., Iwaszkiewicz-Grześ, D., Gliwiński, M., Derkowska, I., Żalińska, M., Zieliński, M., Grabowska, M., Zielińska, H., Piekarska, K., Jaźwińska-Curyłło, A., Owczuk, R., Szadkowska, A., Wyka, K., Witkowski, P., Młynarski, W., Jarosz-Chobot, P., Bossowski, A., Siebert, J., & Trzonkowski, P. (2016). Factors affecting long-term efficacy of T regulatory cell-based therapy in type 1 diabetes. *Journal of Translational Medicine*, *14*(1), 332. https://doi.org/10.1186/s12967-016-1090-7

Marek-Trzonkowska, N., Myśliwiec, M., Iwaszkiewicz-Grześ, D., Gliwiński, M., Derkowska, I., Zalińska, M., Zieliński, M., Grabowska, M., Zielińska, H., Piekarska, K., Jaźwińska-Curyłło, A., Owczuk, R., Szadkowska, A., Wyka, K., Witkowski, P., Młynarski, W., Jarosz-Chobot, P., Bossowski, A., Siebert, J., & Trzonkowski, P. (2016). Factors affecting long-term efficacy of T regulatory cell-based therapy in type 1 diabetes. *Journal of Translational Medicine*, *14*(1), 1–11. https://doi.org/10.1186/s12967-016-1090-7

Masters, S. L., Dunne, A., Subramanian, S. L., Hull, R. L., Tannahill, G. M., Sharp, F. A., Becker, C., Franchi, L., Yoshihara, E., Chen, Z., Mullooly, N., Mielke, L. A., Harris, J., Coll, R. C., Mills, K. H. G., Mok, K. H., Newsholme, P., Nuñez, G., Yodoi, J., … O'Neill, L. A. J. (2010). Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1β in type 2 diabetes. *Nature Immunology*, *11*(10), 897–904. https://doi.org/10.1038/ni.1935

Mastrandrea, L., Yu, J., Behrens, T., Buchlis, J., Albini, C., Fourtner, S., & Quattrin, T. (2009). Etanercept Treatment in Children With New-Onset Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*, *32*(7), 1244–1249. https://doi.org/10.2337/dc09-0054

Mukherjee, A., Morales-Scheihing, D., Butler, P. C., & Soto, C. (2015). Type 2 diabetes as a protein misfolding disease. *Trends in Molecular Medicine*, *21*(7), 439–449. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2015.04.005

Mukherjee, N., Lin, L., Contreras, C. J., & Templin, A. T. (2021). β-Cell Death in Diabetes: Past Discoveries, Present Understanding, and Potential Future Advances. *Metabolites*, *11*(11), 796. https://doi.org/10.3390/metabo11110796

Ogle, G. D., Gregory, G. A., Wang, F., Robinson, T. I., Maniam, J., Magliano, D. J., & Orchard, T. J. (2023). The T1D Index: Implications of Initial Results, Data Limitations, and Future Development. *Current Diabetes Reports*, *23*(10), 277–291. https://doi.org/10.1007/s11892-023-01520-4

Opie, E. L. (1901). THE RELATION OE DIABETES MELLITUS TO LESIONS OF THE PANCREAS. HYALINE DEGENERATION OF THE ISLANDS OE LANGERHANS. *Journal of Experimental Medicine*, *5*(5), 527–540. https://doi.org/10.1084/jem.5.5.527

Petersmann, A., Müller-Wieland, D., Müller, U. A., Landgraf, R., Nauck, M., Freckmann, G., Heinemann, L., & Schleicher, E. (2019). Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, *127*(S 01), S1–S7. https://doi.org/10.1055/a-1018-9078

Pflueger, M., Seppänen-Laakso, T., Suortti, T., Hyötyläinen, T., Achenbach, P., Bonifacio, E., Orešič, M., & Ziegler, A.-G. (2011). Age- and Islet Autoimmunity–Associated Differences in Amino Acid and Lipid Metabolites in Children at Risk for Type 1 Diabetes. *Diabetes*, *60*(11), 2740–2747. https://doi.org/10.2337/db10-1652

Pociot, F., & Lernmark, Å. (2016). Genetic risk factors for type 1 diabetes. *The Lancet*, *387*(10035), 2331–2339. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30582-7

Poitout, V., & Robertson, R. P. (2008). Glucolipotoxicity: Fuel Excess and β-Cell Dysfunction. *Endocrine Reviews*, *29*(3), 351–366. https://doi.org/10.1210/er.2007-0023

Qin, H.-Y. (2004). In vivo apoptosis of diabetogenic T cells in NOD mice by IFN- /TNF- . *International Immunology*, *16*(12), 1723–1732. https://doi.org/10.1093/intimm/dxh173

Raimundo, A. F., Ferreira, S., Martins, I. C., & Menezes, R. (2020). Islet Amyloid Polypeptide: A Partner in Crime With Aβ in the Pathology of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *13*. https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00035

Riek, R., & Eisenberg, D. S. (2016). The activities of amyloids from a structural perspective. *Nature*, *539*(7628), 227–235. https://doi.org/10.1038/nature20416

Roesti, E. S., Boyle, C. N., Zeman, D. T., Sande-Melon, M., Storni, F., Cabral-Miranda, G., Knuth, A., Lutz, T. A., Vogel, M., & Bachmann, M. F. (2020). Vaccination Against Amyloidogenic Aggregates in Pancreatic Islets Prevents Development of Type 2 Diabetes Mellitus. *Vaccines*, *8*(1), 116. https://doi.org/10.3390/vaccines8010116

Rosenzwajg, M., Churlaud, G., Mallone, R., Six, A., Dérian, N., Chaara, W., Lorenzon, R., Long, S. A., Buckner, J. H., Afonso, G., Pham, H.-P., Hartemann, A., Yu, A., Pugliese, A., Malek, T. R., & Klatzmann, D. (2015). Low-dose interleukin-2 fosters a dose-dependent regulatory T cell tuned milieu in T1D patients. *Journal of Autoimmunity*, *58*, 48–58. https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.01.001

Ryba-Stanisławowska, M., Rybarczyk-Kapturska, K., Myśliwiec, M., & Myśliwska, J. (2014). Elevated Levels of Serum IL-12 and IL-18 are Associated with Lower Frequencies of CD4+CD25highFOXP3+ Regulatory T cells in Young Patients with Type 1 Diabetes. *Inflammation*, *37*(5), 1513–1520. https://doi.org/10.1007/s10753-014-9878-1

Sakagashira, S., Hiddinga, H. J., Tateishi, K., Sanke, T., Hanabusa, T., Nanjo, K., & Eberhardt, N. L. (2000). S20G Mutant Amylin Exhibits Increased in Vitro Amyloidogenicity and Increased Intracellular Cytotoxicity Compared to Wild-Type Amylin. *The American Journal of Pathology*, *157*(6), 2101–2109. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64848-1

Santos, A. S., Ferreira, L. R. P., da Silva, A. C., Alves, L. I., Damasceno, J. G., Kulikowski, L., Cunha-Neto, E., & da Silva, M. E. R. (2022). Progression of Type 1 Diabetes: Circulating MicroRNA Expression Profiles Changes from Preclinical to Overt Disease. *Journal of Immunology Research*, *2022*, 1–15. https://doi.org/10.1155/2022/2734490

Saravanan, M. S., Ryazanov, S., Leonov, A., Nicolai, J., Praest, P., Giese, A., Winter, R., Khemtemourian, L., Griesinger, C., & Killian, J. A. (2019). The small molecule inhibitor anle145c thermodynamically traps human islet amyloid peptide in the form of non-cytotoxic oligomers. *Scientific Reports*, *9*(1), 19023. https://doi.org/10.1038/s41598-019-54919-z

Sheedy, F. J., Grebe, A., Rayner, K. J., Kalantari, P., Ramkhelawon, B., Carpenter, S. B., Becker, C. E., Ediriweera, H. N., Mullick, A. E., Golenbock, D. T., Stuart, L. M., Latz, E., Fitzgerald, K. A., & Moore, K. J. (2013). CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. *Nature Immunology*, *14*(8), 812–820. https://doi.org/10.1038/ni.2639

Sontag, E. M., Samant, R. S., & Frydman, J. (2017a). Mechanisms and Functions of Spatial Protein Quality Control. *Annual Review of Biochemistry*, *86*(1), 97–122. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014616

Sontag, E. M., Samant, R. S., & Frydman, J. (2017b). *Mechanisms and Functions of Spatial Protein Quality Control*. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem

von Toerne, C., Laimighofer, M., Achenbach, P., Beyerlein, A., de las Heras Gala, T., Krumsiek, J., Theis, F. J., Ziegler, A. G., & Hauck, S. M. (2017). Peptide serum markers in islet autoantibody-positive children. *Diabetologia*, *60*(2), 287–295. https://doi.org/10.1007/s00125-016-4150-x

Weir, G. C., Gaglia, J., & Bonner-Weir, S. (2020). Personal View Inadequate β-cell mass is essential for the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes-Endocrinology*. https://doi.org/10.1016/S2213-8587(20)30022

Westermark, G. T., Westermark, P., Berne, C., & Korsgren, O. (2008). Widespread Amyloid Deposition in Transplanted Human Pancreatic Islets. *New England Journal of Medicine*, *359*(9), 977–979. https://doi.org/10.1056/NEJMc0802893

Westermark, P., Andersson, A., & Westermark, G. T. (2011). Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus. *Physiol Rev.*, *91*(3), 795–826. https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2009

Westwell-Roper, C., Dai, D. L., Soukhatcheva, G., Potter, K. J., van Rooijen, N., Ehses, J. A., & Verchere, C. B. (2011). IL-1 Blockade Attenuates Islet Amyloid Polypeptide-Induced Proinflammatory Cytokine Release and Pancreatic Islet Graft Dysfunction. *The Journal of Immunology*, *187*(5), 2755–2765. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002854

Westwell-Roper, C., Denroche, H. C., Ehses, J. A., & Verchere, C. B. (2016). Differential Activation of Innate Immune Pathways by Distinct Islet Amyloid Polypeptide (*IAPP*) Aggregates. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(17), 8908–8917. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.712455

Wirth, F., Heitz, F. D., Seeger, C., Combaluzier, I., Breu, K., Denroche, H. C., Thevenet, J., Osto, M., Arosio, P., Kerr-Conte, J., Verchere, C. B., Pattou, F., Lutz, T. A., Donath, M. Y., Hock, C., Nitsch, R. M., & Grimm, J. (2023). A human antibody against pathologic *IAPP* aggregates protects β cells in type 2 diabetes models. *Nature Communications*, *14*(1), 6294. https://doi.org/10.1038/s41467-023-41986-0

Zhang, X.-X., Pan, Y.-H., Huang, Y.-M., & Zhao, H.-L. (2016). Neuroendocrine hormone amylin in diabetes. *World Journal of Diabetes*, *7*(9), 189. https://doi.org/10.4239/wjd.v7.i9.189

ANEXO 1 HOJA DE CAPTURA

“ASOCIACION DE LOS AGREGADOS OLIGOMÉRICOS DEL POLIPÉPTIDO AMILOIDE DEL ISLOTE CON MARCADORES DE INFLAMACIÓN SISTÉMICA EN NIÑOS Y ADOLESCENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 1”

NOMBRE_____ SEXO _____ REGISTRO_____ CODIGO_____FECHA NACIMIENTO _____DX:CAD___ coma hiperosmolar___ hiperglucemia____

	Al diagnóstico DT1	Al estudio de *RIAO*	Datos al seguimiento
FECHA			
Valor de *RIAO*	----		-----
EDAD			
Tiempo evolución			
SEXO			
IL 2			
IL4			
IL5			
IL 6			
IL 10			
IL13			
TNFα			
ITγ			
HOMOCISTEINA			
Talla			
ztalla			
IMC			
Z IMC			
Cintura			
Percentil cintura			
Cintura/talla			
TA Sistólica			
Percentil TAS			
TA diastólica			
Percentil TAD			
Tanner M/G			
Fondo de ojo			
Glucosa en ayunas			
Insulina ayunas			
Péptido C ayunas			
HbA1c (%)			
Triglicéridos			
Colesterol total			
Colesterol HDL			
Col no HDL			
Col LDL			
Col VLDL			
ALT			
Acido úrico			
Microalbuminuria en orina			
Cal alimentación			
Ejercicio/tipo			
Tratamiento con Insulina			
Dosis insulina U/kg/día			
Tratamiento con metformina			
Dosis metformina			

ANEXO 2 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 β 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 β del páncreas que nos pueda ayudar a conocer en forma temprana, que la célula β (la que produce insulina) se está destruyendo, es decir, antes de que el número de células β 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. Sólamente 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 β (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 β 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 β y ésto podría beneficiar a otras personas en el futuro.

¿Quién paga por el estudio?

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

¿Compensación?

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

¿Me puede pasar algo malo en este estudio?

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

¿Qué sucede si algo sale mal?

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

¿Qué sucederá con mi información?

Se te darán a conocer los resultados, independiente de si haya sido o no exitosa la investigación: encontrar sustancias que en forma temprana hablen de daño a la célula β. 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 l6:00 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 _____

ANEXO 3 TABLA 1 Características clínicas y bioquímicas de los pacientes.

	DT1	DT2	OBESIDAD	CONTROL	p
N	27	10	15	5	
Edad (años)	167 (26-211)	157.5 (36-183)	164 (56-189)	163 (151-172)	0.71
Evolución (meses)	44 (0-168)	19 (0-101)			
Z talla (d.e.)	-0.42 (-1.8 a 1.18)	-0.56 (-3.85 a 1.81)	-0.42 (-1.68 a 1.na 86)	0.57 (-0.36 a 1.16)	0.09
Z IMC (d.e.)	0.09 (-1.53 a 2.4)	0.72 (-2.24 a 2.84)	1.61 (-0.26 a 3.19)	0.7 (0.4 a 1)	0.004
Ztalla-Z IMC (d.e.)	0.91 (-1.93 a 2.47)	1.55 (-1.7 a 3.48)	1.51 (-0.09 a 3.36)	0.34 (-0.46 a 0.88)	0.074
Glucosa (mg/dL)	259 (90-530)	116 (86-300)	86 (72.2-97.8)	80.6 (77-92.8)	< 0.0001
HbA1 (%)	8.7(4.8-13.1)	6.6(5.28-12.79)	5.28(4.7-6.38)		< 0.0001
Insulina (mg/dl)	-	14.72(12.79-16.64)	21.05(9.1-67.3)	10.35(5.9-17.48)	0.075
PEP C	0.5(0.1-4.6)	3.28(0.6-13.4)	3.55(1.8-6.6)	1.9(1.5-3.1)	0.153
HOMA	-	8.05(6.7-9.4)	8.05(1.7-11.9)	2(1.1-3.3)	0.038
QUICK	-	0.28(0.27-0.29)	0.31(0.27-0.35)	0.34(0.31-0.37)	0.035
TG()	79(31-666)	97(52-198)	144(42-481)	76(59-121)	0.062
Cholesterol ()	161(121-236)	154(115-211)	158(109-209)	161(123-209)	0.560
HDL()	48(34-64)	44(29-56)	41(28-58)	56(38-60)	0.058
LDL()	97(63-166)	62(37-161)	91(47-146)	88(54-131)	0.221
RIAO (µg/mL)	3.85(1.7-6.22)	3.95(1.42-6.52)	3.05(1.39-7.05)	1.7(1.43-1.79)	0.012
IL 2 (µg/mL)	43.4(22.2-621.6)	112.1(22.2-334.8)	118.3(22.2-560.6)	32.9(22.2-70)	0.551
IL 4 (µg/mL)					
IL 5 (µg/mL)	41.4(39.1-302.2)	52.3(39.1-407.4)	64.5(39.1-182.7)	41.3(39.1-83.4)	0.590
IL 6 (µg/mL)	95.5(78.5-379.7)	78.5(78.5-551.2)	83(78.5-369.1)	93.1(78.5-93.2)	0.814
IL 13 (µg/mL)	65.6(59.4-229.7)	61.51(59.4-313)	63.58(47.2-186.5)	63.28(59.3-70.1)	0.615
Interferón γ (µg/mL)	10.2(1.22-278.2)	10.2(1.22-683)	10.2(1.22-168.6)	10.2(10.2-93.2)	0.841
FNT α (µg/mL)	34.9(17.2-219-3)	57.3(17.2-334.2)	65.5(17.2-262.9)	49.2(17.2-78.6)	0.472

Tabla 1: Características clínicas y bioquímicas de los pacientes. Los resultados se expresan en mediana (mínimos y máximas). Z: puntuación Zeta. DT1: Diabetes tipo 1, DT2: Diabetes tipo 2, FNT: Factor de necrosis tumoral. IL: Interleucina.

ANEXO 4 TABLA 2 Asociación de *RIAO* con interleucinas.

	Citocina	Regresión Lineal *RIAO*			Transformación Box-Cox		
		R^2	B	p	R^2	B	p
DT1	IL-4	0.081	-0.004	0.149	0.080	-0.004	0.147
	IL-6	0.104	-0.005	0.100	0.11	-0.005	0.09
DT2	IFN-Y	0.49	-0.005	-	0.49	-0.005	-
	TNF-α	0.46	-0.010	-	0.46	-0.010	-
	IL-2	0.45	-0.008	-	0.45	-0.008	-
	IL-4	0.28	-0.011	-	0.28	-0.011	-
	IL-6	0.37	-0.005	-	0.37	-0.005	-
Obesidad	IL-4	0.047	0.051	0.002	0.062	0.05	0.005
Controles	IL-6	0.96	0.021	0.0032	0.98	0.02	0.0016

Tabla 2: Asociación de *RIAO* con interleucinas.

ANEXO 5. FIGURA 1.

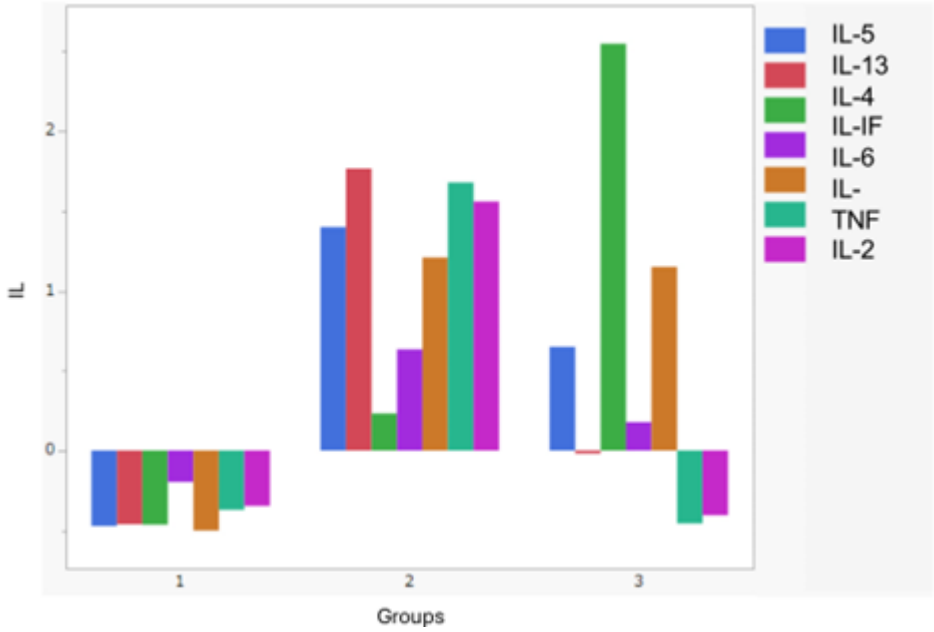

Figura 1. Conglomerado de pacientes en funcion de concentración de citocinas.

ANEXO 6. FIGURA 2.

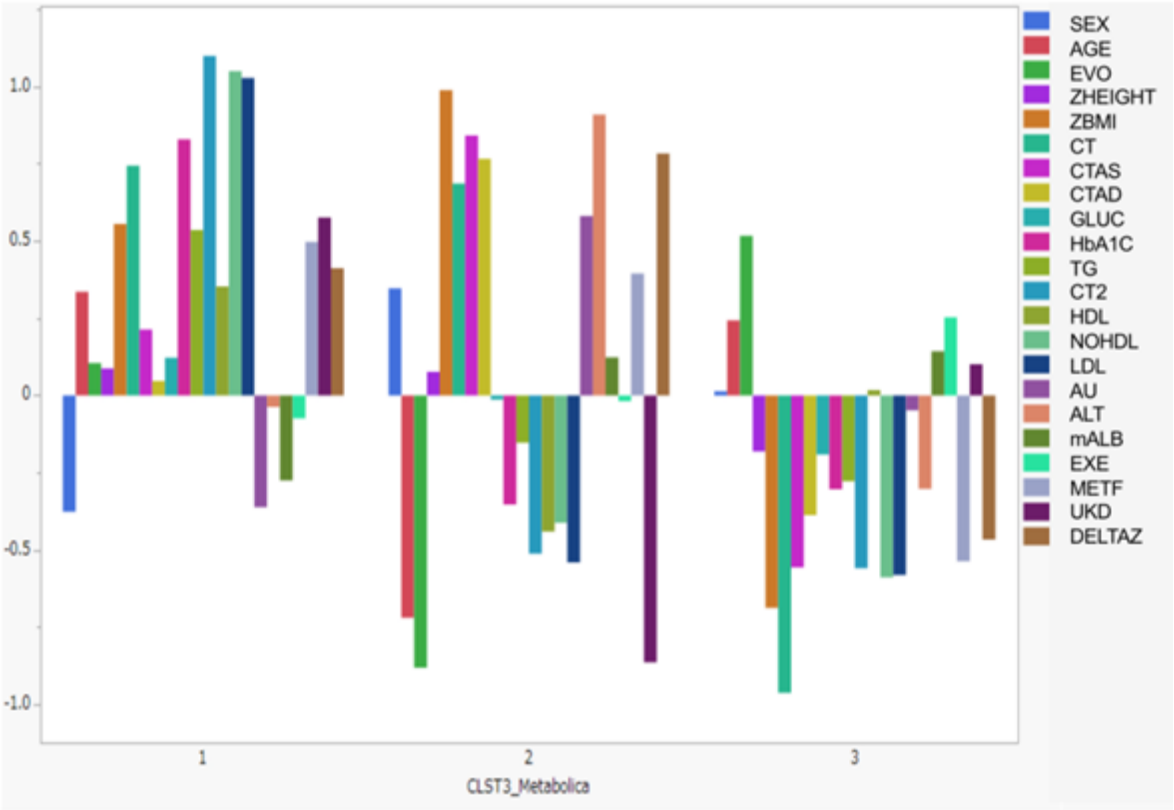

Figura 2. Agrupación de paciente en conglomerados en función de su concentración de interleucinas y su riesgo cardiometabólico.