



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Estrés Oxidativo en Pacientes con Síndrome de
Ovario Poliquístico**

**Dña. Mireya Calzada González
2019**

Estrés Oxidativo en Pacientes con Síndrome de Ovario Poliquístico

Memoria presentada por
MIREYA CALZADA GONZÁLEZ
Para optar al grado de doctor

Tesis realizada bajo la dirección de
Dra. María Natividad López Riquelme
Dr. José Antonio Noguera Velasco
Dr. Jaime Mendiola Olivares

2019

Agradecimientos

Después de todos estos años trabajando en este proyecto, quiero dar las gracias a todas las personas que de una forma u otra han participado en él y me han ayudado en este largo camino.

Destacando el importante papel de mis directores, Nati y Pepe, y de mi tutor, Jaime; su ayuda ha sido imprescindible para que este trabajo viese la luz.

Agradecer también al personal del Servicio de Ginecología del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, médicos y enfermeros, que han participado en el proyecto, con una dedicación absoluta en la evaluación de las pacientes.

A mis compañeros del Servicio de Análisis Clínicos, por los ratos compartidos con ellos, y quienes siempre que he necesitado me han echado una mano con las muestras y determinaciones.

De una manera especial agradecer a todas las pacientes que han decidido participar de manera voluntaria en este estudio.

A mi marido, quien ha vivido conmigo mis agobios, mis desganas y mis alegrías. Gracias por levantarme el ánimo cada día.

Sobre todo, dar las gracias a mis padres y a mi hermana, por apoyarme y animarme todos los días a continuar, confiar en mí y repetirme todos los días que querer es poder.

Finalmente, deseo hacer constar mi agradecimiento al Instituto Carlos III por el apoyo mostrado al financiar el proyecto de investigación “Estudio de casos y controles de base poblacional en ovario Poliquístico: análisis epidemiológico de los determinantes y consecuencias clínicas en la salud de la mujer” (nº PI13/01237).

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	15
1.1	Síndrome de ovario poliquístico	17
1.1.1	Definición y antecedentes.....	17
1.1.2	Epidemiología.....	20
1.1.3	Fisiopatología	21
1.1.4	Manifestaciones clínicas y complicaciones.....	29
1.1.5	Diagnóstico y tratamiento	34
1.2	Estrés oxidativo y síndrome de ovario poliquístico.....	40
1.2.1	Implicaciones del estrés oxidativo en el síndrome de ovario poliquístico.....	42
1.2.2	Agentes implicados en el mantenimiento del estatus oxidativo sistémico.....	47
1.2.3	Productos del estrés oxidativo: isoprostanos.....	55
2	HIPOTESIS DEL TRABAJO	63
3	OBJETIVOS.....	67
4	MATERIAL Y MÉTODOS	71
4.1	Sujetos a estudio.....	73
4.1.1	Reclutamiento de pacientes y controles	73
4.1.2	Selección de pacientes y controles.....	73
4.1.3	Estudio general de los pacientes y controles	75
4.2	Obtención y manipulación de muestras biológicas.....	77
4.3	Determinación de los perfiles analíticos básicos (bioquímico, hematológico y hormonal).....	78
4.4	Métodos analíticos en el estudio del estrés oxidativo.....	81
4.4.1	Determinación de vitaminas antioxidantes.....	81
4.4.2	Determinación de la capacidad antioxidante total.....	84
4.4.3	Determinación de isoprostanos	86

4.4.4	Determinación de metales	89
4.5	Métodos estadísticos.....	96
5	RESULTADOS	99
5.1	Población seleccionada.....	101
5.2	Resultados estudio.....	101
5.2.1	Análisis de variables en el grupo control y en el grupo de mujeres con Síndrome de Ovario Poliquístico.....	101
5.2.2	Análisis de biomarcadores de Estrés Oxidativo.....	108
5.2.3	Análisis de biomarcadores de estrés oxidativo en función del peso, resistencia a la insulina y Síndrome Metabólico	109
5.2.4	Análisis de biomarcadores de estrés oxidativo en función de los diferentes fenotipos del Síndrome de Ovario Poliquístico.....	117
5.2.5	Agrupación de mujeres con Síndrome de Ovario Poliquístico en función de los niveles de 8-Isoprostanos.....	119
5.2.6	Análisis de correlaciones.....	126
5.2.7	Análisis de curvas ROC	130
6	DISCUSIÓN.....	135
7	CONCLUSIONES	163
8	BIBLIOGRAFÍA.....	167
9	ANEXOS.....	211
	ANEXO I. Consentimiento informado para participantes en el proyecto.....	196
	ANEXO II. Escala <i>Ferriman-Gallwey</i> para la medición del grado de hirsutismo.....	197
	ANEXO III. Aportaciones de la investigación. Artículos científicos.....	200

ABREVIATURAS

- Aa: aminoácido
- ACLUPI: anticoagulante lúpico
- ACO: anticonceptivos orales
- ACTH: hormona adrenocorticotropa
- AE-PCOS: Androgen Excess-Polycystic ovary syndrome society
- AGL: ácidos grasos libres
- Alb: albúmina
- ApoE: Apolipoproteína E
- ASRM: American Society of Reproductive Medicine
- AU: ácido úrico
- BVR: biliverdina reductasa
- Ca: calcio
- CAT: catalasa
- CC: clomifeno
- Cl: cloro
- CREA: creatinina
- COX: ciclooxigenasa
- C_T: colesterol total
- Cu: cobre
- DE: disfunción endotelial
- DHEAS: dihidroepiandrosterona sulfato
- DMT2: diabetes mellitus tipo 2
- EDTA_{k3}: ácido etilendiaminotetracético
- ET: elementos traza
- ECV: enfermedad cardiovascular
- EO: estrés oxidativo
- ESHRE: European Society for human Reproduction and Embriology
- Fe: hierro
- FibD: fibrinógeno derivado
- FSH: hormona folículo estimulante
- F₂-ISOP: F₂-Isoprostanos

- GGT: glutamil transaminasa
- GOT: transaminasa glutámico-oxalacética
- GPT: transaminasaa glutámico-pirúvica
- GPx: glutatin peroxidasa
- GRd: glutatión reductasa
- HPLC: cromatografía líquida de alta resolución
- GSH: glutatión reducido
- HA: hiperandrogenismo
- HDL-C: lipoproteína de baja densidad-colesterol
- HOMA-IR: modelo homeostático de evaluación de la resistencia a la insulina
- HUVA: hospital clínico universitario Virgen de la Arrixaca
- H₂H₂: peróxido de hidrógeno
- IC: intervalo de confianza
- IMA: albúmina modificada por isquemia
- IMC: índice de masa corporal
- IRS: sustrato del receptor de insulina
- ISOP: isoprostanos
- I/R: isquemia/reperfusión
- IUPAC: Unión Internacional de Química Pura Aplicada
- JCBN: Comisión de Nomenclatura Bioquímica
- K: potasio
- LAP: índice de acumulación lipídica
- LDL-C: lipoproteína de alta densidad-colesterol
- LH: hormona luteinizante
- MDA: malonildialdehído
- MP: metales pesados
- MULLE: hormona antimülleriana
- Na: sodio
- NIH: National Institute of Health
- NO: óxido nítrico
- NOS: óxido nítrico sintasa
- NOX: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa
- ONOO⁻: anión peroxinitrito

- OH[•]: radical reactivo hidroxilo
- OR: odds ratio
- O^{2•-}: anión superóxido
- P: fósforo
- PCR: proteína C reactiva
- PG: prostaglandinas
- PI3K: fosfatidil inositol 3-quinasa
- PON-I: paroxidasa I
- PUFAS: ácidos grasos poliinsaturados
- RCV: riesgo cardiovascular
- RL: radicales libres
- RNS: especies reactivas de nitrógeno
- PRG: progesterona
- PRL: prolactina
- PROTC: proteína C
- PROTS: proteína S libre
- RI: resistencia a la insulina
- ROS: especies reactivas de oxígeno
- SAC: S-adenosil-cisteína
- SAH: S-adenosil-homocisteína
- SE: selenio
- SHBG: globina fijadora de hormonas sexuales
- SMet: síndrome metabólico
- SOD: superóxido dismutasa
- SOP: síndrome del ovario poliquístico
- TAC: capacidad antioxidante total
- TP: tiempo de protrombina
- TG: triglicéridos
- T_L: testosterona libre
- TNF- α : factor de necrosis tumoral α
- TSH: tirotropina
- T_T: testosterona total
- TTPA: tiempo de tromboplastina parcial activada
- TX: tromboxanos

- VIH: virus de la inmunodeficiencia humana
- VitA: vitamina A
- VitB12: vitamina B12
- VitE: vitamina E
- XOR: xantino óxidoreductasa
- Zn: zinc
- 8-ISOP: 8-Isoprostanos

1INTRODUCCIÓN

1.1 Síndrome de ovario poliquístico

1.1.1 Definición y antecedentes

El síndrome de ovario poliquístico (SOP) es una de las alteraciones endocrinas más comunes en la mujer ya que afecta al 5-10% de las mujeres en edad reproductiva, siendo la causa más común de hiperandrogenismo (HA) e hirsutismo y la principal causa de esterilidad por anovulación. Se define como un síndrome de disfunción ovulatoria con manifestaciones variadas de HA clínico y/o bioquímico, y presencia de poliquistosis ovárica (1). Actualmente la relación entre SOP y síndrome metabólico (obesidad, hipertensión, dislipemia, diabetes) lo convierten en un grave problema de salud pública con un alto coste económico (2).

El SOP presenta una amplia heterogeneidad en cuanto a la presentación clínica y los criterios diagnósticos. A lo largo de la historia se han descrito una serie de acontecimientos en relación al SOP que nos permiten llegar hasta lo que hoy en día se conoce sobre este síndrome. A pesar de que los hallazgos de ovarios poliquísticos datan de al menos un siglo antes, fueron *Stein* y *Leventhal* en 1935 los primeros en describir el SOP como un complejo sindrómico caracterizado por anovulación crónica, obesidad e hirsutismo. Además, los ovarios de estas pacientes presentaban ciertas características morfológicas particulares, tales como: aumento de tamaño, engrosamiento de la túnica albugínea y microquistes múltiples situados periféricamente en la zona subcortical ovárica (3).

Años más tarde, en 1976, *Rebar* describió la inadecuada secreción de gonadotrofinas en el SOP, destacando niveles elevados de la hormona luteinizante (LH) (4), y en 1980 *Burghen* describió por primera vez la asociación de este síndrome con la resistencia a la insulina (RI) (5). A pesar de que fue *Swanson* quien describió en 1981 por primera vez los hallazgos ecográficos de la mujer con SOP (6), este diagnóstico ecográfico no fue aceptado hasta 1985 cuando *Adams* describió los criterios diagnósticos (7). Durante muchos años no hubo un acuerdo sobre el diagnóstico de dicho síndrome, hasta que en Abril de 1990, durante la conferencia sobre SOP, el *National Institute of Health (NIH)* en

Bethesda (USA) se concluyó que los mejores criterios para el diagnóstico de SOP debían de incluir, en orden de importancia: HA y/o hiperandrogenemia, disfunción menstrual (oligo/anovulación) y la exclusión de otras alteraciones hormonales conocidas, como la hiperplasia suprarrenal no clásica, trastornos tiroideos, la hiperprolactinemia, el Síndrome de Cushing y tumores virilizantes (8). En Europa, y principalmente en Inglaterra, muchos expertos decidieron utilizar los hallazgos de ultrasonido de ovarios poliquísticos como el principal criterio para hacer su diagnóstico.

Más tarde, en Mayo de 2003, la *European Society for Human Reproduction and Embryology* y la *American Society of Reproductive Medicine* llegaron a un consenso en la reunión de expertos en Rotterdam, donde se establecieron los siguientes nuevos criterios diagnósticos para el SOP, de los cuales al menos dos deben estar presentes: presencia de oligo y/o anovulación, signos clínicos y/o bioquímicos de HA y ovarios de apariencia ecográfica poliquística (presencia de 12 o más folículos de 2 a 9 mm de diámetro y/o volumen ovárico superior a 10 cm³) (9).

Más recientemente, a finales del año 2006, la *Androgen Excess-Polycystic ovary syndrome (AE-PCOS)* propone que el HA, definido por la presencia de hirsutismo y/o hiperandrogenemia, debe ser obligatorio en el diagnóstico junto con la disfunción ovulatoria (1).

Teniendo en cuenta que en todos los criterios es preciso descartar etiologías secundarias, tal y como se muestra en la tabla 1, según los criterios del NIH Y AE-PCOS, los criterios 1 y 2 deben de estar presentes para el diagnóstico del SOP y según los criterios de Rotterdam se requiere la presencia de 2 de los 3 puntos individuales.

Tabla 1: Criterios diagnósticos del Síndrome del Ovario Poliquístico.

Criterios del NIH	Criterios de Rotterdam	Criterios de la AE-PCOS
1. Oligo y/o anovulación	1. Oligo y/o anovulación	1. Hiperandrogenismo, hirsutismo y/o hiperandrogenemia
2. Hiperandrogenismo clínico y/o bioquímico	2. Hiperandrogenismo clínico y/o bioquímico	2. Anomalía ovárica: • Oligo-anovulación y/u • Ovarios poliquísticos
	3. Ovarios poliquísticos	

De acuerdo con estas guías (1, 8, 9), se podrían considerar la existencia de varios fenotipos en base a la presencia o ausencia de oligo anovulación, HA, y morfología de ovarios poliquísticos:

- Fenotipo A: Pacientes con HA, ciclos anovulatorios y ovarios poliquísticos;
- Fenotipo B: Pacientes con HA y anovulación crónica;
- Fenotipo C: Pacientes con HA y ovarios poliquísticos;
- Fenotipo D: Pacientes con anovulación crónica y ovarios poliquísticos.

La complejidad en las manifestaciones clínicas y su variación a lo largo de la vida de las mujeres afectadas, ha dificultado la obtención de una definición consensuada y de un criterio universalmente aceptado para el diagnóstico del SOP. Es por ello, que los estudios comparativos se han enfrentado al problema de la falta de consenso en su definición, y hoy, cuando se intenta establecer

precisiones ya sean endócrinas, semiológicas, etiológicas, o anatomopatológicas, la definición pierde nitidez, los límites se desdibujan y la inclusión o exclusión de pacientes comienza a depender del criterio o subjetividad del médico. Con esto queda dicho que, no hay ningún signo o síntomas patognomónicos de esta enfermedad, pero sí, una serie de claves que adecuadamente valoradas permitirán llegar al diagnóstico y tratamiento apropiado (3).

En definitiva, éste síndrome comprende un indefinido conjunto de situaciones anormales desde el punto de vista esteroideogénico, con aumento de la secreción androgénica, pobre desarrollo folicular y tendencia a la anovulación crónica, afectando así la reproducción, a la parte metabólica y a otros sistemas del cuerpo de todas las mujeres que lo sufren.

1.1.2 Epidemiología

Uno de los motivos más importantes para incidir en la importancia de la unificación de criterios diagnósticos para el SOP, es que se trata del trastorno endocrinopatológico más frecuente en mujeres de edad fértil (10). La prevalencia del SOP varía en función de los criterios diagnósticos utilizados y de las características de la población estudiada, debido a la influencia de distintos factores en la etiología del síndrome, con cifras del 6-10% cuando se emplean los criterios NIH (11-13), y elevándose hasta el 20% cuando se usan los de Rotterdam (14, 15), puesto que éstos destacan el aspecto ecográfico de los ovarios y son menos restrictivos que aquellos. Se considera que los ovarios de apariencia poliquística están presentes en un 15-20% de las mujeres sanas y alcanzan la máxima prevalencia (30-40%) en la época prepuberal (16, 17).

En España, dos estudios epidemiológicos realizados en muestras de donantes de sangre, estimaron, usando criterios del NIH, prevalencias del 6,5% (18) y del 5,4% (19). Estos resultados resultan un poco superiores a la prevalencia que se estimó hace años en un estudio de Alabama, 4,7% (20). Sin embargo, sí resultan concordantes con otros estudios realizados posteriormente en Grecia y

en Estados Unidos, donde se ha apreciado una prevalencia del 8,8 y 6,6 %, respectivamente (21, 22).

Es importante tener en cuenta que la prevalencia de SOP puede verse influida por las poblaciones sujetas a estudio, debido a la influencia de distintos factores en la etiología del síndrome. La diversidad étnica es un punto fuerte a tener en cuenta a la hora de valorar prevalencias del SOP, ya que, por ejemplo, la pilosidad de las mujeres europeas del este es menor que la de las afroamericanas, y las mujeres asiáticas por lo general son menos obesas y carecen de hirsutismo. *Chae et al. (2008)* encontraron en un estudio sobre mujeres coreanas que el SOP sin HA es un fenotipo común en Corea (23). En una población como la de los indios Pima, en donde existe una gran predisposición genética a la aparición de diabetes mellitus y obesidad, la prevalencia de SOP alcanza el 21% (24), y en mujeres con diabetes mellitus tipo 1 que reciben tratamiento con dosis suprafisiológicas de insulina, se estima en el 18,8% (25). Así mismo, en un meta-análisis realizado en mujeres iraníes, el cual incluyó los resultados de 30 estudios, la prevalencia de SOP basada en criterios del NIH fue del 6,8%, basada en los criterios de Rotterdam fue del 19,5%, y basada en el de ultrasonidos fue del 4,4% (26).

1.1.3 Fisiopatología

Hoy en día la causa principal del SOP es aún desconocida, y se considera multifactorial y poligenética. Por una parte, existen componentes sobre los que no podemos influir, como son los preconcepcionales (genética) y postconcepcionales (bajo peso al nacer y exposición intraútero a andrógenos), y por otro lado existen otros aspectos que si pueden ser modificables como son los hábitos de vida, la dieta y el ejercicio.

En el SOP se observan alteraciones hormonales y también metabólicas, relacionadas entre sí, que son las responsables de las manifestaciones clínicas a corto y largo plazo. La RI se presenta en la mayoría de los casos, con una

hiperinsulinemia compensatoria que induce HA. La disfunción del tejido adiposo también está implicada por inducir RI. El estrés oxidativo (EO) es otro factor que también juegan un papel importante en la etiología del SOP y que describiremos con más detalle más adelante. En la Figura 1 se muestran los diferentes mecanismos fisiopatológicos que ocurren y como se relacionan entre sí.

Así, en cuanto a su posible etiopatogenia conviene destacar diferentes aspectos:

I. Secreción inadecuada de gonadotrofinas e HA

A nivel del ovario, la LH estimula a las células de la teca para que sinteticen andrógenos. Estos andrógenos esteroideos son convertidos por la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa en testosterona o aromatizados por una enzima aromatizante en estrógenos (27). Estudios realizados *in vivo* e *in vitro* con cultivo de células de la teca sugieren que en mujeres afectadas con SOP, dichas células son más eficientes en producir testosterona que estrógenos (27, 28). Por otra parte, la hormona foliculoestimulante (FSH) regula la actividad de la enzima aromatasa en las células de la granulosa, determinando de este modo cuánto estrógeno es sintetizado a partir de los precursores androgénicos. Cuando la concentración de LH es superior a la de FSH, situación que ocurre en mujeres con SOP (29), los ovarios sintetizan preferentemente andrógenos. El 75% de mujeres con SOP presentan una inversión el cociente FSH/LH (30). El 80-85% de mujeres con HA clínico tienen SOP (1, 31), y los niveles de testosterona libre (T_L) y testosterona total (T_T) y de dihidroepiandrosterona sulfato (DHEAS) se encuentran elevados en el 50-75% de mujeres con SOP (32).

II. Resistencia a la insulina

Uno de los factores más importantes y que ha tomado mayor relevancia en la etiología del SOP es la presencia de una insulinoresistencia en un 50-70% de mujeres con dicho síndrome (33), la cual produce una hiperinsulinemia compensatoria por parte del páncreas para que las células capten la glucosa. La insulina juega un papel tanto directo como indirecto en la patogénesis de la hiperandrogenemia, ya que actúa sinérgicamente con la LH para mejorar la producción de andrógenos en las células de la teca. También aumenta la actividad del citocromo P450 17A1, y el número de receptores de LH y del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) (34). Además, la hiperinsulinemia también bloquea la secreción hepática de la proteína de unión a IGF-I, resultando en un incremento en la bioactividad del IGF-I e IGF-II, los cuales son dos reguladores importantes de la maduración folicular ovárica y de la esteroidogénesis. La producción ovárica de andrógenos en las células de la teca se incrementa por el aumento sistémico de IGF-I e IGF-II que se une a los receptores de IGF-I (35). La insulina inhibe también la síntesis hepática de la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG), la cual se une a la testosterona. Así mujeres con SOP presentan concentraciones elevadas de T_L , y por lo tanto una mayor actividad biológica, mientras que la T_T se mantiene normal o modestamente elevada (36).

La hiperinsulinemia previene el desarrollo folicular y causa anovulación a través de dos mecanismos: directamente a nivel ovárico causa atresia folicular prematura y arresto folicular antral, e indirectamente causa disfunción de la respuesta ovárica a las gonadotropinas endógenas (35).

La RI se incrementa por la coexistencia de obesidad. El exceso de grasa, fundamentalmente cuando existe una disposición visceral de la misma, se encuentra íntimamente relacionada con la aparición de RI, de tal forma que la práctica totalidad de las pacientes con SOP obesas la presentan en mayor o menor medida (37). En un estudio con pacientes obesas y no obesas con SOP, se midió la RI resultando mayor en el grupo de obesas, pero también en el grupo de no obesas en comparación a los controles, lo que demuestra que la

RI se potencia con la obesidad, pero es independiente de ésta y de la composición corporal (38, 39).

Diversos estudios han sido dirigidos a encontrar las alteraciones responsables que desencadenan la RI, con especial énfasis en las anomalías en el receptor de la insulina, en la unión insulina-receptor y a nivel post-receptor. El principal defecto de la acción de la insulina en pacientes con SOP es probablemente debido a un defecto post-unión en la transducción de señal mediada por el receptor de insulina que da como resultado un trastorno significativo en la unión al receptor. Esto parece ser defecto genético intrínseco en mujeres con SOP y consiste en un aumento de la fosforilación de la serina independiente de la insulina y una disminución de la fosforilación de la tirosina dependiente de la insulina (35).

III. Predisposición genética

A pesar de la controversia respecto a la etiología del SOP, la asociación entre factores ambientales y genéticos ha sido demostrada (40). La sospecha de la predisposición genética como origen del síndrome se basa en la frecuente agregación familiar que presenta el SOP, el HA y las alteraciones metabólicas acompañantes. Estudios realizados con mujeres gemelas, sin diferencias en factores ambientales, sugieren que la genética explica alrededor del 70% de la patogénesis del SOP (41). Desde el año 2011, se han publicado cinco estudios sobre la asociación del genoma completo y el SOP (42-46). En conjunto, estos estudios han identificado 16 *loci* significativamente asociados con el SOP. Cuatro regiones (*THADA*, *C9orf3*, *FSHB* y *YAP1*) han sido replicadas en más de un estudio, y en mujeres de origen caucásico y chino, sugiriendo así mecanismos comunes de patogénesis en diferentes poblaciones. Los dos estudios realizados con mujeres chinas con SOP demuestran 11 *loci* genéticos asociados con este síndrome (43, 44). Estas variantes se encuentran en regiones que contienen genes importantes para la acción de la gonadotropina (*LHCGR* y *FSHR*), genes asociados con riesgo para la diabetes tipo 2 (*THADA* y *HMGA2*) y tipo 1 (*RAB5B*, *SUOX*, *ERBB3*), genes implicados en la

señalización de la insulina (*INSR*) y en la arquitectura de factores importantes para el remodelado de la cromatina (*TOX3*), genes relacionados con el tamaño de órganos y la proliferación celular (*YAP1* y *SUMO1P1*), y otros genes cuya relación con el SOP no está aún clara. El tercer estudio realizado en población coreana no identificó ninguna asociación significativa, pero reportaron 7 loci previamente encontrados asociados al SOP (45). El estudio realizado por *Hayes et al. (2015)* fue el primer estudio de asociación del genoma con el SOP en mujeres caucásicas y, como resultado, fueron encontradas dos nuevas señales para el riesgo de SOP (46). La investigación más reciente que incluyó un total de 7000 casos de SOP ha reportado tres nuevos loci, *ERBB4* (Erb-B2 receptor tirosina quinasa 4), *RAD50* (RAD50 proteína de reparación de ruptura de doble cadena) y *KRR1* (KRR1 procesoma de la subunidad pequeña) (42). En particular, esto demuestra que la vía Erb-b puede estar implicada en el SOP, y esta vía está involucrada en el desarrollo de células germinales primordiales en ratones (47). Además, *ERBB3* interacciona con *YAP1* en la vía de señalización *Hippo*, el cual regula el tamaño del órgano mediante el control de la proliferación celular y la apoptosis, y se ha asociado con la acumulación folicular primordial en ratones (48). En conjunto, estos cinco estudios proporcionan pruebas considerables para el papel de la vía del *Hippo*, los cambios neuroendocrinos y receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFRs) en la fisiopatología del SOP. Además, las variantes de susceptibilidad en el SOP encontradas por *Day et al. (2015)* también se encontraron asociadas con niveles de hormona antimülleriana (MULLE), FSH y LH (42, 46), ofreciendo una cierta penetración de la genética de estos rasgos también.

Otros estudios sucesivos realizados en mujeres europeas han encontrado algunas de estas variantes, 9q33.3 en *DENND1A* y 2p21 en *THADA* (49-53). Una investigación reciente con mujeres árabes demuestra la asociación de nuevas variantes en *LHCGR* y *FSHR* con SOP (54). En mujeres del sur de la India, un estudio demuestra la asociación del SOP con seis genes (*Receptor de andrógenos*, *Folistatina*, *subunidad β de LH*, *Calpaina-10*, *INSR* y *PPARy*) (55), y otro estudio encontró asociación entre varios polimorfismo del gen de la resistina (*RENT*) y el incremento del riesgo a presentar SOP (56). También

recientemente, se ha encontrado asociación entre la variante del gen superóxido dismutasa 2 A16V y el SOP en la población china (57).

Por otra parte, las variantes asociadas con la menopausia también se asocian con el riesgo de SOP, lo que sugiere un fondo genético compartido para el envejecimiento ovárico y SOP (42, 58), y proporcionando una explicación evolutiva de la alta prevalencia de este síndrome.

En resumen, los estudios realizados hasta el momento demuestran que el SOP es una enfermedad compleja multigenética, en la que factores epigenéticos y ambientales juegan un papel importante en la expresión fenotípica de los síntomas. Recientemente, una revisión sistemática que ha resumido los hallazgos recientes de polimorfismos genéticos encontrados en el SOP de publicaciones relevantes, señala que la importancia genética y la relevancia fisiopatológica exacta de la mayoría de estos genes sobre este síndrome, que incluyen *StAR*, *FSHR* y *FTO*, aún no están claros y deben confirmarse (59).

IV. Grado moderado de inflamación

En respuesta al estado de inflamación, nuestros glóbulos blancos producen sustancias para luchar contra la infección. Las investigaciones han demostrado que las mujeres con SOP presentan cierto grado de inflamación crónica (60, 61) que se relaciona con el desarrollo de RI, ya que los datos han demostrado una relación causal entre la RI e inflamación (62).

Por otra parte existe evidencia de la asociación del genotipo GG del gen *MEP1A*, que codifica para una proteína implicada en la producción de IL-1, con un incremento significativo del modelo homeostático de evaluación de la RI (HOMA-IR), del nivel de insulina en ayunas y tras su estimulación (63).

V. Estrés oxidativo

Se desarrolla más adelante.

VI. Factores ambientales

Es posible que los factores ambientales puedan jugar un papel importante en la etiología del síndrome. Una de las teorías actuales establece la posibilidad de que determinadas alteraciones durante la gestación produzcan un retraso en el crecimiento intrauterino, dando lugar a un recién nacido con bajo peso para la edad gestacional. Estos niños presentarían una predisposición en el futuro de presentar RI, alteraciones del metabolismo hidrocarbonado, HA y SOP. Esa susceptibilidad individual se pondría de manifiesto con factores externos, como una alimentación rica en grasas saturadas y pobre en hidratos de carbono, la adquisición de hábitos de vida sedentarios, y la existencia de obesidad. Aunque esta teoría resulta muy llamativa, y existen estudios que relacionan el bajo peso al nacer con un desarrollo en el futuro de pubarquia precoz, RI, HA ovárico y suprarrenal funcional, algunos autores no encuentran dicha asociación (64, 65).

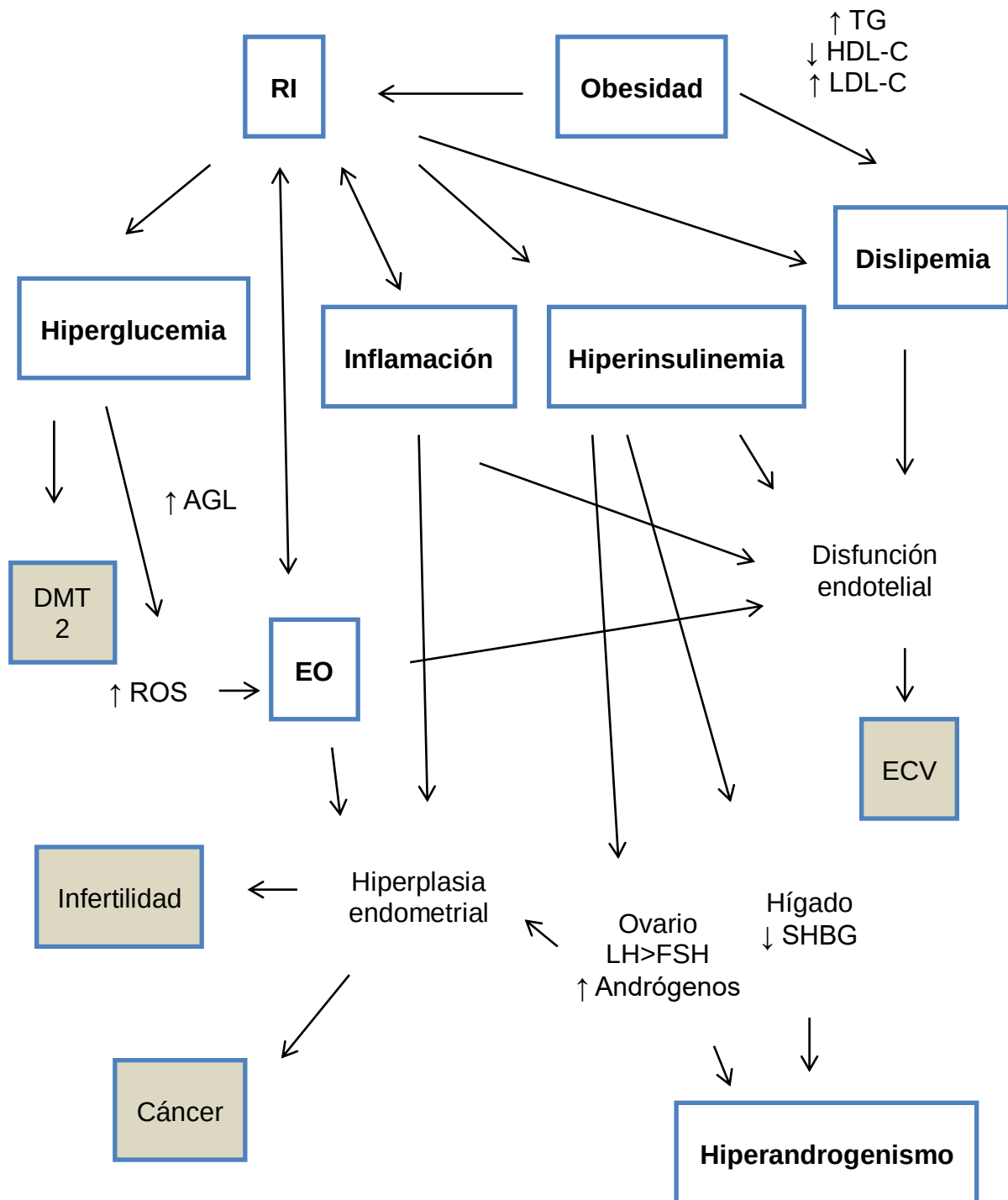


Figura 1. Mecanismos fisiopatológicos que ocurren en el SOP. AGL: ácidos grasos libres. DMT2: diabetes mellitus tipo2. ECV: enfermedad cardiovascular. EO: estrés oxidativo. FSH: hormona foliculoestimulante. HDL-C: lipoproteína de baja densidad-colesterol. LDL-C: lipoproteína de alta densidad-colesterol. LH: hormona luteinizante. RI: resistencia a la insulina. ROS: especies reactivas de oxígeno. SHBG: globulina fijadora de hormonas sexuales. TG: triglicéridos.

1.1.4 Manifestaciones clínicas y complicaciones

Las manifestaciones clínicas del SOP empiezan a aparecer de forma característica en la etapa peripuberal, aunque se ha descrito existencia de pubarquia prematura, definida como la aparición de vello púbico en niñas menores de 8 años, que podría predisponer a padecer SOP tras la pubertad, y ser por tanto la primera manifestación cronológica del síndrome (66). En general, se reconocen tres características claves del SOP. La correcta evaluación de estos aspectos clínicos cobra un especial interés dada la trascendencia que, de forma consensuada, tiene en el diagnóstico del SOP.

I. Disfunción ovulatoria y menstrual.

La disfunción ovulatoria puede presentarse tanto clínicamente, como es la interrupción del flujo menstrual, oligo-amenorrea (menstruación con intervalos de 36 a 90 días), o sangrado uterino anormal, como de manera subclínica, sin la evidencia de esa interrupción de la regularidad en el sangrado vaginal. Así pues, presentar periodos regulares no siempre es indicativo de una función ovulatoria correcta. Aproximadamente el 75-85% de mujeres con SOP han evidenciado clínicamente disfunción menstrual, caracterizada por infrecuentes o ausentes sangrados menstruales (67). Por otro lado, un 20-50% de mujeres hiperandrogénicas con periodos menstruales regulares (eumenorrea) tienen anovulación crónica y quizás puedan considerarse afectadas por el SOP (68).

II. Hiperandrogenismo clínico y bioquímico.

La hiperandrogenemia refiere niveles elevados de andrógenos en la circulación sanguínea. Las mujeres con SOP presentan niveles elevados de T_T , T_L , y DHEAS y niveles disminuidos de SHGB (29).

Por otra parte, el 72% de mujeres con SOP sufren HA clínico: hirsutismo (crecimiento excesivo de vello terminal en la mujer siguiendo un patrón

masculino de distribución, en zonas andrógeno-dependientes: patillas, barbilla, cuello, areolas mamarias, tórax, en área inmediatamente superior o inferior al ombligo, así como en muslos y espalda), acné y/o alopecia androgénica (67).

III. Morfología de ovarios poliquísticos mediante ecografía transvaginal.

El criterio de Rotterdam define ovarios poliquísticos únicamente en el número total de folículos en la fase folicular temprana, que se define como la presencia de 12 o más folículos en todo el ovario de 2 a 9 mm cada uno de diámetro, con estroma central hiperecogénico y/o el aumento del volumen ovárico > 10 ml, en al menos un ovario, respectivamente (69).

Además de estos aspectos típicos de las mujeres con SOP, en ellas se pueden encontrar otras características, que, aunque no forman parte de la definición del síndrome, están estrechamente ligadas a él:

Gonadotropinas anormales. Numerosos estudios han demostrado que más del 75% de mujeres con SOP presentan irregularidad en la función gonadotrópica, evidenciando un incremento del cociente LH/FSH, el cual está considerado como marcador de SOP (29).

Niveles elevados de MULLE. La MULLE es una sustancia producida en las células de la granulosa de los folículos ováricos. Su determinación constituye un marcador bioquímico novedoso para medir la reserva ovárica (cantidad de ovocitos que le quedan a la mujer y la calidad de los mismos) (70). Se han encontrado niveles séricos de MULLE elevados en mujeres con SOP (71).

RI e hiperinsulinemia. En general, entre el 50% y 70% de las mujeres con SOP han demostrado RI. Aunque la prevalencia de RI es mayor en pacientes obesas que en no obesas, está demostrado que las pacientes con SOP con peso normal sufren dicha alteración (72). Además, de la RI van a derivar otras complicaciones metabólicas como la dislipemia e hiperglucemia, entre otras. El HOMA-IR es un cálculo derivado de la glucosa y la insulina en ayunas para valorar la RI. También se ha examinado el papel de la adiponectina (una proteína producida y secretada por los adipocitos en respuesta a la insulina)

como marcador de RI en SOP, cuyos niveles séricos se encuentran reducidos en estas mujeres (73, 74).

Es importante destacar las numerosas complicaciones que sufren a largo plazo las mujeres con SOP.

1.1.4.1 Morbilidad obstétrica

Las mujeres con SOP presentan exceso de andrógenos gestacional, hiperinsulinemia, diabetes gestacional, los cuales pueden afectar negativamente el resultado del embarazo. También presentan mayor riesgo de preeclampsia, dada su baja paridad, índice de masa corporal (IMC) alto y la alta tasa de embarazos múltiples relacionados con el uso de terapias de fertilidad. En consecuencia, los recién nacidos de madres con SOP tienen una mayor tasa de hospitalización en cuidados intensivos neonatal y un mayor riesgo de mortalidad perinatal (75).

1.1.4.2 Síndrome metabólico. Diabetes y enfermedad cardiovascular

Como ya se ha mencionado antes, las complicaciones metabólicas frecuentes que se dan en el SOP son obesidad, RI, dislipemia, disglucemia, hipertensión, y el consecuente desarrollo de alto grado de inflamación. Todos ellos, factores de riesgo cardiovascular (RCV), se consideran predictores independientes de morbilidad y mortalidad cardiovascular, y por lo general se agrupan en lo que se conoce como síndrome metabólico (SMet).

La dislipemia quizás sea el desorden metabólico más común en el SOP (76). Éste incluye un perfil aterogénico con niveles reducidos de lipoproteína cardioprotectora de alta densidad (HDL-C), niveles elevados de lipoproteína de baja densidad (LDL-C) y de triglicéridos (TG) (77, 78).

Numerosos factores afectan a la presión sanguínea, incluyendo genéticos, inactividad física, estrés, alto consumo de sal, etc. Estudios epidemiológicos han demostrado que existe una alta prevalencia de hipertensión entre mujeres

con SOP, particularmente de hipertensión sistólica (79). La disfunción endotelial sugerida por el aumento de los niveles de endotelina-1 en las mujeres con SOP sin tener en cuenta el IMC (80) y los niveles más altos de andrógenos (probablemente a través de la activación del sistema de renina-angiotensina) (81) se han sugerido como mecanismos patognomónicos de hipertensión en SOP.

La prevalencia de obesidad en mujeres con SOP se ha situado en un 35 al 50% según datos de países desarrollados (82). La obesidad tiene una distribución central, considerada un factor de riesgo de hipertensión, diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) y enfermedad cardiovascular (ECV). La obesidad central se caracteriza por el aumento de la relación cintura-cadera (>0.85), el cual predispone a la hiperinsulinemia y la dislipemia, debido al mayor nivel de ácidos grasos libres liberados por el hígado, y constituye un factor de riesgo significativo de infarto agudo de miocardio en mujeres con SOP (83). A pesar de la clara predisposición de la obesidad al desarrollo de eventos cardiovasculares, se sabe que las mujeres con SOP y peso normal también sufren trastornos metabólicos y riesgo de complicaciones metabólicas a largo plazo (84).

A la alta prevalencia de dislipemia y adiposidad abdominal asociada al SOP, hay que sumarle una RI aterotrombótica inflamatoria que eleva los mediadores proinflamatorios, lo que perjudica a la función endotelial, reduce la reactividad vascular y promueve la aterosclerosis subclínica (85, 86). Las mujeres con SOP tienen aumentado el espesor de la capa íntima-media de la carótida y la calcificación de la arteria coronaria (87, 88). Además el SOP se asocia con un tiempo de generación de trombina más corto y mayor riesgo de hipercoagulabilidad (89). *Shaw et al. (2008)* han confirmado que las mujeres con SOP tienen más eventos cardiovasculares y menor supervivencia libre de eventos (eventos fatales y no fatales) frente a las mujeres sin SOP, y que esta diferencia es aún mayor cuando los accidentes cerebrovasculares se incluyen (90).

Como ya se ha dicho antes, del 50 al 70% de las mujeres con SOP presentan RI. Como consecuencia, el 40% de estas mujeres desarrollan intolerancia a la

glucosa o DMT2 hacia la cuarta década de vida, siendo la edad y el aumento de peso factores de empeoramiento (91). Una sistemática revisión y meta-análisis de 35 estudios encontraron que el SOP se asoció con una prevalencia 2,48 veces mayor de intolerancia a la glucosa y un aumento de la prevalencia 4.5 veces mayor de DMT2 (92) y, lo que es más importante, estas diferencias fueron similares en los estudios que incluyeron sujetos con un IMC similar. Aunque el incremento del riesgo de DMT2 en mujeres con SOP es independiente de la edad y del IMC, su incidencia incrementa substancialmente con el aumento de obesidad (93). Cabe destacar que se ha estimado que el 15.0-35.6% de todos los casos incidentes de DMT2 en mujeres blancas son atribuibles al SOP (94). Por ello, las guías clínicas recomiendan una prueba de detección de DMT2 cada 1-3 años en todas las mujeres con SOP, con la frecuencia influenciada por factores de riesgo adicionales para DMT2 (95).

1.1.4.3 Infertilidad

La anovulación es la causa predominante de infertilidad en SOP (96). Un subgrupo de mujeres con SOP exhibió también una alteración de la competencia de desarrollo del ovocito, o la capacidad de los ovocitos para completar la meiosis y someterse a la fertilización, la embriogénesis y el desarrollo hasta el nacimiento (97). Después de la estimulación ovárica controlada para la fecundación in vitro, algunas mujeres con SOP tienen el desarrollo del embrión apropiado y resultando un embarazo normal (98, 99). Las mujeres con SOP combinado con obesidad y los mayores grados de HA e hiperinsulinemia (100) son particularmente vulnerables al desarrollo de los ovocitos deteriorados. Además, estas mujeres experimentan una alta tasa de abortos involuntarios.

1.1.4.4 Cáncer

Ya que la hiperinsulinemia y la hiperestrogenemia debidas a la RI y a la disfunción ovulatoria promueven la proliferación celular endometrial, las

mujeres con SOP tienen un mayor riesgo de anomalías endometriales, incluyendo carcinomas (101). Un reciente estudio con mujeres danesas demostró que mujeres con SOP tienen más riesgo de padecer cáncer de endometrio, mientras que la asociación de SOP con los cánceres de mama y ovario no fue demostrada (102).

1.1.4.5 Problemas psicológicos

Las mujeres con SOP tienen mayor prevalencia de trastornos del estado de ánimo, como la depresión (26-40%), ansiedad (11,6%) y trastornos de la sexualidad, en parte debido a la disminución de la calidad de vida causada por la obesidad, la virilización, trastornos menstruales e infertilidad (103, 104).

1.1.5 Diagnóstico y tratamiento

Como ya se ha dicho anteriormente el SOP tiene una gran heterogeneidad en cuanto a la presentación clínica y en cuanto a los parámetros diagnósticos. En el año 2012 un documento del Panel de Expertos del NIH (Estados Unidos) sugirió una lista de acciones destinadas a mejorar la comprensión en el diagnóstico y tratamiento del SOP, incluida la necesidad de marcadores biológicos y clínicos que utilicen un genotipo o enfoque biológico (105). El diagnóstico se basa en la presencia de al menos dos de los siguientes criterios: disfunción ovulatoria, caracterizada por oligomenorrea o anovulación crónica, signos clínicos o bioquímicos de HA, o apariencia de ovarios poliquísticos por ecografía (12 o más folículos de 2-9 mm o un aumento del volumen ovárico de >10 cm³). Más recientemente, la *Androgen Excess-PCOS Society* propone como obligatorio el HA en el diagnóstico (9).

El panel de un trabajo reciente del NIH patrocinada por un taller de Metodología Basada en la Evidencia en SOP respalda los criterios de Rotterdam, aunque

identifica las fortalezas y debilidades de cada uno de las tres características claves. Acorde con esta última definición, el diagnóstico de SOP puede ser establecido con dos de los tres criterios descritos, generando así cuatro fenotipos diferentes ya comentados anteriormente:

- **Fenotipo A:** mujer hiperandrogénica con oligoanovulación y morfología ovárica poliquística.
- **Fenotipo B:** mujer con HA, oligoanovulación y sin ovarios poliquísticos.
- **Fenotipo C:** mujer hiperandrogénica con ciclos ovulatorios regulares y ovarios poliquísticos.
- **Fenotipo D:** mujer normoandrogénica con oligoanovulación y morfología ovárica poliquística.

Todos los autores coinciden en que el SOP se considera un diagnóstico de exclusión. Los trastornos que imitan al SOP son comparativamente fáciles de excluir; por lo tanto, en todas las mujeres deben medirse la tirotropina (TSH), la prolactina (PRL), y el nivel de la progesterona (PRG). La hiperprolactinemia puede presentarse con amenorrea o hirsutismo y la enfermedad de la glándula tiroides puede presentarse con ciclos menstruales irregulares (106-108). En las mujeres con HA, la hiperplasia suprarrenal congénita debe excluirse porque se puede encontrar en un 1,5-6,8% de los pacientes que presentan exceso de andrógenos (67). En las mujeres que presentan amenorrea, virilización, o hallazgos físicos no asociados al SOP, tanto la debilidad muscular proximal (Síndrome de Cushing) o la prominencia frontal (acromegalia), deben ser considerados y excluidos.

Desde la perspectiva del tratamiento farmacológico, el SOP podría considerarse actualmente el trastorno huérfano más prevalente en mujeres adolescentes y adultas. La mayoría de medicamentos que se usan para tratar los síntomas del SOP, desde los anticonceptivos orales (ACO) hasta los antiandrógenos, los insulinosensibilizantes o los inhibidores de la aromatasa,

se usan de forma no etiquetada, porque ni la FDA ni la Agencia Europea del Medicamento no tienen aprobado aún ningún fármaco específico para el tratamiento del SOP (109).

La ausencia de un mecanismo causal claro en el síndrome ha llevado al desarrollo de múltiples tratamientos orientados a corregir los síntomas, teniendo en cuenta las necesidades de la paciente y su situación clínica. Los objetivos del tratamiento del SOP son: restablecer la fertilidad, frenar la producción de andrógenos, reducir los riesgos endometriales por falta de oposición progestágena, corregir los trastornos del ciclo, detener el crecimiento del vello y prevenir las complicaciones del síndrome metabólico.

Es importante tener en cuenta que la intervención en el estilo de vida debería de ser el primer paso terapéutico. Reducir el peso corporal, aumentar la actividad física y transmitir una correcta educación alimentaria en estas pacientes son la primera medida que hay que seguir, sobre todo en las pacientes obesas; una vez conseguido, gran parte de los estigmas androgénicos asociados al síndrome se reducen; si no ocurriese así, habría que pasar a utilizar las medidas farmacológicas.

Para el tratamiento de la hiperandrogenemia e hirsutismo los protocolos terapéuticos se orientan a reducir la producción endógena de andrógenos y la utilización de procesos no hormonales. Estos protocolos incluyen procesos cosméticos (específicamente para el hirsutismo), ACO, antiandrógenos solos o combinados con etinilestradiol, y si es necesario, sensibilizantes de insulina, particularmente metformina.

Si la paciente no tiene deseos de gestación las guías clínicas aconsejan la utilización de ACO, compuestos por progestágenos que disminuyen la LH y así su capacidad de producción de andrógenos ováricos, y por estrógenos que aumentan la SHBG disminuyendo así la biodisponibilidad de los andrógenos libres. Además, los ACO inducen una reducción moderada de los andrógenos adrenales, probablemente a través de una interacción directa con la síntesis de esteroides adrenales (110). Algunos gestágenos tienen propiedades antiandrogénicas, debido a sus efectos antagonizantes sobre el receptor y de

inhibición de la actividad de la enzima 5 α -reductasa. Esta clase de componentes incluyen acetato de ciproterona, drospirenona, dienogest, acetato de clomadinona, y progestágenos de tercera generación (desogestrel, gestodeno y norgestimato). Estos compuestos muestran a altas dosis una eficacia en la reducción del hirsutismo del 60 al 100%.

Los bloqueantes periféricos de los andrógenos presentan una alternativa para mejorar la hiperandrogenemia y el hirsutismo. Los más comúnmente utilizados son bloqueadores del receptor de andrógenos (flutamida y espironolactona) e inhibidores de la 5 α -reductasa (finasterida). La espironolactona es un diurético inhibidor de la aldosterona, afín a los receptores de la dihidrotestosterona. La flutamida es un antiandrógeno no esteroide selectivo, sin actividad progestacional estrogénica ni glucocorticoidea, que debe utilizarse con precaución debido a su efecto negativo sobre la función hepática (111). La finasteride inhibe la síntesis de 5-alfa-reductasa, disminuyendo los niveles de DHT y de sus metabolitos.

La disfunción ovárica puede ser fácilmente definida en la mujer adulta. Por el contrario, estos desordenes pueden resultar difíciles de reconocer en las adolescentes. Recientemente, la Sociedad Pediátrica de Endocrinología ha definido los criterios apropiados para el diagnóstico de SOP en adolescentes, los cuales incluyen una combinación inexplicada de patrón anormal de sangrado uterino, anormal para la edad y persistente durante 1-2 años, y evidencia de HA, por niveles elevados de T $_{\text{T}}$, hirsutismo o acné vulgar moderados a severos (112). Es importante prestar una especial atención en chicas adolescentes con sobrepeso u obesidad que a menudo se asocia con RI e hiperinsulinemia la cual puede ser *per se* causa responsable del exceso androgénico y de la disfunción ovárica. Las guías de la Sociedad de Endocrinología sugieren el uso de ACO sólo en la última etapa de la adolescencia. Aunque el mejor ACO y la duración apropiada para estas pacientes son inciertas, un tratamiento de mayor duración con éstos parece favorecer una menor probabilidad de desarrollar HA durante la edad adulta (112).

En el caso de mujeres adultas, aquellas con deseo de gestación, el citrato de clomifeno (CC) sigue siendo el inductor de la ovulación de primera elección en estas pacientes. Para las mujeres anovuladoras tipo II de la OMS que son resistentes al tratamiento con CC, la estimulación ovárica con gonadotropinas exógenas (gonadotropina menopáusica, gonadotropina menopáusica humana altamente purificada, FSH urinaria y FSH recombinante) es el tratamiento más aceptado (113). Otra opción clásica y ya demostrada es el “drilling ovárico” que consiste en la perforación del tejido ovárico con electrobisturí, el cual mejora las tasas de ovulación (90%) y de embarazo (60-70%), evitando los embarazos múltiples y las hiperestimulaciones ováricas que producen los tratamientos con gonadotropinas (114).

Otro aspecto importante a comentar es el tratamiento de la RI, ya que se considera que la disminución de la sensibilidad a la insulina es un componente regular del SOP, independientemente del grado de obesidad. La hiperinsulinemia aumenta la biosíntesis de andrógenos ováricos y disminuye la síntesis de SHBG. Además, la RI conlleva un incremento del riesgo a padecer diabetes tipo II, dislipemia y ECV. Por todo ello, es razonable pensar que los fármacos insulinosensibilizantes favorecerán una normalización de los parámetros endocrinológicos, con la restauración de una correcta foliculogénesis y ovulación, y con la consiguiente mejoría clínica en las mujeres con dicho síndrome. Los agentes que producen insulinosensibilización que se han ensayado en pacientes con RI incluyen: metformina, pioglitazona y rosiglitazona. De ellos, el más utilizado para el tratamiento de las mujeres con SOP es la metformina, una biguanida que mejora rápidamente los niveles de insulina, presión arterial y perfil lipídico. Numerosos estudios han demostrado que la metformina mejora significativamente los ciclos menstruales y las tasas de ovulación en mujeres con SOP (115). Ésta se ha empleado en diversos ensayos asociada al tratamiento con FSH, como en asociación al CC y a los ACO (116-118). El uso de metformina durante el embarazo reduce las complicaciones obstétricas asociadas al SOP (119), y disminuye el riesgo a desarrollar diabetes gestacional en este tipo de paciente (120).

Actualmente también se utilizan isómeros del inositol, en particular el Myo-Inositol y el D-chiro-Inositol, en el tratamiento del SOP, ya que mejoran los estados de RI (121). El Myo-inositol ha demostrado reducir el HA y la RI en mujeres con SOP (122, 123), además de restaurar espontáneamente la actividad ovárica y así la fertilidad en dichas mujeres (124).

Se han encontrado efectos favorables por parte de un mimético del péptido-1 del glucagón (GLP-1), la exenatida, al mejorar el peso y la regularidad de los ciclos menstruales en mujeres obesas con SOP (125). La liraglutida, un análogo de GLP-1 de acción prolongada que parece ser mejor tolerada que el exenatida, promueve la pérdida de peso y reduce la RI. Aunque ésta última sólo se utilice actualmente en el tratamiento de la diabetes tipo II, representa una opción atractiva para el tratamiento de pacientes obesas con SOP (126).

Debido a que el EO juega un papel importante en la fisiopatogenia del SOP, algunos estudios han demostrado que la administración de ácidos grasos omega-3 y vitamina E mejora el perfil metabólico y endocrino de mujeres con SOP (127, 128). Recientemente, *Rahmani et al. (2017)* han demostrado que la co-suplementación de dichos compuestos mejora la expresión génica de la lipoproteína a y de la lipoproteína de baja densidad oxidada, perfiles lipídicos y biomarcadores de EO (129). En esta línea, una reciente revisión sistemática y meta-análisis, que incluyó nueve ensayos clínicos con un total de 591 pacientes, demuestra que los ácidos grasos omega-3 pueden ser recomendados para el tratamiento de SOP con RI así como con colesterol alto (130). En el mismo contexto, se han encontrado efectos beneficiosos en cuanto a la tolerancia de la glucosa, ovulación y sensibilidad insulínica con el tratamiento de picolinato de cromo (cromo trivalente combinado con ácido picolínico) (131) y también con suplementos de selenio (SE) (132-134).

1.2 Estrés oxidativo y síndrome de ovario poliquístico

El EO se define como el desequilibrio entre una excesiva formación de sustancias oxidantes y una limitada defensa de sustancias antioxidantes (135). Aparte de la inflamación crónica y la RI, el EO podría también contribuir al SOP y a sus asociaciones metabólicas.

Los oxidantes son elementos químicos que tienden a ganar electrones perdiendo su carga positiva. Entre ellos se incluyen productos del metabolismo celular normal, como son las especies reactivas de oxígeno (ROS) que derivan del oxígeno molecular (ion oxígeno, radicales libres (RL) y peróxidos) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS) que derivan del ácido nítrico (136, 137). A concentraciones moderadas, dichas sustancias participan en procesos fisiológicos, como la defensa contra agentes infecciosos y sistemas de señalización celular. Sin embargo, cuando se presentan en exceso, los oxidantes dañan el ADN, los lípidos y las proteínas, alterando su función.

En general, en el EO, existen diversas vías y caminos para la formación de especies reactivas capaces de oxidar lípidos, proteínas y ADN, en los que participan numerosas sustancias con capacidad antioxidante. La Figura 2 muestra un esquema muy representativo de cómo se forman dichas sustancias oxidantes. El anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) puede ser producido por nicotinamida adenina dinucleótido oxidasas (NOX), xantina oxidasa y ciclooxigenasa (COX), entre otras. Este anión superóxido es dismutado por la superóxido dismutasa (SOD) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), éste a su vez se escinde por la enzima glutatión reductasa (GRd). Algunos metales de transición pueden romper el H_2O_2 dando lugar al radical reactivo hidroxilo ($OH^{\cdot}$). Este último radical puede sustraer un electrón de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS), ADN o proteínas. Por otra parte, la forma reducida de la vitamina E puede disminuir los lípidos oxidados, la cual es regenerada por la vitamina C, o por la enzima glutatión peroxidasa (GPx) usando glutatión reducido (GSH) como dador de electrones. El óxido nítrico (NO), el cual es producido por la óxido nítrico sintasa (NOS), y el $O_2^{\cdot-}$ pueden reaccionar para producir el anión peroxinitrito

(ONOO^-), que es un potente agente oxidante de macromoléculas. La enzima paroxinasa I (PON-I) previene la formación de LDL oxidadas, y la homocisteína, además de comportarse como marcador de RCV, produce EO por disminuir la transcripción, traducción y la actividad catalítica de la enzima GPx y SOD, y por inducir a la NOS (138).

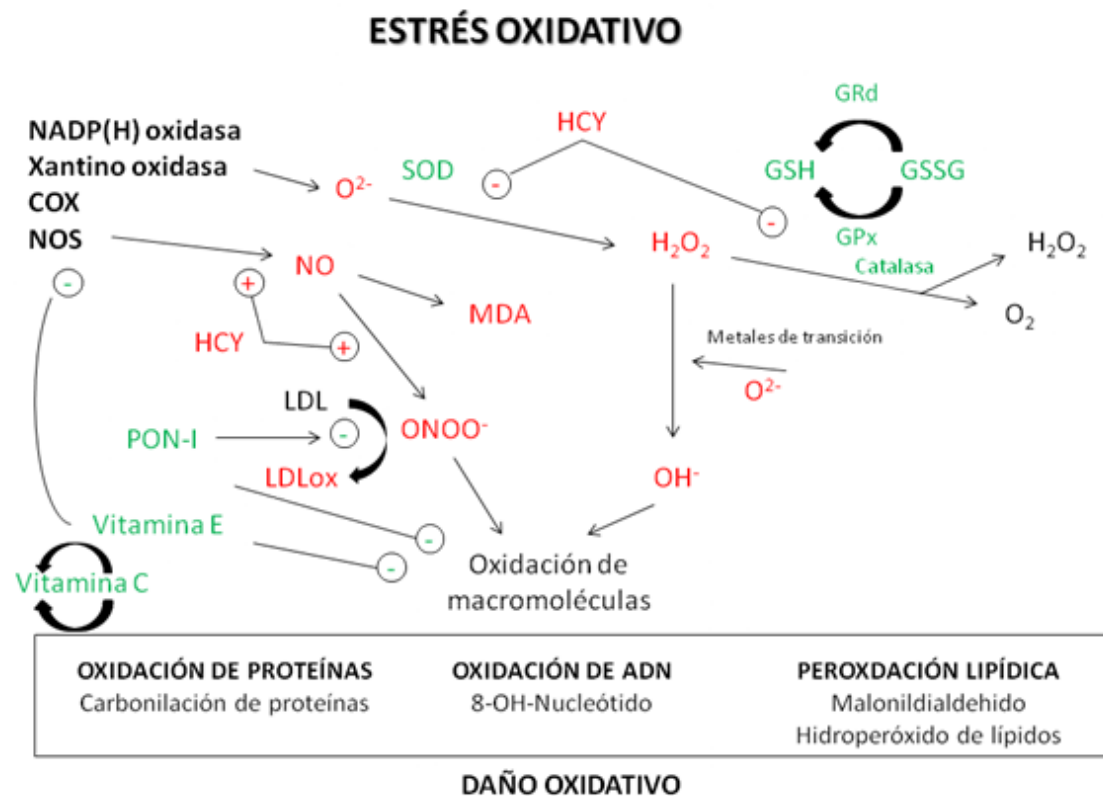


Figura 2. Esquema representativo de los diferentes caminos y vías que contribuyen a la oxidación de macromoléculas en SOP. COX: ciclooxygenasa. GPx: glutatión peroxidasa. Grd: glutatión reductasa. GSH: glutatión reducido. GSSG: glutatión disulfuro. HCY: homocisteína. H_2O_2 : peróxido de hidrógeno. LDL: lipoproteína de alta densidad. LDLox: lipoproteínas de alta densidad oxidadas MDA: malonildialdehído. NO : óxido nítrico. NOS: óxido nítrico sintasa. $\text{OH}^{\cdot}$: reactivo hidroxilo. ONOO^- : peroxinitrilo. O_2 : oxígeno. $\text{O}_2^{\cdot-}$: anión superóxido. PON-I: paroxidasa I. SOD: superóxido dismutasa. Adaptado de Murri M. et al. (2013) (138).

Existen mecanismos fisiológicos de defensa contra las sustancias oxidantes, los llamados antioxidantes, capaces de bloquear la acción y suprimir la formación de aquellas. Estas sustancias protectoras pueden ser enzimas, como la SOD, catalasa (CAT) y GPx, macromoléculas no enzimáticas, como la albúmina y ferritina, y pequeñas moléculas como el ácido ascórbico, el glutatión y la vitamina E, entre otros (138).

En general, las sustancias químicas que se utilizan para evaluar el estado oxidativo podrían ser divididas en: componentes químicos modificados por RL, enzimas o productos químicos antioxidantes, ROS, y factores que regulan la producción de ROS (139, 140).

1.2.1 Implicaciones del estrés oxidativo en el síndrome de ovario poliquístico

Numerosos estudios han mostrado que el nivel de EO se encuentra significativamente elevado en mujeres con SOP comparados con los de pacientes sanas, cuando dicho EO es evaluado por distintos marcadores de oxidación, como son los marcadores de oxidación de lípidos [malonildialdehído (MDA), LDL oxidadas], de proteínas (carbonilación de proteínas, tioles) y del ADN (8-OH-desoxiguanosina), entre otros (141). Aunque el EO es considerado como un inductor potencial de la patogenia del SOP, está aún indeterminado si los niveles anormales de EO derivan del propio síndrome o si dichos niveles potencian las numerosas complicaciones que sufren estas mujeres.

La RI estimula el EO porque la hiperglucemia y los AGL conllevan a la producción de ROS (142). Cuando este exceso de glucosa y AGL son absorbidos por la célula, un gran número de metabolitos reducidos, tales como el ácido pirúvico y el acetil coenzima A, son transferidos a la mitocondria para su oxidación, lo que conlleva al aumento de la actividad de la cadena transportadora de electrones, resultando finalmente en el incremento de la producción de ROS. Por lo tanto, el EO se produciría si enzimas reductoras, como la SOD, peroxidasa y CAT, fallaran al captar dicho exceso de ROS en la célula (143, 144). En un modelo animal de RI inducida por exceso de fructosa,

el EO se observó por el incremento de proteínas carboniladas, ácidos grasos no esterificados, MDA, O_2^- y GSH, entre otros (145, 146). Como ya se sabe, la RI se acompaña frecuentemente con obesidad y existe en más de la mitad de los obesos (12), por lo que la RI es considerada como uno de los mecanismos por los que la obesidad contribuye al EO.

De manera recíproca, se ha demostrado que el EO juega un papel crucial en la patogénesis de la RI. En múltiples estudios se reportó que la exposición al EO inhibe la ruta metabólica inducida por la insulina en el miotubo L6 y en los modelos de adipocitos 3T3-L1 (147, 148). Acorde con la investigación de *Bloch-Damti et al. (2005)*, la insulina estimulada por la absorción de glucosa, la síntesis de glucógeno y la síntesis proteica, serían inhibidas tras la exposición de 50 μ M de H_2O_2 durante 2 horas (142). El radical del oxígeno juega un papel importante en la regulación de la glucosa (149). Por ejemplo, el H_2O_2 podría regular la liberación de insulina por parte de las células β del páncreas estimulada por glucosa, y participar en la regulación de la vía de señalización (150). En general, el sustrato del receptor de insulina (IRS) es la clave de la patogénesis de la IR (151). Ante un incremento de IR, varias proteínas quinasas se activan para inducir la activación de serina/treonina del IRS e inhiben la fosforilación normal de la tirosina de dicho sustrato, reduciendo así la capacidad de éste para combinarse con el receptor de insulina. La supresión del IRS activa la cascada del fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3K); y finalmente la señal de la insulina al efector vía receptor-IRS-PI3K queda interrumpida (152).

Por lo tanto, el EO está íntimamente relacionado con la RI y posiblemente sea un importante inductor de ésta en el SOP a través del defecto del post-receptor de la insulina. Además, estudios con antioxidantes, como la vitamina E, ácido α -lipoico, y N-acetilcisteína indican un impacto beneficioso sobre la sensibilidad a la insulina y ofrecen la posibilidad de nuevos tratamientos para la RI en este tipo de mujeres (153). Así, la RI está implicada ciertamente en la fisiología del SOP, pero también puede ser un factor no inicial causado por el EO. Además, se aprecian incrementos de EO en mujeres con SOP sin RI ni obesidad (154).

El receptor de la insulina y las proteínas del IRS son críticas para la transducción de la señal mediada por la INS y el funcionamiento normal de la

INS, por lo que cualquier alteración en estos elementos puede dar lugar a una situación de resistencia insulínica. Por ello, los genes asociados a la RI han sido sugeridos como candidatos idóneos para la susceptibilidad del SOP, y muchos estudios se han dirigido a estudiar el papel de polimorfismos genéticos del IRS (155).

Por todo esto, las modalidades de tratamiento atenuantes de RI serían beneficiosas no sólo para el síndrome metabólico, sino también para el propio SOP y para las futuras consecuencias a largo plazo para la salud, como la DMT2 y las ECV (156).

Acorde con la reciente guía de la American Association of Clinical Endocrinologists, American College of Endocrinology, Androgen Excess y la Sociedad del SOP, un test de tolerancia oral de glucosa debería realizarse cada dos años en pacientes con SOP basándose en la historia familiar de DMT2 y un IMC $>30 \text{ Kg/m}^2$, mientras que dicho test debería llevarse a cabo de forma anual en pacientes con SOP e intolerancia a la GLU (157).

No podemos olvidar que la insulina es una hormona aterogénica y la hiperinsulinemia contribuye al desarrollo de diabetes, hipertensión, disfunción endotelial (DE) y dislipemia que se acompaña de niveles elevados de LDL, TG y niveles disminuidos de HDL en el SOP (158-160). Además, dicho exceso de insulina acelera la producción ovárica de andrógenos. Como ya se ha mencionado, el SOP está asociado al incremento del RCV, y la RI parece ser un pilar importante de dicho riesgo, independiente de la obesidad (161). Por otro lado, la DE es otro factor crucial en el desarrollo de ECV, el cual es causado por un desequilibrio entre la producción y la biodisponibilidad de factores de relajación y factores de constricción dependientes del endotelio. La DE contribuye al incremento del riesgo de aterosclerosis y ECV en pacientes con SOP afectados de RI (162). El NO, regulador de la homeostasis vascular y generado por las células del endotelio, se forma a partir de su precursor, la L-arginina, a través de la acción enzimática de la NOS. La disminución en la biodisponibilidad del sustrato L-arginina o de los cofactores resulta en el

desacople de la NOS y conlleva al incremento del O^{2-} intracelular (163). A su vez, las células endoteliales participan en la producción de ROS y RSN en la mitocondria (164). La evidencia ha demostrado que la señalización redox, en respuesta a la alta producción de ROS regulada por enzimas específicas, y la inactivación de NO dependiente de ROS, es un mecanismo crítico en la patogénesis de severos desordenes CV (165).

Las fuentes potenciales de RL en el SOP incluyen el tejido adiposo, oxidación de AG, hiperglucemia y fuente enzimática (NOX) desde las células mononucleares. Existen diferentes isoformas de NOX, como las del endotelio, fibroblastos, músculo liso vascular y células miocárdicas, que contribuyen a la producción de ROS en el SOP. Estas formas enzimáticas cardiovasculares son la mayor fuente de ROS y se asocian fuertemente con la aterosclerosis y la hipertensión (166).

Por otra parte, el EO, incrementado en el SOP, ha sido descubierto por jugar un papel en la patogénesis del cáncer (167-169). Los RL podrían causar cambios genéticos al atacar al ADN, produciendo en él daños, tales como rupturas en la hebra de ADN, mutaciones puntuales y entrecruzamientos aberrantes del ADN, entre otros y (170). Como resultado, las mutaciones en los protooncogenes y genes supresores del tumor probablemente provoquen la proliferación de células fuera de control, cuando los mecanismos de reparación del ADN se hayan interrumpido (171, 172). Por otro lado, el EO podría causar también cambios epigenéticos por la metilación del ADN, silenciando así genes supresores del tumor (173, 174). Por lo tanto, el EO podría ser uno de los mayores inductores del incremento del riesgo de cáncer ginecológicos en pacientes con SOP.

Recientemente se ha demostrado que el incremento en los niveles de ROS en las células de la granulosa de mujeres con SOP induce considerablemente la apoptosis celular, lo que afecta a la calidad de los ovocitos y reduce el número de resultados positivos de embarazo en estas mujeres sometidas a un tratamiento de fecundación in vitro (175).

Teniendo todo esto en cuenta, se puede concluir que varias situaciones que acompañan al SOP, incluyendo el HA, adiposidad abdominal, obesidad y RI,

pueden contribuir al desarrollo de un EO local y sistémico, el cual al mismo tiempo puede empeorar recíprocamente todas éstas anormalidades metabólicas (92,95), y todo ello en su conjunto favorecer las complicaciones cardiovasculares. Figura 3.

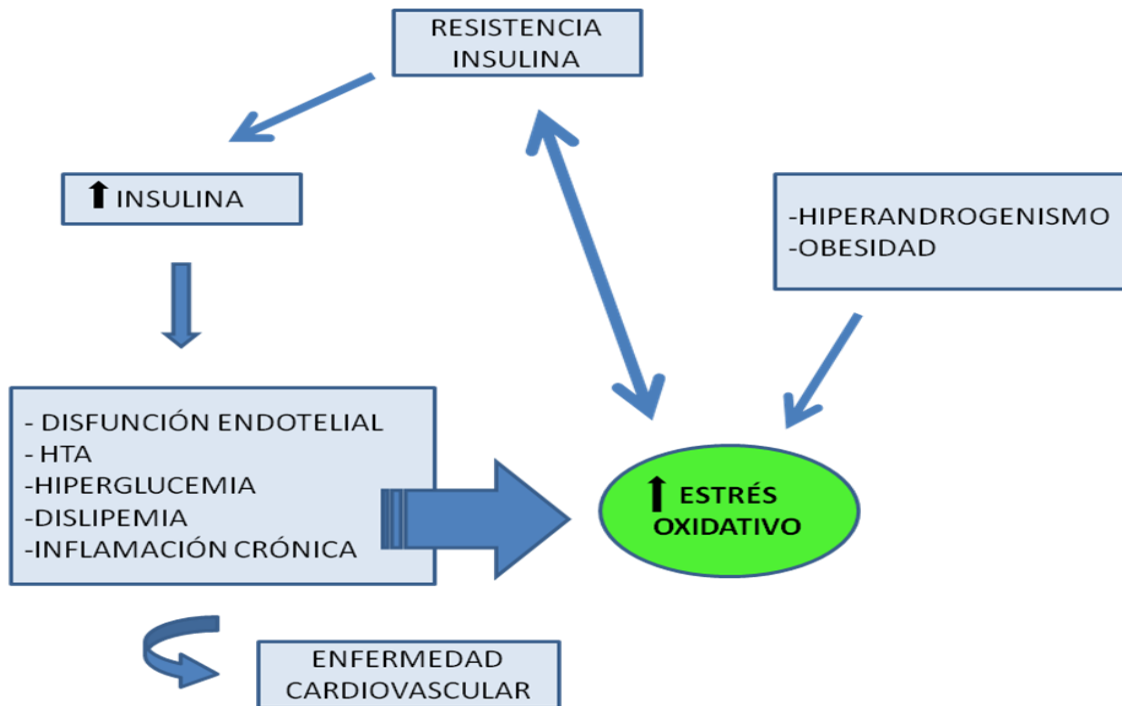


Figura 3. Esquema representativo de la relación entre las diferentes alteraciones metabólicas y el EO que coexisten en el SOP.

Es evidente que el EO regula varios mecanismos celulares en el SOP. El incremento de factores inflamatorios y biomarcadores de EO en pacientes con SOP puede predecir el desarrollo de ECV y de DMT2. Mejorando nuestro entendimiento sobre la regulación de dicho EO, el papel crítico de los ROS y sus biomarcadores en pacientes con SOP, debería conducir a nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento de las ECV y metabólicas inducidas por este síndrome. Además, es posible que efectos beneficiosos de los antioxidantes de la dieta o terapéuticos tengan una relevancia clínica significativa en el SOP.

1.2.2 Agentes implicados en el mantenimiento del estatus oxidativo sistémico

1.2.2.1 Antioxidantes endógenos

I. Albúmina

La albúmina es una proteína de 585 aminoácidos (Aa) con un peso molecular es 66 kD. Contribuye del 75 al 80% de la presión oncótica intravascular y corresponde al 30% de la síntesis hepática proteica a una razón de 9 a 12 g/día. Entre sus funciones, las propiedades antioxidantes parecen ser de suma importancia, ya que pueden estar implicadas en los posibles efectos beneficiosos que se han observado en el cuidado crítico y los ajustes hepatológicos. Las funciones antioxidantes específicas de la proteína están estrechamente relacionadas con su estructura. De hecho, se deben a sus múltiples capacidades de unión al ligando y a las propiedades de captura de RL (176). La molécula puede sufrir diversos cambios estructurales que modifican su conformación y por lo tanto sus propiedades de unión y estado redox. Por lo tanto, dicha proteína ejerce actividad antioxidante al unirse a los metales con actividad redox, en particular a los iones cobre, y limitar la producción de RL catalizados por los metales (177).

Estudios realizados en pacientes críticos, sépticos y con fallo orgánico, asignan un rol benéfico a la albúmina, en virtud de sus potenciales efectos antiinflamatorios y antioxidantes (178).

II. Bilirrubina

La bilirrubina (BIL), aparte de ser un producto final del catabolismo del grupo hemo, se ha considerado como un potente agente antioxidante y

antiinflamatorio, y como tal puede evitar la oxidación de lípidos y otras sustancias de manera eficiente. Se ha sugerido que es uno de los principales mecanismos de defensa presentes en el suero contra el EO (179).

La biliverdina formada en la cadena catabólica del grupo hemo se transforma por la acción de la enzima biliverdina reductasa (BVR) en BIL, una sustancia insoluble en agua, que necesita albúmina para su transporte y para poder excretarse conjugarla con el ácido glucurónico por la enzima UDP glucuronil transferasa 1, la cual la hace hidrosoluble y de esa manera puede ser excretada en la bilis e intestino delgado.

La BIL puede interactuar con RL de oxígeno, produciéndose la oxidación de la misma y convirtiéndose nuevamente en biliverdina gracias a la BVR. La BIL detoxifica hasta 10.000 veces el exceso de oxidantes. Teniendo en cuenta que la BIL es soluble en lípidos, puede proteger las células contra la peroxidación lipídica (180).

En los últimos años, se ha encontrado que la BIL tiene variedad de acciones biológicas, tales como antiinflamatorias, antioxidantes, inmunomoduladoras, actividades citoprotectoras y neuroprotectoras.

III. Ácido Úrico

El ácido úrico (AU) es el producto final del catabolismo de las purinas en humanos producido mediante la acción enzimática de la xantina óxidorreductasa (XOR). Existe una extensa literatura científica *in vitro* indicando que el AU posee una fuerte actividad antioxidante (181, 182). Varios mecanismos que han sido descritos pueden explicar, en gran medida, su actividad antioxidante en el sistema cardiovascular (183, 184). El estudio publicado por *Hink et al. (2002)* mostró que tanto *in vitro* como en animales, el AU (a concentraciones cercanas a los niveles fisiológicos presentes en humanos), previene la inactivación de SOD extracelular y SOD citosólica por el H₂O₂ mediante la reacción de peroxidasa que poseen las isoformas de SOD.

Especialmente, en modelos animales se observó que al inhibir la uricasa, el aumento en los niveles de AU se relacionaba directamente con una mayor actividad de SOD extracelular y SOD citosólica en ratas deficientes en apolipoproteína E (apoE), pero no en ratones silvestres (185).

1.2.2.2 Antioxidantes exógenos: vitaminas A y E

La vitamina A (VitA) y la vitamina E (VitE) pertenecen al grupo de vitaminas liposolubles con actividad antioxidante que ejercen numerosas funciones en el organismo.

La VitA, retinol o antixeroftálmica, se requiere en varios procesos biológicos, tales como la visión, el desarrollo del sistema inmunitario, la formación y mantenimiento de las células epiteliales (de la piel y las mucosas), el desarrollo embrionario y el crecimiento. La VitA ayuda a la formación y mantenimiento de dientes sanos y tejidos blandos y óseos, de las membranas mucosas y de la piel. Es necesaria para el crecimiento y desarrollo de los huesos y desempeña un papel importante en el desarrollo de una buena visión, especialmente ante la luz tenue. También ayuda a formar tejidos nerviosos, evita afecciones del aparato respiratorio y el envejecimiento prematuro.

La VitA se ha mostrado eficaz para impedir la peroxidación no enzimática en mitocondrias de cerebro de rata (186) y el ácido retinoico inhibe la formación de colágeno en fibroblastos de dermis humana (187). Numerosos estudios han evidenciado como el efecto antioxidante de la VitA podría resultar beneficioso para tratar enfermedades como la displasia broncopulmonar en niños (188) y prevenir tuberculosis en individuos de alto riesgo (189).

La VitE agrupa diferentes compuestos, dentro de los cuales se incluyen los tocoferoles y los tocotrienoles. El más importante en la especie humana es el RRR- α -tocoferol. Una de las funciones más importantes atribuidas a la VitE es su acción antioxidante. No obstante, se han observado otras no relacionadas con esta acción, entre las cuales se encuentran sus efectos sobre la

proliferación celular y la acción fagocítica en el sistema inmune, que a su vez se relacionan con el efecto de esta vitamina como mensajero del estado oxidativo celular. Paralelamente, existen evidencias de su relación con la apoptosis.

La forma biológicamente activa de la VitE es el D-alfa tocoferol, cuyo hidroxilo fenólico en el anillo de cromano es responsable de la reducción antioxidante. La actividad vitamínica E es una de las primeras barreras de la peroxidación de los PUFAS. Los fosfolípidos de las membranas mitocondrial, del retículo endoplasmático y plasmática poseen afinidades para el alfa-tocoferol, por lo que está muy concentrado en estos sitios. Los tocoferoles actúan interrumpiendo reacciones de cadena con RL como resultado de su capacidad de transferir el hidrógeno fenólico a un radical peroxilo libre, quedando, a la vez, en la forma de radical libre fenoxi o fenoxilo, en reacciones intermedias no reversibles que presuponen la transformación de la vitamina hasta su producto final inocuo (190).

Por otra parte, aunque ya es conocido que la apropiación de VitE está en franca correlación con la disponibilidad para digerir y absorber lípidos debido a su naturaleza hidrofóbica (se ha comprobado la deficiencia de tocoferoles en procesos morbosos como la colestasis hepática y la fibrosis quística o en la resección intestinal), trabajos recientes demuestran la estrecha relación del incremento del requerimiento de la vitamina (y del SE) con la ingestión de ácidos grasos insaturados, el envejecimiento (191) y el padecimiento de patologías crónico degenerativas como la aterosclerosis (192), el Alzheimer (193) o el cáncer de próstata (191).

1.2.2.3 Capacidad Antioxidante Total

La Capacidad Antioxidante Total (TAC) es una herramienta muy útil para evaluar el estado redox de una muestra, ya que valora la habilidad de los compuestos antioxidantes (donantes de un hidrógeno o un electrón) presentes en el fluido o célula, para reducir las especies oxidantes introducidas (iniciador)

en el sistema de ensayo (194). Tal y cómo se ha comentado anteriormente, la participación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en el estado del SOP está fuertemente consolidado. En el origen de esta fisiopatología hay una disfunción mitocondrial con el subsiguiente desequilibrio entre la síntesis de dichas especies reactivas y la síntesis de los sistemas con capacidad antioxidante, resultando un EO.

Durante muchas décadas los investigadores estudiaron numerosos marcadores de defensa antioxidante, como la mediada de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GRd, GPx, ceruloplasmina, entre otras). A principios de los años noventa, *Miller et al. (1993)* describieron un nuevo test diseñado para mediar la TAC (195). La mayor ventaja de dicho test es la medida de la capacidad de todos los antioxidantes de la muestra biológica y no solo la capacidad de un único componente. Además, la TAC de la célula es principalmente atribuible al sistema enzimático, mientras que la del plasma es mayormente explicada por antioxidantes de bajo peso molecular de origen dietético. Estos compuestos sacrificables, consumidos rápidamente durante la eliminación de ROS, necesitan ser generados y/o remplazados por nuestros compuestos derivados de la dieta. De este modo la actividad antioxidante del plasma se modula bien por sobrecarga radical o por la ingesta de antioxidantes dietéticos, y por lo tanto puede considerarse más representativa del equilibrio in vivo entre especies oxidantes y compuestos antioxidantes que la concentración de antioxidantes únicos. Por lo tanto, la TAC es la medida de los moles de un determinado radical libre eliminado por una solución de ensayo, independientemente de la actividad de cualquier antioxidante presente en la muestra (196). El orden de la contribución de los diferentes antioxidantes a la TAC es la siguiente: AU > ácido ascórbico > proteínas > BIL > alfa-tocoferol, con el AU contribuyendo en torno al 60% (197).

Los métodos que han sido desarrollados para la medida de la actividad antioxidante de fluidos son todos esencialmente métodos de inhibición: se genera un radical libre, hay un punto final por el que se detecta la presencia del radical, y la actividad antioxidante de la muestra añadida inhibe el punto final eliminando el radical libre.

Se han descrito valores disminuidos de TAC en diversas enfermedades como enfermedad de Wilson (198), hipertensión (199), enfermedad motoneuronal (200), obesidad (201), apendicitis (202), galactosemia (203), infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (204), síndrome de Down (205) y pancreatitis crónica (206). En cuanto a enfermedades ginecológicas se ha reportado niveles bajos en casos de pre-eclampsia (207).

La evaluación de la TAC, usado con otros biomarcadores de EO y defensas antioxidantes, constituye el primer paso en la búsqueda de un estado corporal saludable. Además, aquella puede ser empleada para valorar, individualizar y dar seguimiento a la efectividad de un tratamiento antioxidante y no sobremedicar o dar tratamientos insuficientes al paciente.

1.2.2.4 Aspectos generales de los metales y su relación con el estrés oxidativo

Muchos de los metales con actividad redox que se encuentran en el organismo son esenciales en la mayoría de las reacciones biológicas como la síntesis de ADN, ARN y proteínas, y actúan como cofactores de numerosas enzimas. La deficiencia de muchos de ellos puede provocar alteraciones en las funciones de muchos de los órganos. Sin embargo, debido a sus propiedades redox, la acumulación de estos metales por encima de la capacidad del complemento celular de metaloproteínas (catalítica, transporte y almacenamiento) puede ser citotóxica, como consecuencia de su participación en una gran variedad de disturbios celulares caracterizado por el EO debido a un aumento de la producción de EROs (208).

Los diferentes metales pesados (MP) y elementos traza (ET) pueden tener distinto comportamiento referente al EO, de manera que pueden actuar como agentes con actividad antioxidante conocida por ser cofactores o coenzimas de enzimas antioxidantes, actuar como agentes oxidantes por resultar tóxicos a cualquier nivel de concentración, en el organismo bien por su acción oxidante o bien por otros mecanismos, o también algunos metales han demostrado que

pueden actuar con ambos comportamientos pudiendo tener actividad tanto oxidante como antioxidante.

Los niveles en suero de MP y ET pueden cambiar en pacientes con SOP (209). En la literatura se describe como estos niveles se asocian también a cambios moderados en los niveles de las hormonas reproductivas (210).

Los ET esenciales, también denominados micronutrientes u oligoelementos, tienen cuatro funciones principales: actuar como estabilizadores, como elementos de estructura, como elementos esenciales para la función hormonal y como cofactores de enzimas (211). De todos los ET, se describen a continuación aquellos implicados de alguna manera en el EO.

I. Hierro

El hierro (Fe) es un metal de transición esencial para la vida puesto que participa prácticamente en todos los procesos oxidación-reducción. Está presente en numerosas enzimas involucradas en el mantenimiento de la integridad celular, tales como las catalasas, peroxidasas y oxigenasas. El Fe participa en la formación de RL mediante la producción del radical $\text{OH}^\cdot$ que posteriormente puede iniciar la oxidación de las diferentes macromoléculas. Todo esto hace que el Fe desempeñe una función clave en la toxicidad mediada por metales, actuando tanto como oxidante (catalizando la producción de EROs) como antioxidante (formando parte de la CAT). Las reservas de Fe del cuerpo y los niveles de ferritina se asocian con DMT2, obesidad y Smet en la población general (212-214) y en mujeres con SOP (215, 216).

II. Cobre

El Cobre (Cu) es un metal esencial necesario para el funcionamiento del organismo dotado de un alto potencial redox. Existen enzimas dependientes de

Cu, como la citocromo C oxidasa y la SOD. Se sabe que el Cu, por encima de las necesidades celulares, participa en la producción de RL y en la oxidación directa de macromoléculas (217). En dos estudios se describen concentraciones elevadas de Cu en el suero de mujeres con SOP (209, 218, 219) y en otro, además de sugerir también niveles elevados de este metal, se demuestra la relación del Cu con marcadores de riesgo de ECV (espesor de la íntima-media de la carótida y dilatación mediada por flujo de la arteria braquial), sugiriendo así que el Cu puede ser un factor contribuyente a la ateriogénesis (220).

III. Selenio

El selenio (SE) es un ET esencial con interés nutricional y clínico. Es el menos abundante y potencialmente el más tóxico de los elementos esenciales. La función biológica del SE se ejerce a través de las selenoproteínas (GPx la más importante), las cuales tienen una importante propiedad antioxidante en el organismo. Recientemente, la evidencia ha demostrado que el SE puede afectar a varias complicaciones reproductivas y obstétricas incluyendo la infertilidad masculina y femenina (221). Los niveles de dicho ET se encontrarían disminuidos en mujeres con SOP (222). Se piensa que la suplementación con SE supone efectos beneficiosos en cuanto a las características reproductivas y los biomarcadores de oxidación e inflamación. Este hecho se atribuye al efecto inhibitorio del SE sobre el aumento de citoquinas proinflamatorias y ROS y RNS. *Valenta et al. (2011)* demostraron que la administración de una dosis elevada de suplemento de SE (1000 µg en el día 1 y 500 µg/día en los días posteriores) durante 14 días decrecía los niveles de Proteína C Reactiva (PCR) en pacientes con sepsis (223). En otro estudio reciente, el suplemento con SE durante 8 semanas entre mujeres con SOP, tuvo efectos beneficiosos en su reproducción y disminuyó los niveles de DHEAS, PCR y MDA (134). También recientemente, la suplementación simultánea de SE y probióticos durante 12 semanas en mujeres con SOP ha

demostrado efectos beneficiosos sobre la salud mental, hirsutismo y niveles plasmáticos de T_T, PCR, TAC, GSH y MDA (224).

IV. Zinc

El Zinc (Zn) es un metal esencial para el organismo que actúa como un antioxidante por su implicación en la protección de grupos sulfidrilos de proteínas y enzimas contra el ataque de los RL, o la oxidación, y reduciendo la formación de OH⁻ a partir de H₂O₂ a través de la prevención de la formación de RL o en otras palabras, como antagonista de la actividad redox de metales de transición, tales como el Fe y el Cu. Además, el Zn es cofactor de la SOD. La literatura muestra controversia frente al estado del Zn en el SOP; existen estudios que revelan niveles más bajos de Zn en mujeres con SOP, incluso una correlación con aquellas que presentan RI (218, 219, 225). Sin embargo otro estudio revela concentraciones más altas en SOP (209).

En definitiva, la excesiva producción de ROS es una característica común en pacientes con SOP. Varias pruebas de evidencia sugieren que los ET pueden estar ligados al SOP, así como implicados en su etiología.

1.2.3 Productos del estrés oxidativo: isoprostanos

Los isoprostanos (ISOP) son un grupo de compuestos similares a las Prostaglandinas (PGs) que se producen mediante una peroxidación no enzimática del ácido araquidónico (AA) inducida por RL. Desde su descubrimiento en el año 1990 por *Roberts et al.* (226), han sido numerosos los estudios que sugieren el nivel de los F₂-isoprostanos (F₂-ISOP) como un buen marcador del estado oxidativo *in vivo*. Además, debido a su semejanza estructural con las PGs, se ha postulado que estos compuestos podrían tener por si solos actividad biológica.

El mecanismo mayoritario de formación de (F_2 -ISOP) consiste en la substracción de un átomo de hidrógeno y la posterior adicción del oxígeno molecular al AA para formar un radical peroxilo. Este radical experimenta una ciclación 5-exo y una segunda molécula de oxígeno se añade a dicha estructura, formado así el compuesto PGG_2 . Estos bicicloendoperoxidos intermedios inestables son reducidos a F_2 -ISOP. Basándose en este mecanismo de formación, cuatro F_2 -ISOP, cada uno de los cuales se compone de ocho diastómeros racémicos, un total de 64 compuestos, son generados (227). Las cuatro clases de regioisómeros son nombradas acorde al número del carbono sobre el que se sitúa el hidrógeno que es atacado. Este sistema de nomenclatura para los ISOP ha sido aprobado por el Comité de Nomenclatura de Eicosanoides, el cual está respaldado por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica (JCBN) de la Unión Internacional de Química Pura aplicada (IUPAC) (228). Un sistema de nomenclatura alternativo ha sido propuesto por *FitzGerald et al.* (1997) en el cual la abreviación iP es usada para isoprostano, y los regioisómeros se indican como III-IV (229). Además de F_2 -ISOP, varias clases de ISOP, que difieren en los grupos funcionales, han sido descubiertos; es el caso de los D_2/E_2 -ISOP (230). También se ha demostrado que la formación de una pequeña cantidad de ISOP es dependiente de la enzima COX al convertir el AA en PGH_2 (231). Este hecho cuestiona si la medida de 8-isoPGF $_{2\alpha}$ puede que no sea siempre un marcador específico y de confianza de la peroxidación lipídica no enzimática. Sin embargo, se ha demostrado que la cantidad de tromboxanos (TX) formados por la COX en las plaquetas activadas es 100 veces mayor que la de F_2 -ISOP; además los niveles de F_2 -ISOP medidos en individuos sanos tras el tratamiento con inhibidores de la COX no se modificaron (226, 232).

A diferencia de las PGs, derivadas de la acción de la COX, los ISOP se forman inicialmente a partir del AA in situ sobre los lípidos. Los ISOP pueden ser liberados de la estructura fosfolipídica como ácidos libres por la acción de la fosfolipasa. Se ha demostrado también que el factor acetilhidrolasa activador de plaquetas libera F_2 -ISOP de los fosfolípidos (233). Así, podemos encontrar F_2 -ISOP libres circulando en el plasma, que se filtran en el riñón y aparecen en la orina (234). También pueden metabolizarse en el hígado generando una

variedad de metabolitos (235). En humanos, los dos metabolitos mayoritarios del 15-F_{2t}-ISOP (también referido como 8-iso PGF_{2α} o iPF_{2α}-III) son el 2,3-dinor-15- F₂-ISOP y 2,3-dinor-5,6-dihidro-15- F_{2t}-ISOP (236, 237). Por lo tanto, F₂-ISOP son moléculas estables que pueden ser detectados tanto como compuestos esterificados en todos los tejidos del cuerpo, como compuestos libres en fluidos biológicos, en los que se incluyen plasma, orina, bilis, jugo gástrico, condensado de aire exhalado, líquido sinovial, líquido cerebroespinal, líquido amniótico y saliva. El nivel plasmático de F₂-ISOP (8-iso PGF_{2α}) basal en pacientes sanos es de 25 pg/mL (rango 15-50 pg/mL), lo cual supone diez veces más alto que el nivel de PGF_{2α} formadas a partir de la COX y algo menos que la cantidad de los metabolitos de los F₂-ISOP. En dichos pacientes, la concentración de 8-iso PGF_{2α} en orina es 30-40 veces más alta que la concentración plasmática (230, 238).

En cuanto a su actividad biológica, los ISOP ejercen varias funciones. Se ha demostrado su efecto vasoconstrictor en las arterias pulmonares de conejos y ratas y también sobre las arterias coronarias de cerdos y vacas (239-241). También se vio como los F₂-ISOP ejercían contracción sobre la musculatura de las venas renales de ratas, la cual se acompañaba con reducción del filtrado glomerular y del flujo sanguíneo. Sin embargo, estos cambios no causaron alteraciones en la presión arterial, sugiriendo el efecto selectivo de los F₂-ISOP sobre la vasculatura renal (242). En la misma dirección, se observó obstrucción del flujo de aire en cerdos de Guinea a los que se administró F₂-ISOP (243). También se conoce como estos compuestos ejercen dicho efecto vasoconstrictor sobre arterias cerebrales y vasos de la retina (244, 245). Adicionalmente, estas moléculas pueden modular la actividad plaquetar. F₂-ISOP en presencia de dosis subumbrales de agonistas plaquetarios inducen la agregación plaquetaria dosis-dependiente. La habilidad de incrementar la agregación plaquetaria puede tener lugar en los sitios donde el incremento de la activación y formación de F₂-ISOP coinciden. Por otro lado, se ha observado que F₂-ISOP indirectamente incrementa la adhesión plaquetar mediante la reducción de la actividad anti-adhesiva y anti-agregación del NO (246, 247). Recientemente, *Bauer et al. (2014)* publicaron una revisión respecto a los ISOP en el sistema cardiovascular. Además de efecto plaquetar, F₂-ISOP pueden

inhibir la angiogénesis y promover la aterosclerosis al estimular la adhesión de monocitos y neutrófilos sobre las células endoteliales. Todos estos efectos son inhibidos por antagonistas del receptor de TX, lo que sugiere que los F₂-ISOP ejercen su efecto a través de dicho receptor (248).

Por otra parte, se sabe que F₂-ISOP pueden ejercer su acción biológica a través de los receptores de las PG. Interesantemente, la actividad de dichas moléculas puede variar dependiendo del receptor a través del cual actúen (249-251). Esto es, mientras F₂-ISOP se comportan como vasoconstrictores a través de los receptores de TX, pueden actuar como vasodilatadores a través de los receptores de las PG. Estos efectos opuestos han sido bien estudiados en el pulmón (252).

Los F₂-ISOP han sido también reportados por producir hiperalgesia, un incremento de la sensibilidad al dolor. Se demostró que estas moléculas, cuando se inyectan en la pata trasera de las ratas, reducen significativamente el umbral de retirada en respuesta a los estímulos mecánicos y termales (248). Además, F₂-ISOP aumentaron el disparo de nociceptores C en ratas anestesiadas con pentobarbital (253).

El exceso de producción de estos productos de oxidación lipídica puede dar como resultado una condición que frecuentemente es conocida como EO, lo cual es supuesto por ser la mayor causa de desarrollo de varias enfermedades, incluyendo cáncer, ECV y neurológicas, entre otras. Durante las últimas décadas numerosos estudios han revelado propiedades favorables de los ISOP, demostrando así que el nivel de F₂-ISOP es un biomarcador de confianza de la peroxidación lipídica endógena, y por lo tanto, una herramienta útil que refleja el daño oxidativo *in vivo* (254-256). Kadiiska *et al.* (2010) encontraron niveles plasmáticos de F₂-ISOP incrementados en ratas a las que se había administrado el oxidante tetracloruro de carbono (257). También se hallaron niveles aumentados de F₂-ISOP y de su metabolito, 2,3-dinor-15-F₂-ISOP, en un estudio con mujeres recién diagnosticadas de cáncer de mama después de ser tratadas con el quimioterápico doxorubicina, el cual genera radicales hidroxilos (258). Son numerosas las revisiones en las que se han

descrito a los F₂-ISOP como biomarcadores de EO en diferentes situaciones patológicas.

Con respecto a las ECV, se sabe que la isquemia/reperfusión (I/R) incita la formación de ROS. Se ha demostrado que los niveles de F₂-ISOP aumentan en pacientes post-I/R (259). Dichos niveles aumentan en individuos con isquemia crónica de miembros inferiores, accidente cerebrovascular isquémico y tras la ruptura de un aneurisma (260, 261). Las lesiones de I/R son también una preocupación importante en ciertos campos quirúrgicos. Múltiples estudios han mostrado incrementos de F₂-ISOP durante la cirugía de revascularización coronaria y la cirugía de derivación cardiopulmonar (262, 263). En el seguimiento del hallazgo de que la peroxidación lipídica aumenta durante dichas cirugías, se han monitorizado tratamientos que podrían reducir los niveles de EO inducidos por estos procedimientos. Por ejemplo, en un estudio de 20 pacientes sometidos a una revascularización coronaria, *Berg et al. (2013)* mostraron que los sujetos tratados con aspirina (160 mg diarios) durante la semana previa a la cirugía experimentaron una elevación menor de F₂-ISOP durante la cirugía comparados con los sujetos que no tomaron aspirina (264).

Debido a la alta concentración de PUFAS en el cerebro comparada con la de otros órganos, la peroxidación lipídica es un resultado primario del daño al cerebro inducido por los RL. Con este fin, niveles de F₂-ISOP se han encontrado elevados en un gran número de enfermedades neurodegenerativas crónicas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer (265), la enfermedad de Huntington (266), la enfermedad de Parkinson (267), la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (268), la esclerosis múltiple y la esclerosis lateral amiotrófica (269, 270). Recientemente, *Bumoko et al. (2014)* proponen que el 8,12-iso-F₂-iPF_{2α}-IV es un buen marcador de los mecanismos neuropatogénicos que ocurren en niños afectados por el Konzo y podría ser usado para monitorizar el impacto de los ensayos de intervención para prevenir los efectos neurotóxicos del envenenamiento con yuca cianogénica (271).

Pocos estudios han investigado la asociación entre los niveles de F₂-ISOP y el riesgo de cáncer. Aun así, un estudio de cohortes realizado en Taiwan, demostró que los niveles urinarios de F₂-ISOP se correlacionaban

significativamente con el riesgo de carcinoma hepatocelular con un odds ratio (OR) de 2.54 (IC 95%: 1.30-4.93) (272). En otro estudio se correlacionaron niveles urinarios de F₂-ISOP con dos veces más de riesgo de sufrir cáncer de pulmón en hombres, pero no en mujeres (273). Se han encontrado en estudios de casos y controles niveles aumentados de dichos compuestos en pacientes con cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer gástrico y adenoma colorrectal (274-276). Por otra parte, los hallazgos de estudios prospectivos son pocos e inconsistentes. La posible explicación de estas diferencias entre estudios caso-control y estudios prospectivos sería que no está claro en el caso de los primeros si el EO conduce al cáncer o es un resultado del propio cáncer.

También se han encontrado niveles elevados de F₂-ISOP en diversos fluidos corporales o condensados exhalados en varias enfermedades pulmonares como son el asma, enfermedad intersticial pulmonar, fibrosis quística, hipertensión pulmonar, enfermedad de células falciformes con síndrome torácico agudo y síndrome de dificultad respiratoria aguda (277-281).

Se ha relacionado los F₂-ISOP con otras enfermedades como son la DMT2, artritis reumatoide, artritis psoriásica y osteoartritis (282, 283). Son múltiples los estudios que han demostrado como los niveles de F₂-ISOP, urinarios y plasmáticos, se incrementan en adultos obesos (284, 285). F₂-ISOP se correlaciona positivamente con el (IMC), la circunferencia de la cintura (WC), el área de grasa visceral, y el porcentaje de grasa corporal (286-289).

Respecto a las enfermedades y trastornos ginecológicos son pocos los estudios realizados hasta la fecha. *Helmersson et al. (2001)* hallaron niveles elevados de F₂-IsoPs urinarios en mujeres post-menopáusicas respecto a mujeres pre-menopáusicas. En otro estudio dichos niveles fueron más altos en hombres jóvenes que en mujeres premenopausicas. En cuanto al embarazo no se encontraron diferencias significativas entre los niveles de F₂-ISOP, plasmáticos y urinarios, de mujeres embarazadas y los niveles de aquellas mujeres que no lo estaban, y además presentaban ciclos menstruales regulares y no tomaban ACO, vitaminas ni antiinflamatorios no esteroideos (290, 291). También se han encontrado niveles de F₂-ISOP relacionados con el índice de densidad mineral del hueso en la población sana (292). Sin embargo,

el papel de estos ISOP en la osteoporosis es aún incierto. Los ISOP también se han relacionado con la preeclampsia (293). Los marcadores de EO, incluidos los F₂-ISOP, alcanzan su máxima expresión entre las semanas 37 y 41 antes del nacimiento (294). Embarazos patológicos, como la preeclampsia, expresan incluso una respuesta más alta de EO, especialmente en los casos más severos. Recientemente, un estudio ha propuesto que los niveles de isómeros específicos de ISOP de la clase IV, medidos entre la semana 12 y 18 de embarazo, podrían utilizarse como predictores útiles de preeclampsia (295).

Para nuestro conocimiento, la investigación de *Kahal et al. (2013)* es el único estudio donde se midieron ISOP en muestras de orina de pacientes con SOP, donde se hallaron niveles más altos de ISOP en dichas mujeres respecto a las mujeres control (296).

2HIPOTESIS DEL **TRABAJO**

El SOP es una de las alteraciones endocrinas más comunes en la mujer, relacionada con el SMet (obesidad, hipertensión, dislipemia, diabetes) y con numerosas complicaciones a largo plazo. Todas estas características lo convierten en un grave problema de salud pública con un alto coste económico.

Hoy en día la causa principal del SOP es aún desconocida, y se considera multifactorial y poligenética. Existen suficientes indicios en la literatura para pensar que el EO es uno de los eventos que se dan en el SOP sin que hasta el momento presente esté bien definido el comportamiento de los diferentes agentes moleculares implicados. Dicho EO estaría asociado a un aumento de la presencia del SOP por sí mismo e independiente de otros factores metabólicos conocidos como la RI, la obesidad o el SMet. También el EO se asocia a eventos cardiovasculares, y podría ser el nexo de unión entre el SOP y el RCV presente en estas mujeres.

Además, hasta la fecha, no están descritos marcadores bioquímicos que permitan detectar por sí solos la presencia del SOP. El diagnóstico de éste se basa en datos clínicos, marcadores hormonales y parámetros ecográficos.

Todo esto nos lleva a plantear la hipótesis de que las mujeres con el SOP pueden presentar mayores concentraciones de sustancias oxidantes y productos de oxidación, y concentraciones menores de sustancias antioxidantes, revelando así que el EO se encuentra estrechamente ligado a la fisiopatología de dicho síndrome, independientemente de otros factores metabólicos. Por ello, los biomarcadores de EO podrían resultar muy útiles, ayudando a los clínicos a diagnosticar el SOP y permitiendo así instaurar medidas preventivas precoces muy favorables para estas pacientes.

3 OBJETIVOS

1. Comparar las variables clínicas, los perfiles bioquímico, hormonal y lipídico, el metabolismo de hidratos de carbono y los parámetros de inflamación, hemostasia y RCV entre mujeres con SOP y las mujeres sanas.
2. Evaluar el estatus oxidativo en mujeres con SOP mediante biomarcadores de EO y compararlo con el de mujeres sanas.
3. Evaluar la influencia de la obesidad, la RI y el SMet en los biomarcadores de EO.
4. Evaluar el nivel de biomarcadores de EO en función de los diferentes fenotipos de SOP.
5. Determinar la relación del nivel de 8-ISOP con diversos diferentes parámetros bioquímicos y hormonales, y con marcadores de riesgo cardiovascular en mujeres con SOP.
6. Evaluar los marcadores de EO como herramientas para el diagnóstico del SOP.

4 MATERIAL Y **MÉTODOS**

4.1 Sujetos a estudio

4.1.1 Reclutamiento de pacientes y controles

Entre junio de 2014 y junio de 2016, el reclutamiento de las pacientes y participantes control se llevó a cabo por el servicio de Ginecología del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (H.U.V.A) de Murcia, donde se han evaluado y clasificado a todos los sujetos del presente estudio.

Los dos grupos de participantes del estudio, mujeres con sospecha clínica de SOP y mujeres control, procedían de las consultas externas de esterilidad, ginecología y endocrinología del hospital.

En el grupo control se incluyó, para mejorar la comparabilidad, siempre la siguiente paciente vista en la consulta tras una paciente con sospecha de SOP incluida en el estudio, que cumpliera los criterios de inclusión y no tuviera criterios de exclusión. Estas pacientes podrían por tanto incluir cualquier otra razón de consulta (esterilidad por factor masculino, esterilidad sin sospecha clínica de SOP, mioma, quiste incluido endometriosis, etc.). También se incluyeron pacientes con mioma, quiste, endometriosis u otra patología, en un intento de que represente mejor a la población general.

El Comité de Ética del hospital aprobó el estudio y a todas las participantes del estudio se les informó a cerca de la investigación a realizar facilitándoles un documento de consentimiento informado para su participación voluntaria en el estudio (Anexo I).

4.1.2. Selección de pacientes y controles

Todas las participantes del presente estudio fueron evaluadas para su inclusión en uno de los grupos definidos. Además, se aplicaron los criterios generales tanto de inclusión como de exclusión que se exponen a continuación:

I. Criterios de inclusión generales

- Mujeres entre 18-40 años.
- Mujeres que no estén tomando ACO.

II. Criterios de exclusión

- Mujeres con diagnóstico de patología endocrina previa (Cushing, Hiperplasia suprarrenal congénita, patología tiroidea no controlada).
- Pacientes extranjeras que no puedan leer o hablar en castellano con fluidez.
- Pacientes con ACO que no los puedan suspender 3 meses (tendrían que suspenderlas durante 3 meses para entrar en el estudio). Los ACO modifican la morfología de los ovarios.
- Pacientes con tratamiento con corticoides de forma crónica (tópicos, orales, intravenosos o intraarticulares, inhalados, intramusculares o administración depot), especialmente en pacientes alérgicas, asmáticas o con patología traumatológica. Si se incluyen tendrían que suspenderlos 3 meses antes.
- Pacientes con Metformina (si son subsidiarias de tratamiento tratar de posponer hasta extracción analítica). Si ya lo están tomando especificar tiempo que lo están tomando y dosis.
- Pacientes que presenten patologías en las que existe la posibilidad de daño oxidativo tales como: diabetes insulina-dependiente, insuficiencia renal crónica, malnutrición, enfermedad inflamatoria de más de dos meses de evolución o sujetos que tomen suplementos vitamínicos,

agentes quelantes de metales, o sustancias que puedan influir en las determinaciones de nuestro estudio.

En todos los casos se han empleado los criterios estandarizados de diagnóstico y se ha controlado analíticamente la presencia de algunas de las patologías descritas como criterio de exclusión que pudieran interferir en este estudio.

Los pacientes del estudio quedaron distribuidos en los siguientes grupos:

- ✓ Pacientes con SOP: 125 pacientes afectadas de SOP probable, según criterios de Rotterdam 2003, a los que se les aplicó el protocolo de estudio estándar para la exclusión de otras patologías ginecológicas. Se seleccionaron aquellos pacientes que no habían comenzado con tratamiento anticonceptivo.
- ✓ Grupo de sujetos control: 169 mujeres sanas sin evidencia de SOP ni patología endocrina-ginecológica conocida.

4.1.3. Estudio general de los pacientes y controles

Todas las pacientes que aceptaron participar en el estudio y firmaron el consentimiento informado, se les citó para una primera visita coincidiendo con la fase folicular temprana, entre el tercer y quinto día del ciclo menstrual espontáneo. A las pacientes amenorreicas se les pautó PRG oral (10 mg durante 10 días) para que deprivaran. En esta primera cita, el médico especialista en ginecología realizó primeramente el historial clínico y la anamnesis correspondiente.

A continuación, una enfermera realizó la extracción de sangre. Los diferentes tubos de sangre se enviaron inmediatamente al laboratorio para el posterior análisis de los parámetros analíticos. Los parámetros bioquímicos se determinaron en el mismo día de la extracción; después se recuperó varias

alícuota de suero, plasma y sangre para su conservación en un congelador a -80 °C. Estas muestras se fueron descongelando según se fueron midiendo los diferentes parámetros de EO.

Posteriormente, el especialista en ginecología realizó a las pacientes una evaluación ecográfica con un ecógrafo Voluson E8® General Electric Healthcare, USA usando un transductor abdominal convexo de 3,5 MHz y un transductor vaginal de 5 MHz. para ver la morfología ovárica. A continuación, se proporcionó a las pacientes un cuestionario para que lo autocumplimentasen con el fin de valorar su grado de virilización (el nivel de hirsutismo se calcula mediante la escala de *Ferriman-Gallwey*), y su función ovárica y menstrual (Anexo II).

Todas las pacientes fueron citadas para una segunda visita coincidiendo con la segunda mitad de su ciclo menstrual. En esta visita se les informó sobre su diagnóstico definitivo, si presentaban o no SOP. El diagnóstico de SOP se confirmó utilizando los criterios de la *European Society for Human Reproduction and Embryology* y la *American Society of Reproductive* (Rotterdam, 2003), presencia de dos de las tres características siguientes: oligoanovulación (menos de 6 periodos menstruales en el año previo), signos clínicos o bioquímicos de HA (concentraciones de testosterona sérica por encima del límite superior normal y/o ≥ 8 puntos en escala de *Ferriman-Gallwey*) y morfología de ovarios poliquísticos (ovarios normales o aumentados de tamaño, >10 mL, con la presencia de microquistes subcapsulares, en número de 12 o más de 2-9 milímetros de diámetro en cada ovario).

A continuación, se llevaron a cabo diferentes medidas antropométricas de las participantes. Se midió la circunferencia de la cintura y la cadera en la región más estrecha del abdomen y en la parte más ancha de la región glútea, respectivamente. El IMC se calculó por el peso dividido por la talla al cuadrado (kg/m^2).

Por último, se les realizó una nueva extracción sanguínea que se envió al laboratorio para medir el nivel de PRG basal.

4.2 Obtención y manipulación de muestras biológicas

En la primera cita se extrajo sangre a las pacientes en tres tubos, uno de hemograma en ácido etilendiaminotetraacético tripotásico (EDTA-K₃), otro de suero seco sin anticoagulante y otro de plasma con heparina de litio como anticoagulante.

La extracción sanguínea se realizó a primera hora de la mañana, en ayunas de un mínimo de 8 horas. El Servicio de Ginecología del H.U.V.A de Murcia dispone del personal de enfermería cualificado para la obtención de las distintas muestras.

Las muestras de sangre de cada paciente fueron recogidas en varios tubos: 2 tubos Vacuette® (ref: 455059) sin anticoagulantes para las determinaciones en suero; 2 tubos Vacutainer® de 4mL con EDTA-K₃ como anticoagulante (ref: 368860), uno para la hematimetría y el otro se conservó en hielo hasta su procesamiento para la medición de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) basal; 1 tubo Vacuette® de 3mL con EDTA-K₃ (ref: 454015) como anticoagulante para la determinación de la hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) y, por último, 1 tubo Vacutainer® tubo de 2.7mL con citrato de sodio como anticoagulante (ref: 363079) para las determinaciones de coagulación. En la segunda visita se extrajo sangre en un solo tubo Vacuette® de 9mL de suero sin anticoagulante.

El Servicio de Análisis Clínicos de este mismo hospital cuenta con los equipos necesarios para la conservación de las mismas en las condiciones adecuadas. Dispone, además, con el equipamiento general de utillaje básico (pipetas automáticas, agitadores, etc.) así como de material fungible (tubos desechables, puntas de pipetas, etc.) y material fungible específico como tubos de silicona, tubos *Falcon* de 50 ml, tubos eppendorf, tubos libres de metales, etc.

Para obtener el suero se centrifugaron todos los tubos de suero (Vacutainer® 9mL), después de haberse retraído el coágulo de la muestra, a 3000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos en centrífugas refrigeradas Kubota® 5930. A continuación, se realizaron 6 alícuotas para la determinación de parámetros bioquímicos, hormonas, vitaminas, TAC, ISOP y metales.

Las determinaciones realizadas en el mismo día de la extracción fueron: hemograma, hemostasia, bioquímica general, hormonas, Hba1c, lipoproteínas, homocisteína, vitamina D y B₁₂, ácido fólico, ACTH, cortisol y SHBG. El resto de alícuotas, que no se analizaron en el momento (determinación de ISOP, vitaminas, metales y TAC al final del estudio cuando se tuviese los sueros recogidos de todas las pacientes), fueron congeladas inmediatamente en un congelador a -80°C (Heraeus® HERA Freeze HFU 586 Kendro) para la, evitando así posibles degradaciones de las muestras.

4.3 Determinación de los perfiles analíticos básicos (bioquímico, hematológico y hormonal)

Las determinaciones bioquímicas, hematológicas y hormonales forman parte de la Cartera de Servicios del Servicio de Análisis Clínicos y del Servicio de Hematología del H.U.V.A de Murcia y se realizaron de acuerdo a los métodos de rutina.

- Los niveles cuantitativos de glucosa, urea, creatinina (CREA), AU, calcio (Ca), fósforo (P), sodio (Na), potasio (K), cloro (Cl), TG, colesterol total (CT), colesterol HDL, albúmina (Alb), ferritina, Fe, transaminasa glutámico-oxalacética (GOT), transaminasa glutámico-pirúvica (GPT), gamma-glutamyl transferasa (GGT) y PCR, fueron determinados en suero usando métodos enzimáticos en el autoanalizador (Cobas 8000®, Roche).
 - Para la glucosa se utilizó la técnica enzimática de la hexoquinasa.

- La urea se midió mediante el test cinético con ureasa y glutamato deshidrogenasa.
 - La técnica de la hidrolización enzimática por la lipasa se utilizó para determinar los niveles de TG.
 - Los niveles de colesterol HDL se midieron por el método del detergente acelerado selectivo. Los niveles de colesterol total se determinaron enzimáticamente. Los niveles de LDL se calcularon utilizando la fórmula de Friedwald ($LDL = TC - TG / 5 - HDL$).
 - Para medir niveles de ferritina y PCR se utilizó dos pruebas inmunturbidimétricas potenciadas con partículas.
 - Se utilizaron diferentes tests colorimétricos para medir los niveles de Fe, Ca, P y Alb.
 - Mediante test enzimáticos colorimétricos se midieron el AU, GOT, GPT y GGT.
 - La medida de los iones Na, K y Cl se realizó mediante potenciometría utilizando un electrodo selectivo de iones que hace uso de las propiedades especiales de ciertas membranas para crear un potencial eléctrico (fuerza electromotriz = FEM) que permite medir los iones en solución.
 - Para medir la CREA se utilizó la prueba cinética colorimétrica basada en el método de Jaffé: en una solución alcalina, la creatinina forma un complejo amarillo-anaranjado con el picrato. La tasa de formación de colorante es proporcional a la concentración de CREA en la muestra.
-
- Para la determinación de los niveles séricos de las hormonas TSH, LH, FSH, E2, PRL, PRG y MULLE y de ácido fólico y vitamina B12 (VitB12) se utilizó una técnica inmunológica, los inmunoensayos de electroquimioluminiscencia en los autoanalizadores CobasE170® y CobasE411®, Roche.
 - Los niveles de insulina, cortisol, paratohormona (PTH), DHEAS, androstenodiona, SHGB, TL y vitamina D se midieron en suero por radioinmunoensayo en un contador automático gamma (Wizard 1470®,

Wallac), mientras que la ACTH se midió en sangre total por la misma técnica.

- La HCY y las apolipoproteínas A-I, A-II y B se midieron mediante nefelometría (BN ProSpec®, Siemens).
- El HOMA-IR se calculó utilizando niveles de suero en ayunas de glucosa en miligramos por decilitro y de insulina en microunidades internacionales por mililitro en la siguiente fórmula: $(\text{glucosa} \times \text{insulina}) / 405$.
- Las determinaciones hematológicas: recuento de hematíes, leucocitos y plaquetas, recuento diferencial de leucocitos, concentración de hemoglobina y hematocrito, así como los correspondientes índices hematológicos, se realizaron en el contador hematológico Sysmex® XN-9000 (Roche), el cual combina tecnologías de dispersión de luz óptica e impedancia.
- Todas las determinaciones de los parámetros relacionados con la hemostasia, tanto las pruebas básicas: tiempo de protrombina (TP), actividad de protrombina, tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA), fibrinógeno derivado (FibD) y Dímero D; como las pruebas para el estudio de trombofilia: antitrombina III, proteína C (PROTC), proteína S libre (PROT S), resistencia a la proteína C activada y el anticoagulante lúpico (ACLUPI), se realizaron en un coagulómetro ACLTOP 750® (Werfen). Estos autoanalizadores estudian el sistema de coagulación y los diversos factores que en él influyen utilizando diferentes tipos de técnicas:
 - Pruebas turbidimétricas (TP, TTPA, ACLUPI, FibD): detectan la formación del coágulo por espectrometría.
 - Pruebas cromogénicas: son métodos colorimétricos en los que se usa un sustrato cromogénico que al reaccionar con la sustancia de interés (directos, PROTC) o con una enzima (indirectos, antitrombina III) da una sustancia coloreada.

- Pruebas inmunoturbidimétricas (PROTS y Dímero D): basadas en la formación de un complejo antígeno-anticuerpo que afecta la transmisión de luz.
- Para la determinación de Hba1c se utilizó el autoanalizador de glucohemoglobina TOSOH HLC®-723 G8 que utiliza los principios de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) por intercambio iónico (catiónico).

4.4 Métodos analíticos en el estudio del estrés oxidativo

4.4.1 Determinación de vitaminas antioxidantes

La concentración de VitA y VitE se midieron simultáneamente mediante HPLC en suero. Las muestras se protegieron de la luz para su conservación y posterior análisis. El equipo de HPLC Agilent 1220 Infinity LC® realiza automáticamente los cálculos y permite obtener directamente las concentraciones de VitA y VitE expresadas en µg/dL.

I. Reactivos

Los reactivos utilizados fueron suministrados por Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH (ref. 195-5869R Munich) en forma de kit y estaba compuesto por:

- Fase móvil (MP) 2x1400 mL;
- Diluyente para estándar interno (REAG 1) 1x350 mL;
- Reactivo de extracción (REAG2) 1x75 mL;
- Estándar interno 3x1 g.
- Juego de calibradores N° 195-5878 (CAL) que contiene 5x1 mL (almacenar a <-20 °C).

- Columna analítica N° 195-5870 que contiene una columna analítica (ANLT COL) de fase inversa (250x4 mm DI) suficiente para 100 inyecciones.

II. Fundamento de la medición

Se mezcla la muestra de suero con una solución de trabajo que contiene un estándar interno. La misión del estándar interno es evaluar la pérdida de vitaminas que se produce durante el proceso de extracción. Se elimina el precipitado resultante por centrifugación. El sobrenadante se utiliza para realizar el análisis HPLC en un sistema isocrático. Las muestras se separan en una columna de fase inversa y se lleva a cabo la detección UV y la determinación cuantitativa con la ayuda del estándar interno.

III. Procedimiento

Para realizar el análisis de la VitA y de la VitE, se necesitan 200 µL de suero. Hasta que se llevó a cabo el análisis, las muestras permanecieron congeladas (- 80°C) y protegidas de la luz. Los reactivos del kit se prepararon según instrucciones del fabricante.

- Primero se instaló el prefiltro entre el inyector y la columna analítica
- Luego se instaló la columna analítica y del prefiltro en el sistema HPLC, ajustando la temperatura del calefactor de columnas a 40°C.
- Se encendió el detector UV, ajustando la longitud de onda a 340 nm y el rango a 0.02 AUFS (escala completa de unidades de absorción).
- Se bombeó la fase móvil a un flujo de 0.6 mL/min para equilibrar todo el sistema hasta alcanzar una línea de base estable.
- Después de una medición de 3 minutos se ajustó el detector a una longitud de onda de 295 nm y rango = 0.01 AUFS.

- Se procedió a inyectar un blanco y un calibrador para comprobar el funcionamiento del sistema.
- Se realizó una calibración al inicio de cada serie analítica, seguida de los controles y de las muestras de pacientes.
- Se procesaron dos controles, nivel bajo y nivel alto, con cada grupo de muestras de los pacientes.
- Primero se procedió a realizar una extracción de las vitaminas. Para cada control, estándar y muestra problema se mezcló 200 μ L de cada uno, añadiéndole 200 μ L de estándar interno y se homogenizó durante 1 minuto en vortex.
- A continuación, se pipeteó 200 μ L de REACTIVO 2 en cada tubo, se mezcló durante 1 minuto en agitador automático y se centrifugó 15 minutos a velocidad máxima en una micro-centrífuga. Después se dejó reposar en nevera durante 30 minutos.
- Se pipeteó el sobrenadante con cuidado y se transfirió en tubos eppendorf de 1,5 mL de color topacio, centrifugándolos de nuevo durante 5 minutos a velocidad máxima para eliminar completamente partículas proteicas.
- Después se recogió 100 μ L de la fase superior, se puso en tubos eppendorf de color topacio y se añadieron 400 μ L de Fase Móvil.
- Se agitó en un agitador automático y de nuevo se centrifugó 2 minutos a 12000 rpm.
- Finalmente se recogieron 400 μ L de sobrenadante evitando revolver el precipitado de la parte inferior y se transfirió con cuidado en un vial color topacio para inyector automático en HPLC.

IV. Condiciones del HPLC

Tabla 2. Características del HPLC

Flujo de la bomba	0.6 ml/min
Columna	DI de 90 mm x 3.2 mm
Volumen de muestra	20 µL
Temperatura columna	40°C
Tiempo de retención	2.1 minutos la VitA 7.9 minutos la VitE
Detección	340 nm transcurridos 3.0 minutos 295 nm

4.4.2 Determinación de la capacidad antioxidante totalI. Reactivos

Para la determinación de la TAC del suero de las muestras se utilizó el kit comercial suministrado por Calbiochem® (ref. 615700 San Diego, USA) compuesto por:

- Tampón fosfato salino
- Cromógeno: Metamioglobina y ABTSTM (2,2'-Azino-di-[3-etilbenzotiazolin sulfonato])
- Sustrato, estabilizado con peróxido de hidrógeno (H₂O₂)
- Estándar: ácido 6-Hidroxí-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

II. Fundamento de la medición

El principio del ensayo se basa en la capacidad por parte de los antioxidantes presentes en el suero de inhibir la producción de radicales $\text{ABTS}^{\text{TM}^{*+}}$. La reacción de la peroxidasa metahemoglobina con el H_2O_2 forma radicales ferrilmioglobina que, a su vez, reaccionan con el ABTS produciendo los radicales $\text{ABTS}^{\text{TM}^{*+}}$. La cantidad de dicho radical $\text{ABTS}^{\text{TM}^{*+}}$ producido se monitoriza midiendo su absorbancia a la longitud de onda de 600nm con un espectrofotómetro automatizado, ILab 600®, Werfen, que será inversamente proporcional a la concentración de antioxidantes de la muestra. (Figura 4).

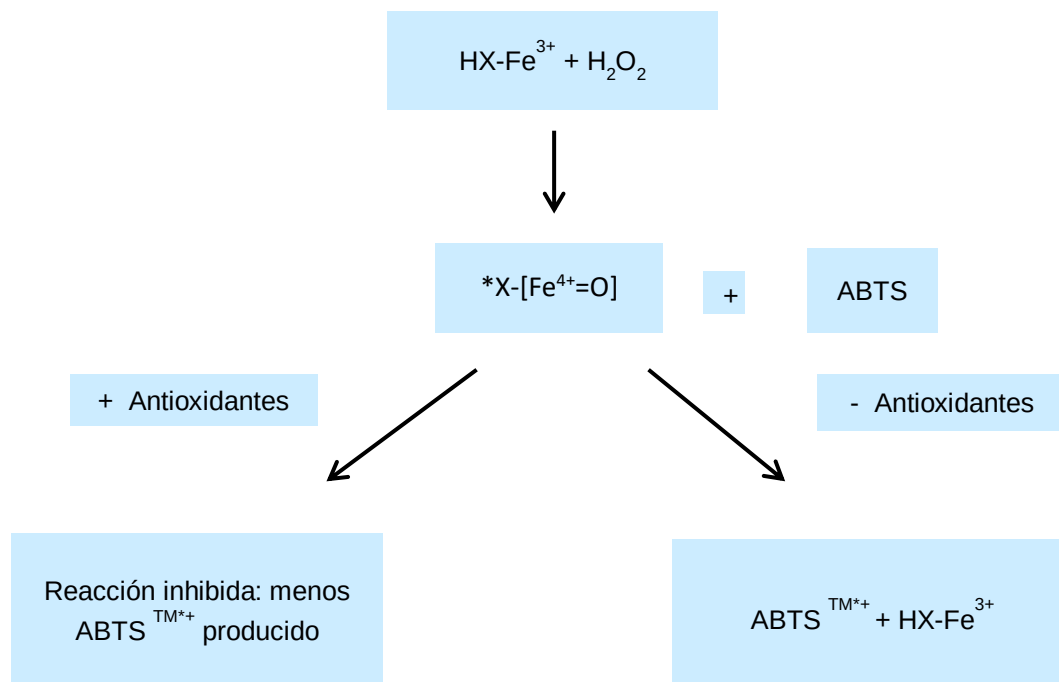


Figura 4. Fundamento del ensayo para la determinación de la TAC. Adaptado de Miller, N.J. et al. (1993) (195).

III. Procedimiento

- Primeramente, se descongelaron las alícuotas con los sueros de todas las pacientes. Se dejaron atemperar y se homogenizaron antes de la medida.
- A continuación, se procedió a preparar los reactivos:
 - Cromógeno: se añadieron 10 mL del tampón a cada vial de cromógeno y se homogenizó. Después se colocó en el analizador en su posición.
 - Substrato: se diluyó cada vial de substrato necesarios con 7.5 mL de tampón. Después se colocó en el analizador en su posición.
 - Estándar: se añadió 1 mL de agua destilada al vial.
- Después se preparó el autoanalizador. Se calibró la técnica colocando una cubeta con 20 µL de estándar, otra cubeta con agua destilada, que será el blanco, y se pasó un control.
- Se añadieron 20 µL de cada muestra de suero en cubetas de plástico y se colocaron en el analizador en la posición correspondiente.

4.4.3 Determinación de isoprostanos

I. Reactivos

Los reactivos utilizados fueron suministrados por Cayman Chemical® (ref. 516351 Michigan, USA) en forma de kit y estaba compuesto por:

- Anticuerpos de conejo anti-8-ISOP (Antisuero).
- 8-ISOP conjugado con acetilcolinesterasa (Tracer)
- 8-Isoprostane Standard
- Tampón a concentración 10X
- Tampón de lavado a concentración 400X
- Polisorbato 20
- 5 placas recubiertas con anticuerpos de ratón anti-IgG de conejo
- Reactivo de Ellman

- Solución colorante para el Tracer
- Solución de colorante para el Antisuero

Para el análisis de todas las muestras se emplearon 2 kits. Cada muestra se midió por duplicado.

II. Fundamento de la medición

Se trata de un método de enzimoimmunoanálisis que se basa en la competencia entre el 8-ISOP de la muestra problema y un 8-ISOP conjugado con acetilcolinesterasa (Tracer) por los sitios de unión de un número limitado de anticuerpos de conejo anti-8-ISOP (Antisuero) los cuales a su vez se han unido a los anticuerpos IgG de ratón pegados previamente en el fondo del pocillo. Puesto que la concentración del Tracer es constante y la de 8-ISOP de la muestra varía, la cantidad de Tracer que se unirá al Antisuero será inversamente proporcional a la concentración de 8-ISOP en cada pocillo. Al lavar el pocillo y añadir un reactivo de Ellman), el cual contiene el sustrato para la acetilcolinesterasa, se produce un producto (ácido 5-tio-2-nitrobenzoico) de color amarillo que absorbe luz a una longitud de onda de 412nm. La intensidad de este color, determinado espectrofotométricamente, es proporcional a la cantidad de Tracer, el cual como ya se ha dicho, es inversamente proporcional a la cantidad de 8-ISOP libre presente en la muestra.

III. Procedimiento

- Primeramente, se preparó la solución de tampón. Para ello se diluyó el contenido de un vial de Tampón a concentración 10X con 90 ml de agua ultrapura.

- A continuación se preparó la solución de lavado diluyendo 5 mL del vial de Tampón de lavado a concentración 400X en 2 litros de agua ultrapura y añadiendo 1 mL de polisorbato 20.
- Después de descongelaron las alícuotas de suero y se homogenizaron en un agitador eléctrico.
- Se reconstituyeron los dos reactivos: el vial del Tracer en 30 mL de solución de tampón y el vial del Antisuero en 30 mL de solución de tampón. A ambos reactivos se les añadió 300 µL de la solución colorante correspondiente para ayudar en la visualización a la hora de añadirlos a los pocillos.
- A continuación, se prepararon los estándares en ocho tubos numerados de 1 al 8. Primeramente, se diluyó en un tubo sin numerar 100 µL del vial del estándar en 900 µL de agua ultrapura, obteniéndose una concentración de 5 ng/mL. Después se añadieron 900 µL de la solución de tampón al tubo número 1 y 750 µL al resto de tubos, del 2 al 8. Se transfirieron 100 µL del tubo sin numerar al tubo 1 y se mezcló vigorosamente. La concentración de este estándar, el primer punto de la curva estándar, será de 500 pg/mL. Después se fueron haciendo diluciones seriadas de estándar transfiriendo 500 µL del tubo 1 al tubo 2 y agitando de nuevo. Se repitió el proceso para los tubos 3-8.
- Se fue añadiendo la cantidad especificada por el fabricante de solución tampón, estándares, muestra (50µl), Tracer y Antisuero a cada pocillo de las placas. Como ya se ha comentado, cada muestra se midió por duplicado.
- Se cubrió cada placa con un plástico y se incubaron durante 18 horas a 4°C.
- Después de las 18 horas se reconstituyó el reactivo de Ellman: 250 dtn del vial de reactivo con 50 mL de agua ultrapura.
- Se vació cada placa y se lavaron 5 veces con la solución de lavado preparada anteriormente.
- Se volvió a cubrir con un plástico cada placa y se dejaron incubar en una habitación oscura sobre un agitador orbital de 90 a 120 minutos.

- Finalmente, todas las placas se revelaron por espectrofotometría usando un lector de placas a una longitud de onda de 410 nm.
- La casa comercial nos proporcionó un programa para convertir las absorbancias en concentraciones de 8-ISOP.

4.4.4 Determinación de metales

Fundamento de la absorción atómica

La Espectrofotometría de Absorción Atómica se basa en la absorción de radiación electromagnética por las partículas atómicas. Para ello, es necesario atomizar la muestra, es decir, convertir las moléculas constituyentes de la muestra en partículas gaseosas elementales. El espectro de absorción de un elemento atomizado está constituido por una cantidad limitada de líneas discretas a longitudes de onda características para cada elemento.

En la espectroscopia atómica, las muestras se vaporizan a temperaturas muy altas y la concentración de los átomos del elemento de interés se determina midiendo la absorción a sus longitudes de onda características.

La sensibilidad del método se define como la concentración necesaria de un elemento para producir el 99% de transmitancia, lo que corresponde al 0.0044 de absorbancia.

Directamente relacionado con la sensibilidad se encuentra el límite de detección, que corresponde a la concentración necesaria de un elemento para producir una señal con una intensidad triple del ruido de fondo. Por ruido de fondo se entiende toda señal observable cuando el elemento a analizar se encuentra ausente de la llama y es debido a la absorción molecular y a la dispersión de las partículas en la llama.

La atomización tiene lugar en un tubo de grafito, sobre la denominada plataforma de L'vov, para evitar un cambio rápido de temperatura y de este

modo obtener picos más reproducibles (realza sensibilidad, exactitud y corrección de Zeeman para reducir el background al mínimo).

Zinc

I. Reactivos

- Glicerol 5% v/v (diluyente): diluir 50 ml de glicerol en 1000 ml de agua desionizada. Conservar en frigorífico hasta 3 meses.
- Calibrador stock: Zn 1g/L Perkin Elmer N9300178
- Solución Patrón de Zn 0.01 g/L: Mezclar 1 mL de calibrador stock (Zn 1g/L) con 99 mL de diluyente de glicerol (5%). Mezclar por inversión al menos 10 veces.
- Standard 10 µg/dL: 0.5 ml de solución patrón de 1000 µg/dL + 49.5 mL de solución de glicerol al 5%. Corresponde a una concentración de Zn plasmático de 50 µg/dL.
- Standard 20 µg/dL: 1ml de solución patrón de 1000 µg/dL + 49 mL de solución de glicerol al 5%. Corresponde a una concentración de Zn plasmático de 100 µg/dL.
- Standard 30 µg/dL: 1.5 mL de solución patrón de 1000 µg/dL + 48.5 mL de solución de glicerol al 5%. Corresponde a una concentración de Zn plasmático de 150 µg/dL.
- Standard 40 µg/dL: 2 mL de solución patrón de 1000 µg/dL + 48 mL de solución de glicerol al 5%. Corresponde a una concentración de Zn plasmático de 200 µg/dL.

II. Fundamento de la medición

Para la medición de Zn se realizó mediante espectrofotometría de absorción atómica de llama (5100 PC, Perkin-Elmer®).

La optimización del espectrómetro se consigue mediante la utilización de una lámpara de cátodo hueco a una intensidad de corriente de 15 mA calentada previamente 15 minutos. La máxima energía de pico se consigue seleccionando la longitud de onda a 213.9 nm y la anchura de banda a 0.7 nm.

La información real del estado del zinc en el organismo sólo se podría obtener por medida directa en los tejidos, ya que la mayoría del zinc corporal es intracelular. Sin embargo, en la práctica, se obtiene por interpretación de su concentración en plasma y orina.

El método analítico más extendido en los laboratorios clínicos es la absorción atómica con llama de aire-acetileno.

Las muestras de suero diluidas 1/5 en agua desionizada son aspiradas en la llama. La concentración de Zn se determina comparando la señal del suero diluido con la señal de los calibradores acuosos, que son preparados en una matriz de glicerol diluida para simular la viscosidad del plasma diluido.

III. Procedimiento

- Primeramente, se atemperaron los sueros a temperatura ambiente y se mezclaron por inversión.
- Se añadieron 2.5 mL de cada uno de los calibradores y del control en los tubos.
- Se añadir 100 μ L de muestra (o control) en tubos de plástico de 16 mm y añadir 400 μ L de agua desionizada (dilución 1/5) y se mezclaron inmediatamente.
- Antes de comenzar con la medición se establecieron las condiciones instrumentales adecuadas para optimizar la señal y minimizar el ruido de fondo, $\lambda = 213.8$ nm, Ancho= 0.7 nm, Mezcla= aire-acetileno.
- Se empezó primeramente a aspirar diluyente glicerol en la llama para leer absorbancia cero (blanco). Después se aspiraron los calibradores de Zn del más diluido al concentrado y así se obtuvo la curva de calibración.
- A continuación, se comenzó a aspirar el suero control y las muestras.

- Se calculó la concentración de cada una de las muestras a partir de las lecturas de absorbancia por interpolación de la curva de calibración. Los resultados del control se encontraban dentro del 5% de la media establecida.

Para obtener resultados reproducibles fue importante mantener constantemente una aspiración óptima y condiciones de la llama. Se aspiró periódicamente HCl para ayudar a mantener limpio el sistema nebulizador.

Cobre

I. Reactivos

- Glicerina 10%: 50 mL glicerina +450 mL agua.
- Calibrador stock: Cu 1000 µg/mL (100 mg/dl) Perkin Elmer N9300183.
- Cu 10 mg/dL: 10mL Cu (100 mg/dl) y 90 mL agua.
- Se prepara una recta de calibración a partir de un matraz que contiene Cu en concentración de 10 mg/dl. Se realiza una dilución 1/10: 500µl de Cu 10 mg/dl y 4.5 mL de agua destilada, con lo que se obtiene una solución de 1 mg/ dl de Cu.
- A partir de aquí, se prepara la recta:
 - BLANCO: 2 mL de agua destilada.
 - 50 µg/dL: 0.25 mL de Cu de 1 mg/ dl + 4.75 mL de agua destilada.
 - 100 µg/dL: 0.50 mL de Cu de 1 mg/ dl + 4.50 mL de agua destilada.
 - 150 µg/dL: 0.75 mL de Cu de 1 mg/ dl + 4.25 mL de agua destilada.
- A partir de estas preparaciones, se diluye al 50% con glicerina al 10%:

- BLANCO: 2 mL de agua destilada + 2 ml de glicerina 10%
- Standard 1: 2 mL de 50 µg/dL + 2 mL de glicerina 10%.
- Standard 2: 2 mL de 100 µg/dL + 2 mL de glicerina 10%.
- Standard 3: 2 mL de 150 µg/dL + 2 mL de glicerina 10%.

Las muestras y controles se diluyen a la mitad con agua destilada: 350 µL muestra/control + 350 µL agua destilada.

II. Fundamento de la medición

Para la medición de Cu en suero se utilizó el equipo Perkin Elmer para espectroscopia de absorción atómica de llama modelo 5100 PC.

La técnica se basa en que la energía de una llama de aire/acetileno con presiones 4 y 1.1 bares respectivamente, en dicho equipo, hace que los átomos de cobre de una disolución se encuentren en estado fundamental y sean entonces capaces de absorber la radiación de 324,8 nm proveniente de una lámpara de cátodo hueco de cobre, la rendija se ajusta a 0.7 nm. La absorbancia es directamente proporcional a la concentración de cobre de la disolución (ley de *Lambert- Beer-Bouger*).

Por sus características es la técnica de elección para medir la concentración de Cu en el suero en ausencia de un método de referencia. La línea de resonancia del cobre está lejos de las de otros elementos que habitualmente se encuentran en el suero.

El límite de detección se sitúa alrededor de con una dilución del espécimen 1:1, lo que es más que suficiente para las medidas séricas (en donde se encuentra en concentraciones de alrededor de 70 a 155 mg/dl), con lo que se pueden poner de manifiesto fácilmente los déficits de este elemento.

III. Procedimiento

Se han descrito múltiples métodos de preparación previa de la muestra desde los años 70. Actualmente se tiende a la menor manipulación posible de la misma evitando pasos previos de desproteinización o de extracción con disolventes orgánicos.

Selenio

I. Reactivos

Modificador de matriz

- Los componentes primarios del modificador de matriz son: Paladio (10 g/L de Pd (NO₃) Perkin Elmer BO190635, en HNO₃ al 15%, tritón X-100 y agua suprapura.
- Como modificador de matriz se emplean los anteriores componentes en la siguiente concentración:

- Solución de Pd al 15% 1 mL
- Tritón X-100 0.1 mL
- Agua suprapura..... c.s.p. 100 mL

II. Fundamento de la medición

La determinación sérica de SE se realizó mediante la técnica de Espectrometría de absorción atómica electrotérmica en cámara de grafito utilizando el analizador Aanalyst 600®, Perkin-Elmer.

Este procedimiento ofrece un análisis directo sin previa digestión y ha sido ampliamente adoptada por los laboratorios clínicos para la determinación de SE en el suero, plasma y sangre.

La corrección de fondo con deuterio no es suficiente para evitar el efecto matriz, por lo que los equipos dotados con esta corrección no son prácticamente aptos para el análisis de SE en muestras biológicas, ya que no son capaces de corregir las interferencias que producen las altas concentraciones de Fe y fosfatos en sangre y en orina respectivamente.

Sin embargo, el equipo que se utilizó permite la corrección de fondo por efecto Zeeman, ofrece una mejor solución a este problema, aunque no se encuentra completamente libre del efecto matriz.

En este procedimiento es muy importante la utilización de un modificador de matriz que produzca seleniuros refractarios con el fin de posibilitar que la temperatura de la fase de pirolisis sea lo más alta posible (1000-1300 °C), con objeto de eliminar la mayoría de la matriz sin pérdida de SE. Se puede utilizar níquel como modificador, pero este ha sido casi totalmente sustituido por paladio, siendo en la actualidad considerado como el modificador universal ya que ofrece un alto suero sin precipitación de proteínas.

III. Procedimiento

Las muestras de suero se diluyeron primeramente en modificador de matriz 1/9 (v/v), procediéndose a su homogenización.

El siguiente paso fue la preparación de los patrones:

Se partió de un patrón certificado de 1 g/L (1000 µg/mL) Perkin Elmer N9300182 y se diluyó en un matraz aforado hasta concentración de 10 mg/L. Para preparar esta disolución se necesitó coger: 1 mL de solución 1 g/L y enrasarlo hasta 100 mL con agua suprapura.

A partir de esta concentración (10 mg/L), se realizaron los patrones de trabajo de concentraciones finales de 50, 100 y 200 µg/L:

- Standard 50: 0.5 mL de solución 10 mg/L, hasta 100 mL de agua suprapura
- Standard 100: 1 mL de solución 10 mg/L, hasta 100 mL de agua suprapura
- Standard 200: 2 mL de solución 10 mg/L, hasta 100 mL de agua suprapura

Estos tres patrones se diluyeron 1/9 (v/v) con modificador de matriz a la hora de calibrar.

A continuación, se preparó el analizador manualmente, poniendo en la pantalla de calibración cada una de las concentraciones y en el *autosampler* ponemos la posición asignada.

Después se puso en diferentes pocillos cada muestra diluída a 1/9 (v/v) con el modificador.

El blanco de calibración se preparó con agua suprapura diluida 1/9 (v/v) con modificador de matriz.

4.5 Métodos estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa informático SPSS (Statistical Package for Social Sciences versión 22.0).

En primer lugar, se aplicó el test de Kolmogorov-Smirnov que demostró que todas las variables seguían una distribución normal.

Los resultados de las variables cuantitativas se expresan como media $\pm$ desviación estándar (DE) y las cualitativas como porcentajes, para cada grupo estudiado.

En el caso de variables cuantitativas, para averiguar la existencia o no de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos se ha aplicado el análisis estadístico *t* de Student. En el caso de comparaciones de datos cuantitativos entre más de dos grupos se utiliza el Análisis de la Varianza (ANOVA).

Para analizar las relaciones entre variables categóricas se empleó el test de χ^2 (Chi-cuadrado).

Mediante regresión lineal, se estudió la existencia y el grado de asociación entre las variables cuantitativas que encontramos más representativas del EO, obteniéndose el valor del coeficiente de correlación de Pearson (*r*).

La valoración de la capacidad diagnóstica de las determinaciones que presentaron diferencias estadísticamente significativas, se realizó a través del estudio de sensibilidad y especificidad mediante curvas de rendimiento diagnóstico o curvas ROC (Receiver Operating Characteristic). Se entiende por:

Sensibilidad (S) es la capacidad del test de identificar correctamente a pacientes con la enfermedad. Probabilidad de que un sujeto con la enfermedad de positivo en el test.

Especificidad (E) es la capacidad del test de identificar correctamente a los sujetos que no tienen la enfermedad. Probabilidad de que un sujeto sano de negativo en el test.

Al tratarse de variables cuantitativas se debe establecer el punto de corte óptimo que separará un resultado negativo de uno positivo, buscando así el equilibrio entre la sensibilidad y la especificidad. El punto de corte óptimo se

considerará aquel que viene dado por la combinación de máxima sensibilidad y especificidad, y es el que tiene como coordenadas al punto en el que la curva más se ha alejado de la diagonal.

En el caso de las variables cuantitativas, que mostraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos, se examinó la capacidad discriminatoria de cada una de ellas mediante curvas ROC. Para los puntos de corte sugeridos se presentan los valores de sensibilidad, especificidad, área bajo la curva (ABC) con su intervalo de confianza (IC) al 95%, valor pronóstico positivo (VPP) y valor pronóstico negativo (VPN). Se definió como test válido todo aquel cuya ABC era superior a 0.75.

El límite de confianza es del 95%, para todos los análisis estadísticos se definió como significativo el valor de p bilateral inferior a 0.05.

5 RESULTADOS

5.1 Población seleccionada

Se incluyeron en el estudio un total de 294 mujeres. Utilizando los criterios de *Rotterdam*, 125 mujeres fueron diagnosticadas de SOP y 169 mujeres formaron el grupo control.

5.2 Resultados estudio

5.2.1 Análisis de variables en el grupo control y en el grupo de mujeres con Síndrome de Ovario Poliquístico

A continuación, se presentan los resultados de la exploración física y las determinaciones analíticas realizadas en cada subgrupo de pacientes y la significación estadística de las diferencias observadas.

5.2.1.1 Edad, exploración física y antecedentes personales

Los parámetros de la edad y exploración física se recogen en la tabla 3. Las mujeres con SOP presentaron mayor peso e IMC que las mujeres del grupo control. El 23.7 % y el 28.8% de las SOP tenían sobrepeso y obesidad respectivamente, frente al 11.9% y 8.1% del grupo control. Respecto al perímetro abdominal también hubo diferencias entre ambos grupos, siendo mayor en el grupo SOP (80.0 ± 13.5 , $p < 0.001$). En cuanto a las variables clínicas indicativas de HA, un 89.3% del grupo SOP obtuvieron una puntuación superior a 10 en la escala de *Ferriman-Gallwey*, frente al 70.9% del grupo control. Un 43.8% de mujeres con SOP presentaban acné, frente al 28.6% del grupo control. No hubo diferencias significativas en la alopecia entre los dos grupos ($p=0.382$). Por otro lado, el 77.2% de las mujeres con SOP presentaban ciclos irregulares, amenorrea u otros trastornos de la menstruación, y sólo un

32.3% del grupo control los padecían. Las mujeres con SOP tuvieron ambas presiones arteriales, sistólica y diastólica, más altas que el grupo control.

Los antecedentes personales se recogen en la tabla 4. No hubo diferencias significativas entre los dos grupos respecto a ninguna de los parámetros considerados.

Tabla 3. Exploración física en pacientes con SOP y controles. Datos expresados como media $\pm$ DE o números crudos (porcentaje).

Variables	SOP (n=125)	Control (n=169)	<i>p</i>
Edad (años)	28 $\pm$ 5	30 $\pm$ 6	NS
Peso (kg)	70.8 $\pm$ 17.6	62.1 $\pm$ 12.6	<0.001*
IMC (kg/m ²)	26.5 $\pm$ 6.3	23.1 $\pm$ 4.6	<0.001*
Grado de obesidad, n (%)			<0.001*
• Bajo peso	27 (22.9)	52 (32.5)	
• Normopeso	29 (24.6)	76 (47.5)	
• Sobrepeso	28 (23.7)	19 (11.9)	
• Obesidad	34 (28.8)	13 (8.1)	
Perímetro abdominal (cm)	80.0 $\pm$ 13.5	74.0 $\pm$ 9.6	<0.001*
Escala de hirsutismo, n (%)	109 (89.3)	117 (70.9)	<0.001*
Acné, n (%)	53 (43.8)	46 (28.6)	<0.01*
Alopecia, n (%)	14 (11.6)	9 (6.7)	NS
Alteraciones menstruación, n (%)	95 (77.2)	53 (32.3)	<0.001*
PAS (mmHg)	114 $\pm$ 15	108 $\pm$ 12	<0.01*
PAD (mmHg)	75 $\pm$ 14	72 $\pm$ 10	<0.01*

Como antecedentes de hirsutismo se valoró la impresión subjetiva de las pacientes y controles. Como alteraciones menstruales se consideró la presencia de polimenorrea, oligomenorrea o amenorrea. Análisis estadístico realizado mediante *t* de Student y test Chi Cuadrado, **p*<0.05. NS: no significativo.

Tabla 4. Antecedentes personales.

Variables	SOP (n=125)	Control (n=169)	p
Hipertensión, n (%)	2 (1.6)	6 (3.7)	NS
Diabetes mellitus, n (%)	1 (0.8)	2 (1.2)	NS
Enfermedad coronaria, n (%)	0	2 (1.2)	NS
Enfermedad autoinmune, n (%)	3 (2.1)	3 (1.8)	NS
Hiperprolactinemia, n (%)	0	2 (1.2)	NS
Enfermedad tiroidea, n (%)	15 (12.1)	24 (14.6)	NS
Tabaquismo, n (%)	65 (55.6)	82 (20.9)	NS
Consumo de alcohol, n (%)	92 (78)	130 (82.3)	NS

Como antecedentes de diabetes mellitus e hipertensión arterial se consideró el diagnóstico de ambas patologías en tratamiento dietético o farmacológico. Como antecedentes de ECV la presencia de un evento cardiovascular definido como *angor pectoris*, infarto agudo de miocardio, revascularización miocárdica, accidente cardiovascular, estenosis coronaria o revascularización arterial en miembros inferiores. El tabaquismo se consideró fumar o haber fumado a lo largo de su vida y como alcohol haber consumido bebidas alcohólicas durante algún periodo de su vida con una frecuencia de al menos una vez al mes. Datos expresados como números crudos (porcentaje). Análisis estadístico realizado mediante test Chi Cuadrado. NS: no significativo.

5.2.1.2 Perfil bioquímico general

Los resultados de la mayoría de parámetros de la analítica bioquímica general no mostraron diferencias significativas entre las pacientes con SOP y las pacientes control (tabla 5). Solamente en la GPT y la GGT, se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos, siendo los niveles más elevados en las mujeres con SOP, aunque estos se encuentran dentro del rango de normalidad.

Tabla 5. Perfil bioquímico general en pacientes con SOP y controles.

Variables	SOP (n=125)	Control (n=169)	<i>p</i>
Na (mEq/L)	140 ± 2	141 ± 2	NS
K (mEq/L)	4.3 ± 0.3	4.4 ± 0.4	NS
Cl (mEq/L)	102 ± 3	102 ± 2	NS
Ca (mg dL)	9.4 ± 0.4	9.5 ± 0.3	NS
P (mg dL)	3.6 ± 0.5	3.7 ± 0.5	NS
CREA (mg dL)	0.69 ± 0.10	0.71 ± 0.11	NS
Urea (mg dL)	27.6 ± 6.6	29.0 ± 7.0	NS
GOT (U/L)	17 ± 5	17 ± 6	NS
GPT (U/L)	16 ± 8	14 ± 7	0.017*
GGT (U/L)	15 ± 8	12 ± 6	0.037*
Ácido Fólico (ng/ml)	7.8 ± 8.3	8.4 ± 3.5	NS
VitB12 (pg/ml)	469 ± 175	506 ± 182	NS
MDRD (ml/min/1.73m ²)	111 ± 19	107 ± 19	NS
CKD-EPI (ml/min/1.73m ²)	116 ± 12	111 ± 14	NS

Datos expresados como media ± DE. Análisis estadístico realizado mediante *t* de Student, **p*<0.05. NS: no significativo.

5.2.1.3 Perfil hormonal

A nivel hormonal las pacientes con SOP presentaron niveles superiores de LH, FSH, ratio LH/FSH, T_T, T_L, ANDRS y MULLE, junto a unos niveles menores de SHBG, que las pacientes control. El índice de andrógenos libres (FAI) también fue más alto en el grupo SOP, pero la diferencia no fue significativa. Tampoco existieron diferencias significativas en los niveles de DHEAS, E₂, FAI, PTH y CORT. (Tabla 6).

Tabla 6. Perfil hormonal de pacientes con SOP y controles.

Variables	SOP (n=125)	Control (n=169)	<i>p</i>
LH (mUI/ml)	8.9 ± 4.8	7.0 ± 2.8	<0.001*
FSH (mUI/ml)	5.9 ± 3.8	7.2 ± 3.5	0.041*
LH/FSH	1.6 ± 0.9	1.1 ± 0.5	<0.001*
E ₂ (pg/ml)	42.0 ± 18.1	43.1 ± 24.5	NS
T _T (ng/ml)	0.40 ± 0.16	0.28 ± 0.13	<0.01*
T _L (pg/ml)	1.4 ± 1.3	0.88 ± 0.90	<0.01*
FAI	6.5 ± 2.1	3.6 ± 2.7	<0.01*
ANDRS (ng/ml)	2.9 ± 1.3	2.2 ± 0.9	<0.01*
DHEAS (mcg/100ml)	194 ± 93	194 ± 162	NS
SHBG (nmol/l)	32.2 ± 23.2	44.8 ± 23.3	0.024*
MULLE (ng/ml)	7.03 ± 4.92	3.16 ± 2.14	<0.001*
PTH (pg/ml)	27.9 ± 23.0	29.9 ± 57.3	NS
CORT (mcg/dl)	18.8 ± 6.6	19.9 ± 6.8	NS
TSH (μUI/ml)	2.685 ± 1.335	2.653 ± 1.294	NS
PRL (ng/ml)	473 ± 271	474 ± 250	NS

Datos expresados como media ± DE. Análisis estadístico realizado mediante *t* de Student, **p*<0.05. NS: no significativo.

5.2.1.4 Metabolismo de los hidratos de carbono

Las determinaciones séricas de GLU y HbA1c fueron similares entre los dos grupos. Sin embargo, la insulina y el índice HOMA-IR fueron más elevados en el grupo SOP. (Tabla 7).

Tabla 7. Metabolismo de los hidratos de carbono.

Variables	SOP (n=125)	Control (n=169)	<i>p</i>
GLU (mg/dl)	86 ± 19	83 ± 9	NS
Insulina (μUI/ml)	15.9 ± 13.6	10.2 ± 9.5	<0.001*
HOMA-IR	3.4 ± 3.0	2.1 ± 2.1	<0.001*
HbA1c (%)	5.33 ± 0.67	5.36 ± 0.42	NS

Datos expresados como media ± DE. Análisis estadístico realizado mediante *t* de Student, **p*<0.05. NS: no significativo.

5.2.1.5 Perfil lipídico

Los valores de TG, índice de acumulación lipídica (LAP), ratio ApoB/ApoA1 y ratio C_T/HDL-C fueron significativamente más elevados, así como los valores de HDL-C y ApoA1 que fueron menores en el grupo SOP respecto al grupo de controles. No hubo diferencias en cuanto al C_T, LDL-C y ApoB. (Tabla 8).

Tabla 8. Perfil lipídico.

Variables	SOP (n=125)	Control (n=169)	<i>p</i>
C _T (mg/dl)	170 ± 26	171 ± 29	NS
HDL-C (mg/dl)	58 ± 15	67 ± 12	0.048*
LDL-C (mg/dl)	96 ± 24	92 ± 22	NS
TG (mg/dl)	78 ± 47	61 ± 24	<0.001*
ApoA1 (mg/dl)	150 ± 19	160 ± 23	0.036*
ApoB (mg/dl)	80 ± 17	77 ± 16	NS
ApoB/ApoA1	0.55 ± 0.15	0.48 ± 0.13	0.016*
C _T /HDL-C	3.13 ± 0.97	2.60 ± 0.55	<0.001*
LAP	21.3 ± 19.8	12.1 ± 11.9	<0.001*

Datos expresados como media ± DE. Análisis estadístico realizado mediante *t* de Student, **p*<0.05. NS: no significativo.

Los valores ≥ 200 , ≥ 100 y ≥ 150 para C_T , LDL-C y TG respectivamente, fueron considerados como niveles elevados, y un valor de HDL-C < 40 como nivel bajo. Teniendo esto en cuenta se observó que, en ambos grupos, un 13% de las mujeres presentaban C_T alto. Un 81% de mujeres con SOP tenía niveles disminuidos de HDL-C frente a un 63% del grupo control. El porcentaje de LDL-C alto fue mayor en el grupo de SOP, pero no fue significativamente diferente con el grupo control. En cuanto a los TG, un 9% de mujeres con SOP los tenían elevados frente a 1% de mujeres control. (Tabla 9).

Tabla 9. Frecuencia de anomalías en el perfil lipídico.

Variables	SOP (n=125)	Control (n=169)	p
↑ C_T , n (%)	16 (13)	22 ± (13)	NS
↓ HDL-C, n (%)	100 (81)	98 (63)	$< 0.01^*$
↑ LDL-C, n (%)	11 (9)	6 (4)	NS
↑ TG, n (%)	11 (9)	1 (1)	$< 0.001^*$

Datos presentados como números crudos (porcentaje). Análisis estadístico realizado mediante test Chi Cuadrado, $*p < 0.05$. NS: no significativo.

5.2.1.6 Parámetros de inflamación, hemostasia y riesgo cardiovascular

Se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos en los niveles de PCR y HCY. Ambos fueron superiores en el grupo de SOP. En cuanto al resto de parámetros estudiados no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos. (Tabla 10).

Tabla 10. Parámetros de inflamación, hemostasia y RCV.

Variables	SOP (n=125)	Control (n=169)	<i>p</i>
Recuento leucocitario (10^3 células/ μ l)	6.9 $\pm$ 1.6	6.1 $\pm$ 1.6	NS
Neutrófilos totales (10^3 células/ μ l)	3.7 $\pm$ 1.1	3.2 $\pm$ 1.1	NS
Recuento plaquetario (10^3 / μ l)	274 $\pm$ 60	253 $\pm$ 59	NS
Volumen plaquetario medio (fL)	9.3 $\pm$ 1.7	9.4 $\pm$ 1.7	NS
TP(s)	11 $\pm$ 2	11 $\pm$ 1	NS
Actividad de protrombina (%)	95 $\pm$ 6	94 $\pm$ 7	NS
TTPA(s)	34 $\pm$ 3	33 $\pm$ 3	NS
FibD (mg/dl)	384 $\pm$ 69	375 $\pm$ 63	NS
Dímero D (ng/mL)	101 $\pm$ 88	116 $\pm$ 129	NS
PROTC (%)	99 $\pm$ 15	94 $\pm$ 14	NS
PROTS (%)	91 $\pm$ 15	85 $\pm$ 15	NS
ATIII (%)	93 $\pm$ 11	93 $\pm$ 10	NS
RPCA, n (%)	0	0	-
ACLUPI, n (%)	1 (0.9)	0	NS
PCR (mg/dL)	0.30 $\pm$ 0.50	0.18 $\pm$ 0.25	0.015*
Ferritina (ng/mL)	50.4 $\pm$ 35.2	42.7 $\pm$ 32.7	NS
HCY (μ mol/L)	10.1 $\pm$ 2.9	9.3 $\pm$ 2.0	0.020*

Datos expresados como media $\pm$ DE o números crudos (porcentaje). Análisis estadístico realizado mediante *t* de Student, **p*<0.05. NS: no significativo.

5.2.2 Análisis de biomarcadores de Estrés Oxidativo

En la tabla 11 se recogen los resultados de los parámetros relacionados con el EO. Las mujeres con SOP presentaron valores significativamente más bajos BIL_T, BIL_I, TAC, VitE y Zn que las mujeres control. Los niveles de Fe, Cu y 8-ISOP fueron significativamente más elevados en el grupo SOP. No hubo diferencias significativas entre ambos grupos respecto a ALB, BIL_D, Ác.URI, VitA y SE.

Tabla 11. Parámetros relacionados con el EO.

Variables	SOP (n=125)	Control (n=169)	<i>p</i>
Alb (g/L)	4.5 ± 0.8	4.3 ± 0.8	NS
BIL _T (mg/dL)	0.42 ± 0.29	0.91 ± 0.55	<0.001*
BIL _D (mg/dL)	0.16 ± 0.08	0.18 ± 0.08	NS
BIL _I (mg/dL)	0.26 ± 0.27	0.73 ± 0.53	<0.001*
Ác. URI (mg/dL)	3.90 ± 0.93	4.09 ± 0.94	NS
TAC (mmol/L)	1.26 ± 0.18	1.48 ± 0.22	0.035*
VitA (µg/L)	29.0 ± 11.8	31.6 ± 21.8	NS
VitE (µg/L)	983 ± 341	1357 ± 525	<0.01*
Fe (µg/dL)	91.7 ± 156.4	71.7 ± 99.7	0.048*
SE (µg/L)	93.2 ± 26.2	105.5 ± 33.5	NS
Cu (µg/L)	110.0 ± 24.0	94.0 ± 20.0	0.011*
Zn (µg/dL)	108.0 ± 129.7	132.9 ± 209.0	0.016*
8-ISOP (pg/mL)	138.4 ± 104.1	68.6 ± 34.3	<0.001*

Datos expresados como media ± DE. Análisis estadístico realizado mediante *t* de Student, **p*<0.05. NS: no significativo.

5.2.3 Análisis de biomarcadores de estrés oxidativo en función del peso, resistencia a la insulina y Síndrome Metabólico

Los dos grupos de estudio se clasificaron según la presencia de sobrepeso, RI, HA y SMet, y se analizaron las diferencias entre los grupos en cuanto a los biomarcadores de EO.

5.2.3.1 Análisis según el peso

Se clasificaron las pacientes con SOP y las pacientes control según su IMC. Se consideró normopeso un IMC entre 18.5 y 24.9, sobrepeso IMC 25-29.9 y obesidad un IMC mayor o igual a 30. (Tabla 12).

Tabla 12. Distribución de mujeres SOP en función del grado de obesidad.

	Normopeso	Sobrepeso	Obesidad	p
SOP, n (%)	29 (24.6)	28 (23.7)	34 (28.8)	<000.1*
Control, n (%)	76 (47.5)	19 (11.9)	13 (8.1)	

Datos presentados como números crudos (porcentaje). Análisis estadístico realizado mediante test Chi Cuadrado, * $p < 0.05$.

Se agruparon a las pacientes con sobrepeso y obesidad en un único grupo al que se denominó “exceso de peso”, y se analizaron las variables de EO en función de la presencia o no de éste en los dos grupos de pacientes (tabla 13). Los niveles de BIL_T , BIL_I , TAC fueron significativamente más bajos en las mujeres con SOP normopeso y con sobrepeso que en las mujeres control normopeso. También estos niveles fueron mayores en las mujeres control con sobrepeso que en las mujeres con SOP normopeso y con sobrepeso. Los niveles de VitE en las mujeres control normopeso fueron más elevados que en las mujeres SOP normopeso y sobrepeso. También se encontraron diferencias en dicha vitamina entre el grupo control con sobrepeso y el de SOP normopeso.

El SE fue más bajo en el grupo SOP con sobrepeso que en los grupos control normopeso y con sobrepeso. También hubo diferencias significativas entre las mujeres del grupo con SOP normopeso y el grupo de mujeres control con sobrepeso.

Los niveles de 8-ISOP fueron significativamente más altos en las mujeres con SOP normopeso y con sobrepeso que en las mujeres control normopeso. También estos niveles fueron más bajos en las mujeres control con sobrepeso que en las mujeres con SOP normopeso y con sobrepeso.

Tabla 13. Biomarcadores de EO en mujeres sanas y mujeres con SOP en función de la presencia o no de exceso de peso.

	CONTROL			SOP		
	Normopeso (n=114)	Sobrepeso (n=31)	<i>p</i>	Normopeso (n=52)	Sobrepeso (n=62)	<i>p</i>
Alb (g/L)	4.5 ± 0.8	4.3 ± 0.7	NS	4.3 ± 0.9	4.3 ± 0.8	NS
BIL _T (mg/dL)	0.9 ± 0.6 ^a	0.9 ± 0.5 ^b	NS	0.4 ± 0.3 ^{a,b}	0.4 ± 0.3 ^{a,b}	NS
BIL _D (mg/dL)	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	NS	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	NS
BIL _I (mg/dL)	0.7 ± 0.6 ^{a,b}	0.7 ± 0.5 ^b	NS	0.3 ± 0.3 ^{a,b}	0.3 ± 0.3 ^{a,b}	NS
Ác. URI (mg/dL)	4.0 ± 0.9 ^a	4.5 ± 1.0	0.037*	3.9 ± 0.9 ^a	4.2 ± 0.9	<0.01*
TAC (mmol/L)	1.5 ± 0.2 ^a	1.5 ± 0.2 ^b	NS	1.2 ± 0.2 ^{a,b}	1.2 ± 0.2 ^{a,b}	NS
VitA (µg/L)	30.2 ± 11.9	28.4 ± 7.9	NS	30.6 ± 13.7	28.2 ± 10.5	NS
VitE (µg/L)	1357 ± 577 ^a	1292 ± 372 ^b	NS	933 ± 336 ^{a,b}	1038 ± 358 ^a	NS
Fe (µg/dL)	79.7 ± 19.2	61.9 ± 32.0	NS	73.6 ± 31.2	98.4 ± 25.4	NS
SE (µg/L)	104.3 ± 30.2 ^a	116.3 ± 48.4 ^b	NS	95.2 ± 26.3 ^b	90.7 ± 24.7 ^{a,b}	NS
Cu (µg/L)	92.5 ± 17.6 ^a	97.7 ± 17.5 ^b	NS	105.4 ± 23.9 ^a	113.2 ± 22.8 ^{a,b}	NS
Zn (µg/dL)	111.8 ± 43.8	100.5 ± 30.3	NS	144.7 ± 22.3	129.0 ± 13.4	NS
8-ISOP (pg/mL)	67.9 ± 32.7 ^a	70.5 ± 37.0 ^b	NS	130.4 ± 105.3 ^{a,b}	150.5 ± 107.5 ^{a,b}	NS

Datos presentados como media ± DE.

^{a,b} Superíndices similares indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Análisis estadístico realizado mediante test ANOVA, * $p < 0.05$. NS: no significativo.

5.2.3.2 Análisis según presencia de RI

Se clasificaron a las mujeres del estudio según presentaban RI (tabla 14). La RI se definió como un resultado anormal en el índice HOMA-IR igual o superior a 2.1(297). Las mujeres con SOP presentaron mayor RI (58.5%) que las mujeres control (28.5%).

Tabla 14. Distribución de mujeres SOP en función de la presencia de RI.

	RI	No RI	<i>p</i>
SOP, n (%)	72 (58.5)	51 (41.5)	<000.1*
Control, n (%)	47 (28.5)	118 (71.5)	

Datos presentados como números crudos (porcentaje). Análisis estadístico realizado mediante *t* de Student, **p*<0.05.

En la tabla 15 se recogen las variables de EO de los grupos control y SOP en función de la presencia o no de RI. Respecto a los antioxidantes endógenos, se encontraron diferencias significativas en los niveles de BIL_T, BIL_I, TAC y VitE entre el grupo control sin RI y los grupos SOP sin RI y con RI. También estos niveles fueron mayores en las mujeres control con RI que en las mujeres con SOP sin RI y con RI.

El SE fue más bajo en el grupo de mujeres con SOP sin RI que en los grupos control con y sin RI. El nivel del CU fue significativamente más alto en las mujeres con SOP sin RI y con RI que en las mujeres del grupo control sin RI. También se encontraron diferencias entre el grupo de control con RI y el grupo SOP con RI.

Los niveles de 8-ISOP fueron más elevados en el grupo de mujeres con SOP con sobrepeso que en los otros tres grupos. Incluso estos niveles fueron superiores en el grupo SOP sin RI que en los grupos control con y sin RI.

Tabla 15. Biomarcadores de EO en mujeres sanas y mujeres con SOP en función de la presencia o no de RI.

	CONTROL			SOP		
	No RI (n=118)	RI (n=47)	<i>p</i>	No RI (n=51)	RI (n=72)	<i>p</i>
Alb (g/L)	4.5 ± 0.8	4.4 ± 0.7	NS	4.2 ± 1.0	4.4 ± 0.8	NS
BIL_T (mg/dL)	0.9 ± 0.6 ^a	0.9 ± 0.5 ^b	NS	0.4 ± 0.3 ^{a,b}	0.4 ± 0.3 ^{a,b}	NS
BIL_D (mg/dL)	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	NS	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	NS
BIL_I (mg/dL)	0.7 ± 0.5 ^a	0.7 ± 0.5 ^b	NS	0.3 ± 0.2 ^{a,b}	0.2 ± 0.3 ^{a,b}	NS
Ác. URI (mg/dL)	4.0 ± 0.8	4.4 ± 1.1 ^a	0.049*	3.9 ± 0.7 ^a	4.0 ± 0.9	NS
TAC (mmol/L)	1.5 ± 0.2 ^a	1.5 ± 0.3 ^b	NS	1.3 ± 0.2 ^{a,b}	1.3 ± 0.2 ^{a,b}	NS
VitA (µg/L)	32.4 ± 24.7	30.1 ± 10.5	NS	30.3 ± 11.2	27.7 ± 12.3	NS
VitE (µg/L)	1353 ± 559 ^a	1380 ± 441 ^b	NS	1067 ± 413 ^{a,b}	919 ± 269 ^{a,b}	NS
Fe (µg/dL)	62.4 ± 31.2	76.1 ± 18.1	NS	86.5 ± 32.3	94.9 ± 25.2	NS
SE (µg/L)	104.9 ± 31.8 ^a	108.2 ± 37.8 ^b	NS	89.6 ± 22.8 ^{a,b}	96.2 ± 28.4	NS
Cu (µg/L)	92.5 ± 19.0 ^a	98.2 ± 22.5 ^b	NS	108.0 ± 23.5 ^a	110.1 ± 24.1 ^{a,b}	NS
Zn (µg/dL)	115.4 ± 142.6	102.8 ± 26.2	NS	136.8 ± 255.7	91.6 ± 174.9	NS
8-ISOP (pg/mL)	71.9 ± 36.4 ^a	62.5 ± 28.6 ^b	NS	116.0 ± 89.5 ^{a,b}	153.7 ± 112.4 ^{a,b}	0.031*

Datos presentados como media ± DE.

^{a,b} Superíndices similares indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Análisis estadístico realizado mediante test ANOVA, * $p < 0.05$. NS: no significativo.

5.2.3.3 Análisis según la presencia de Síndrome Metabólico

Todas las mujeres con SOP se clasificaron según presentasen o no SMet. Acorde a los criterios de la *Joint Interim Statement* (298), el diagnóstico de SMet se definió como la presencia de al menos tres de los siguientes criterios: 1) adiposidad central (perímetro abdominal ≥ 80 cm), 2) TG ≥ 150 mg/dL, o tratamiento específico, 3) HDL-C < 50 mg/dL o tratamiento específico, 4) TAS ≥ 130 y/o TAD ≥ 85 mmHg o tratamiento de hipertensión diagnosticada, y 5) GLU ≥ 100 mg/dL o diagnóstico previo de DMT2 con tratamiento.

El 47.1% de las mujeres con SOP tenían un perímetro abdominal ≥ 80 cm, frente al 22.4% de las mujeres control. Un 8.8% de mujeres con SOP presentaban niveles de TG por encima de 150 mg/dL, frente a 0.6% del grupo control. El HDL-C por debajo de 50 mg/dL lo tuvo un 30.6% de las mujeres con SOP, y sólo un 5.1% de las mujeres control (tabla 44). El 16.9% de las mujeres con SOP presentaron SMet, frente al 6.9% de las mujeres control con SMet ($p=0.008$). (Tablas 16 y 17).

Tabla 16. Distribución de los criterios diagnóstico de SMet en los grupos SOP y control.

Variables	SOP (n=125)	Control (n=169)	<i>p</i>
Perímetro abdominal ≥ 80 cm	56 (47.1)	36 (22.4)	$<0.001^*$
TG ≥ 150 mg/dL, o tratamiento específico	11 (8.8)	1 (0.6)	$<0.001^*$
HDL-C < 50 mg/dL o tratamiento específico	38 (30.6)	8 (5.1)	$<0.001^*$
TAS ≥ 130 y/o TAD ≥ 85 mmHg o tratamiento específico HAT	26 (21.1)	21 (12.9)	NS
GLU ≥ 100 mg/dL o diagnóstico previo de DMT2	6 (4.8)	5 (3.0)	NS

Datos presentados como números crudos (porcentaje). Análisis estadístico realizado mediante test Chi Cuadrado, $*p<0.05$. NS: no significativo.

Tabla 17. Distribución del SMet en los grupos SOP y control.

	SMet	No SMet	<i>p</i>
SOP, n (%)	21 (16.9)	103 (83.1)	<0.01*
Control, n (%)	11 (6.9)	149 (93.1)	

Datos presentados como números crudos (porcentaje). Análisis estadístico realizado mediante test Chi Cuadrado, * $p < 0.05$.

Las variables de EO en función de la presencia o no de SMet en los grupos SOP y control se recogen en la tabla 18.

Los niveles de BIL y BIL fueron más altos en el grupo control sin SMet que en los grupos de SOP con y sin SMet. Se encontraron diferencias en el nivel de la TAC, ya que fue más bajo el grupo de SOP con y sin SMet que en el grupo control con y sin SMet. La VitE fue más baja en las mujeres con SOP sin SMet que en las mujeres control con y sin SMet. Hubo diferencias significativas en el nivel de SE entre los grupos control y SOP sin SMet.

El Cu fue más bajo en el grupo de mujeres control sin SMet que en los grupos de mujeres con SOP con y sin SMet. Respecto a los niveles de 8-ISOP, éstos fueron más altos en el grupo SOP con SMet que en los grupos control con y sin SMet. También fueron mayores en el grupo SOP sin SMet que ambos grupos de controles. Además, se observó diferencia entre en el grupo de mujeres con SOP sin SMet y el grupo de mujeres con SOP con SMet.

Tabla 18. Biomarcadores de EO en mujeres sanas y mujeres con SOP en función de la presencia o no de SMet.

	CONTROL			SOP		
	No SMet (n=151)	SMet (n=10)	<i>p</i>	No SMet (n=103)	SMet (n=20)	<i>p</i>
Alb (g/L)	4.5 ± 0.8	4.5 ± 0.7	NS	4.3 ± 0.8	4.2 ± 0.9	NS
BIL_T (mg/dL)	0.9 ± 0.6 ^a	0.7 ± 0.5	NS	0.4 ± 0.3 ^a	0.4 ± 0.3 ^a	NS
BIL_D (mg/dL)	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	NS	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	NS
BIL_I (mg/dL)	0.7 ± 0.5 ^a	0.5 ± 0.3	NS	0.3 ± 0.2 ^a	0.3 ± 0.2 ^a	NS
Ác. URI (mg/dL)	4.1 ± 0.9	4.2 ± 1.2	NS	3.9 ± 0.9	3.8 ± 1.2	NS
TAC (mmol/L)	1.5 ± 0.2 ^a	1.6 ± 0.2 ^b	NS	1.2 ± 0.2 ^{a,b}	1.3 ± 0.1 ^{a,b}	NS
VitA (µg/L)	31.8 ± 12.8	27.7 ± 8.1	NS	29.5 ± 12.3	26.9 ± 9.8	NS
VitE (µg/L)	1347 ± 532 ^a	1424 ± 393 ^b	NS	1079 ± 417 ^{a,b}	967 ± 327	NS
Fe (µg/dL)	74.1 ± 24.7	67.5 ± 37.3	NS	99.9 ± 39.9	48.7 ± 36.2	NS
SE (µg/L)	106.1 ± 33.6 ^a	92.6 ± 38.2	NS	93.2 ± 26.6 ^a	92.5 ± 25.8	NS
Cu (µg/L)	92.9 ± 18.0 ^a	96.8 ± 8.0	NS	109.7 ± 24.9 ^a	111.6 ± 20.5 ^a	NS
Zn (µg/dL)	113.0 ± 140.5	83.8 ± 17.4	NS	117.1 ± 39.9	176.5 ± 32.9	NS
8-ISOP (pg/mL)	69.9 ± 34.8 ^a	63.0 ± 30.1 ^b	NS	131.2 ± 24.1 ^{a,b}	177.3 ± 103.4 ^{a,b}	NS

Datos presentados como media ± DE.

^{a,b} Superíndices similares indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Análisis estadístico realizado mediante test ANOVA. NS: no significativo.

5.2.4 Análisis de biomarcadores de estrés oxidativo en función de los diferentes fenotipos del Síndrome de Ovario Poliquístico

Se clasificaron a las mujeres con SOP en los cuatro fenotipos posibles según los criterios de Rotterdam que cumpliesen cada una de ellas. Fenotipo A: HA + OA + MOP, fenotipo B: HA + OA, fenotipo C: HA + MOP, y fenotipo D: OA + MOP.

El 65.6% de las mujeres con SOP presentaron el fenotipo A, un 12% el fenotipo B, un 16.8% el fenotipo C y sólo un 5.6% el fenotipo D. (Tabla 19).

Tabla 19. Clasificación del grupo SOP según los diferentes fenotipos.

	Fenotipo A	Fenotipo B	Fenotipo C	Fenotipo D
SOP, n (%)	82 (65.6)	15 (12.0)	21 (16.8)	7 (5.6)

Datos expresados como números crudos (porcentaje).

Se compararon los diferentes parámetros de EO en función de los cuatro fenotipos de SOP. Las mujeres con el fenotipo B presentaron niveles significativamente más alto de Ac.URI, Fe, TAC, VitA y 8-ISOP, y niveles significativamente más bajos de VitE que el resto de los fenotipos. En cuanto a los 8-ISOP, los niveles más altos correspondieron al fenotipo C, cuya diferencia fue estadísticamente significativa. En el resto de las variables no se encontraron diferencias significativas. (Tabla 20).

Tabla 20. Variables de EO en mujeres con SOP en función de los diferentes fenotipos.

Variables	Fenotipo A (n=82)	Fenotipo B (n=15)	Fenotipo C (n=21)	Fenotipo D (n=7)	<i>p</i>
Alb (g/L)	4.3 ± 0.9	4.5 ± 0.3	4.4 ± 0.7	4.0 ± 0.9	NS
BIL _T (mg/dL)	0.40 ± 0.29	0.41 ± 0.25	0.46 ± 0.33	0.47 ± 0.26	NS
BIL _D (mg/dL)	0.16 ± 0.9	0.15 ± 0.05	0.15 ± 0.7	0.17 ± 0.06	NS
BIL _I (mg/dL)	0.24 ± 0.28	0.27 ± 0.24	0.31 ± 0.29	0.30 ± 0.30	NS
Ác. URI (mg/dL)	3.76 ± 0.93	4.29 ± 0.90	4.28 ± 0.85	3.60 ± 0.83	NS
TAC (mmol/L)	1.24 ± 0.19	1.27 ± 0.23	1.25 ± 0.17	1.21 ± 0.11	0.021*
VitA (µg/L)	29.9 ± 12.0	32.2 ± 4.6	30.6 ± 14.4	20.5 ± 2.7	0.046*
VitE (µg/L)	963 ± 342	914 ± 234	999 ± 266	1334 ± 534	0.035*
Fe (µg/dL)	67.5 ± 29.8	161.7 ± 60.8	149.7 ± 72.7	57.1 ± 31.1	0.045*
SE (µg/L)	95.6 ± 27.0	85.7 ± 21.1	91.1 ± 28.4	89.0 ± 19.7	NS
Cu (µg/L)	109.1 ± 24.4	115.1 ± 17.6	107.5 ± 26.3	117.8 ± 26.2	NS
Zn (µg/dL)	127.5 ± 166.3	91.8 ± 31.2	160.3 ± 351.1	211.4 ± 209.0	NS
8-ISOP (pg/mL)	137.2 ± 97.0	124.5 ± 62.0	163.4 ± 155.8	102.4 ± 31.5	0.036*

Datos presentados como media ± DE. Análisis estadístico realizado mediante *t* de Student, **p*<0.05. NS: no significativo.

5.2.5 Agrupación de mujeres con Síndrome de Ovario Poliquístico en función de los niveles de 8-Isoprostanos

Se eligió a los 8-ISOP como variable representativa del EO de las pacientes, por lo que se clasificó a las mujeres de ambos grupos en función de los niveles de éstos. Usando la media + 2DE (137.20 pg/mL) para la concentración de 8-ISOP en el grupo control como punto de corte, las pacientes con SOP y valores de 8-ISOP ≥ 137.2 pg/mL fueron incluidas en el grupo de “alto 8-ISOP” (n=43), y aquellas pacientes con valores de 8-ISOP < 137.2 pg/mL se incluyeron en el grupo de “normal 8-ISOP” (n=82). En el grupo SOP se observó mayor porcentaje (33.3%) de pacientes con niveles altos de 8-ISOP que en el grupo control (5.8%). (Tabla 21).

Tabla 21. Distribución de mujeres SOP y control en función del nivel de 8-ISOP.

	Alto 8-ISOP	Normal 8-ISOP	<i>p</i>
SOP, n (%)	43 (33.3)	82 (66.7)	<000.1*
Control, n (%)	9 (5.8)	146 (94.2)	

Datos presentados como números crudos (porcentaje). Análisis estadístico realizado mediante test Chi Cuadrado, * $p < 0.05$.

Se compararon las variables clínicas y bioquímicas de las mujeres con SOP en ambos grupos (Tabla 22). No hubo diferencias significativas en ninguna de las variables.

Tabla 22. Edad, exploración física, tabaquismo y consumo de alcohol de las mujeres con SOP en función de la concentración de 8-ISOP.

Variables	Alto 8-ISOP (n=43)	Normal 8-ISOP (n=82)	<i>p</i>
Edad	28 ± 6	27 ± 5	NS
Peso (kg)	75.8 ± 17.4	68.6 ± 17.4	NS
IMC (kg/m²)	28.3 ± 5.8	25.7 ± 6.4	NS
Grado de obesidad, n (%)			NS
Bajo peso	5 (12.8)	22 (28.6)	
Normopeso	9 (23.1)	18 (23.4)	
Sobrepeso	10 (23.1)	18 (23.4)	
Obesidad	15 (38.5)	19 (16.4)	
Perímetro abdominal (cm)	85.3 ± 13.5	77.5 ± 12.9	NS
Escala de hirsutismo, n (%)	37 (90.2)	70 (88.6)	NS
Acné, n (%)	19 (47.5)	33 (41.8)	NS
Alopecia, n (%)	6 (15.0)	7 (8.9)	NS
Alteraciones menstruación, n (%)	30 (73.2)	63 (52.1)	NS
PAS (mmHg)	118 ± 15	111 ± 14	NS
PAD (mmHg)	79 ± 11	72 ± 13	NS
Tabaquismo	22 (56.4)	42 (55.3)	NS
Consumo de alcohol	28 (71.8)	62 (80.5)	NS

Datos presentados como media ± DE o números crudos (porcentaje). Análisis estadístico realizado mediante *t* de Student y test Chi Cuadrado. NS: no significativo.

Respecto al perfil bioquímico, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros analizados entre las mujeres con SOP que tenían niveles más altos de 8-ISOP y aquellas mujeres con niveles normales de 8-ISOP. (Tabla 23).

Tabla 23. Perfil bioquímico de las mujeres con SOP en función de la concentración de 8-ISOP.

Variables	Alto 8-ISOP (n=43)	Normal 8-ISOP (n=82)	<i>p</i>
Na (mEq/L)	140 ± 2	141 ± 2	NS
K (mEq/L)	4.4 ± 0.3	4.3 ± 0.3	NS
Cl (mEq/L)	101.6 ± 2.7	101.6 ± 2.8	NS
Ca (mg dL)	9.47 ± 0.31	9.43 ± 0.43	NS
P (mg dL)	3.56 ± 0.61	3.64 ± 0.45	NS
CREA (mg dL)	0.70 ± 0.09	0.69 ± 0.10	NS
Urea (mg dL)	26.3 ± 5.8	28.1 ± 6.7	NS
GOT (U/L)	17.3 ± 6.3	16.6 ± 4.4	NS
GPT (U/L)	16.7 ± 9.2	14.9 ± 6.8	NS
GGT (U/L)	14.1 ± 16.9	12.8 ± 5.0	NS
Ácido Fólico (ng/ml)	8.7 ± 13.2	7.4 ± 4.3	NS
VitB12 (pg/ml)	436 ± 169	488 ± 178	NS
MDRD (ml/min/1.73m ²)	108.1 ± 16.9	113.3 ± 19.1	NS
CKD-EPI (ml/min/1.73m ²)	113.5 ± 12.2	117.1 ± 11.6	NS

Datos presentados como media ± DE. Análisis estadístico realizado mediante *t* de Student. NS: no significativo.

Los valores de las hormonas en función de la concentración de 8-ISOP de las mujeres con SOP se muestran en la tabla 24. Aquellas mujeres con valores altos de 8-ISOP presentaron niveles mayores de T_T y T_L en comparación con aquellas mujeres con valores normales de 8-ISOP. Los niveles de SHBG fueron menores en las mujeres con altos niveles de 8-ISOP. En el resto de hormonas no se apreciaron diferencias entre ambos grupos.

Tabla 24. Perfil hormonal de las mujeres con SOP en función de la concentración de 8-ISOP.

Variables	Alto 8-ISOP (n=43)	Normal 8-ISOP (n=82)	<i>p</i>
LH (mUI/ml)	9.0 ± 4.1	8.8 ± 5.1	NS
FSH (mUI/ml)	5.5 ± 1.0	6.1 ± 4.7	NS
LH/FSH	1.65 ± 0.74	1.56 ± 0.96	NS
E ₂ (pg/ml)	42.0 ± 23.1	39.6 ± 15.0	NS
T _T (ng/ml)	0.43 ± 0.18	0.39 ± 0.16	0.024*
T _L (pg/ml)	1.61 ± 1.37	1.42 ± 1.31	0.042*
FAI	6.4 ± 4.2	6.5 ± 6.9	NS
ANDRS (ng/ml)	2.70 ± 1.23	2.99 ± 1.27	NS
DHEAS (mcg/100ml)	198.1 ± 103.7	191.7 ± 87.3	NS
SHBG (nmol/l)	29.0 ± 17.9	33.6 ± 25.3	0.049*
MULLE (ng/ml)	6.68 ± 5.57	7.22 ± 4.64	NS
PTH (pg/ml)	29.1 ± 21.8	27.5 ± 24.0	NS
CORT (mcg/dl)	17.9 ± 6.5	19.1 ± 6.5	NS
TSH (μUI/ml)	2.6 ± 1.3	2.8 ± 1.4	NS
PRL (ng/ml)	410 ± 168	497 ± 295	NS

Datos presentados como media ± DE. Análisis estadístico realizado mediante *t* de Student, **p*<0.05. NS: no significativo.

Las mujeres con SOP con niveles altos de 8-ISOP tuvieron valores más elevados de insulina y HOMA-IR que aquellas mujeres con SOP con niveles normales de 8-ISOP (*p*<0.05). La GLU también fue más elevada en el grupo de Alto 8-ISOP, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa (*p*<0.050). (Tabla 25).

Tabla 25. Variables de metabolismo de hidratos de carbono de mujeres SOP en función de los niveles de 8-ISOP.

Variables	Alto 8-ISOP (n=43)	Normal 8-ISOP (n=82)	<i>p</i>
GLU (mg/dl)	90.7 ± 30.2	83.9 ± 8.0	NS
Insulina (μUI/ml)	19.7 ± 15.8	14.1 ± 12.2	0.040*
HOMA-IR	4.29 ± 4.45	2.95 ± 2.62	0.016*
HbA1c (%)	5.51 ± 0.68	5.25 ± 0.67	NS

Datos presentados como media ± DE. Análisis estadístico realizado mediante *t* de Student, **p*<0.05. NS: no significativo.

El perfil lipídico se muestra en las tablas 26 y 27. Las mujeres SOP con alto 8-ISOP presentaron niveles superiores de TG, ratio C_T/HDL-C y LAP en comparación con las mujeres con normal 8-ISOP. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el resto de variables.

Tabla 26. Perfil lipídico de las mujeres con SOP en función de la concentración de 8-ISOP.

Variables	Alto 8-ISOP (n=43)	Normal 8-ISOP (n=82)	<i>p</i>
C_T (mg/dl)	174 ± 29	168 ± 25	NS
HDL-C (mg/dl)	55 ± 15	60 ± 16	NS
LDL-C (mg/dl)	101 ± 26	94 ± 24	NS
TG (mg/dl)	94 ± 61	71 ± 36	<0.01*
ApoA1 (mg/dl)	149 ± 18	151 ± 20	NS
ApoB (mg/dl)	85 ± 20	79 ± 16	NS
ApoB/ApoA1	0.59 ± 0.18	0.53 ± 0.14	NS
C_T/HDL-C	3.4 ± 1.2	3.0 ± 0.8	0.033*
LAP	29.0 ± 23.2	17.7 ± 16.8	0.035*

Datos presentados como media ± DE. Análisis estadístico realizado mediante *t* de Student, **p*<0.05. NS: no significativo.

Tabla 27. Frecuencia de anomalías en el perfil lipídico en función de la concentración de 8-ISOP en el grupo SOP.

Variables	Alto 8-ISOP (n=43)	Normal 8-ISOP (n=82)	<i>p</i>
↑ C_T , n (%)	5 (12.2)	11 (13.4)	NS
↓ HDL-C , n (%)	25 (61.0)	59 (72.8)	NS
↑ LDL-C , n (%)	5 (12.2)	6 (7.4)	NS
↑ TG , n (%)	6 (14.6)	5 (6.1)	NS

Datos presentados como números crudos (porcentaje). Análisis estadístico realizado mediante test Chi Cuadrado. NS: no significativo.

En cuanto a parámetros de inflamación, hemostasia y RCV, los niveles de PCR y HCY fueron significativamente mayores en el grupo de mujeres con alto 8-ISOP. En el resto de parámetros no se encontraron diferencias significativas. (Tabla 28).

Tabla 28. Parámetros de inflamación y hemostasia y RCV de los grupos SOP y control en función de la concentración de 8-ISOP en el grupo SOP.

Variables	Alto 8-ISOP (n=43)	Normal 8-ISOP (n=82)	p
Recuento leucocitario (10^3 células/μl)	7.3 $\pm$ 1.47	6.7 $\pm$ 1.7	NS
Neutrófilos totales (10^3 células/μl)	34.0 $\pm$ 1.0	3.6 $\pm$ 1.1	NS
Recuento plaquetario (10^3 / μl)	292 $\pm$ 67	265 $\pm$ 56	NS
Volumen plaquetario medio (fL)	9.5 $\pm$ 1.5	9.3 $\pm$ 1.8	NS
TP (s)	11.0 $\pm$ 0.7	11.1 $\pm$ 0.8	NS
Actividad de protrombina (%)	95 $\pm$ 6	94 $\pm$ 6	NS
TTPA (s)	34.8 $\pm$ 3.6	33.1 $\pm$ 3.2	NS
FibD (mg/dl)	413 $\pm$ 78	370 $\pm$ 60	NS
Dímero (ng/mL)	88 $\pm$ 100	107 $\pm$ 82	NS
PROTC (%)	101.9 $\pm$ 15.6	96.7 $\pm$ 15.1	NS
PROTS (%)	93.7 $\pm$ 14.8	89.9 $\pm$ 15.5	NS
ATIII (%)	93.9 $\pm$ 8.7	92.0 $\pm$ 12.2	NS
RPCA, n (%)	0	0	-
ACLUPI, n (%)	0	0	-
PCR (mg/dL)	0.47 $\pm$ 0.79	0.22 $\pm$ 0.20	<0.01*
Ferritina (ng/mL)	54.5 $\pm$ 42.0	46.9 $\pm$ 30.4	NS
HCY (μmol/L)	11.18 $\pm$ 4.01	9.56 $\pm$ 2.00	<0.01*

Datos expresados como media $\pm$ DE o números crudos (porcentaje). Análisis estadístico realizado mediante *t* de Student, **p*<0.05. NS: no significativo.

El nivel de los diferentes biomarcadores de EO en función de los niveles de 8-ISOP se muestra en la tabla 29. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de dichas variables.

Tabla 29. Nivel de los biomarcadores de EO de las mujeres con SOP en función de la concentración de 8-ISOP.

Variables	Alto 8-ISOP (n=43)	Normal 8-ISOP (n=82)	<i>p</i>
Alb (g/L)	7.3 ± 1.5	6.7 ± 1.7	NS
BIL _T (mg/dL)	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.3	NS
BIL _D (mg/dL)	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	NS
BIL _I (mg/dL)	0.2 ± 0.2	0.3 ± 0.3	NS
Ác. URI (mg/dL)	4.0 ± 0.9	3.8 ± 0.9	NS
TAC (mmol/L)	1.2 ± 0.2	1.3 ± 0.2	NS
VitA (µg/L)	28.1 ± 11.7	29.4 ± 12.0	NS
VitE (µg/L)	988 ± 270	985 ± 376	NS
Fe (µg/dL)	96.6 ± 12.1	89.4 ± 15.0	NS
SE (µg/L)	88.2 ± 27.2	95.9 ± 25.6	NS
Cu (µg/L)	113.0 ± 22.2	108.8 ± 24.9	NS
Zn (µg/dL)	159.0 ± 28.2	120.7 ± 20.4	NS

Datos presentados como media ± DE. Análisis estadístico realizado mediante *t* de Student. NS: no significativo.

5.2.6 Análisis de correlaciones

Se llevó a cabo un análisis de correlación de Pearson entre los niveles de 8-ISOP y las hormonas, características clínicas de HA perfil lipídico, variables del metabolismo de hidratos de carbono y de inflamación.

El análisis de correlación de *Pearson* entre los niveles de 8-ISOP y características clínicas se muestra en la tabla 30. En el grupo de mujeres con SOP los 8-ISOP se correlacionaron positivamente con el perímetro abdominal ($r=0.240$, $p=0.009$), la PAS ($r=0.192$, $p=0.034$), y la PAD ($r=0.258$, $p=0.004$). No hubo correlaciones significativas en el resto de variables ni tampoco en el grupo de controles.

Respecto a la correlación entre los niveles de 8-ISOP y las hormonas y características clínicas de HA se muestra en la tabla 31. En el grupo de

mujeres con SOP los 8-ISOP se correlacionaron positivamente con la T_T ($r=0.267$, $p=0.003$), la T_L ($r=0.372$, $p=0.001$) y FAI ($r=0.338$, $p=0.028$), y negativamente con la SHBG ($r= -0.281$, $p=0.015$). No se encontró correlación entre el nivel de 8-ISOP y el resto de variable. Por otro lado, en el grupo de mujeres control, no se encontró ninguna correlación con ninguna de las variables.

En cuanto al perfil lipídico, en el grupo de SOP hubo correlación positiva de los 8-ISOP con LDL-C ($r=0.191$, $p=0.035$), TG ($r=0.424$, $p=0.013$), ApoB ($r=0.219$, $p=0.016$), ApoB/ApoA1 ($r=0.192$, $p=0.037$), C_T /HDL-C ($r=0.232$, $p=0.010$) y LAP ($r=0.266$, $p=0.004$), y correlación negativa con HDL-C ($r= -0.195$, $p=0.031$). En el grupo control se encontró correlación positiva entre 8-ISOP y TG ($r=0.189$, $p=0.026$) y LDL-C ($r=0.192$, $p=0.018$). No se encontró correlación con el resto de variables. (Tabla 32).

El nivel de 8-ISOP se correlacionó positivamente en el grupo de SOP con la GLU ($r=0.232$, $p=0.010$), insulina ($r=0.286$, $p=0.046$), HOMA-IR ($r=0.216$, $p=0.017$), Hb1c ($r=0.192$, $p=0.036$) y HCY ($r=0.187$, $p=0.039$). En el grupo control sólo hubo correlación positiva entre los 8-ISOP y la HCY ($r=0.168$, $p=0.044$). (Tabla 33).

Por último, el nivel de 8-ISOP se correlacionó positivamente en el grupo de SOP con el Cu ($r=0.185$, $p=0.042$), y negativamente con la TAC ($r= -0.329$, $p=0.018$), y el SE ($r= -0.273$, $p=0.007$). En el grupo control también hubo correlación negativa entre los 8-ISOP y la TAC ($r= -0.219$, $p=0.006$) y el SE ($r= -0.215$, $p=0.007$) (Tabla 34).

Tabla 30. Relación de los 8-ISOP con características clínicas.

Variable	SOP		Control	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Peso (kg)	0.110	NS	0.014	NS
IMC (kg/m²)	0.154	NS	-0.067	NS
Perímetro abdominal (cm)	0.240	<0.01*	-0.013	NS
PAS (mmHg)	0.192	0.034*	-0.069	NS
PAD (mmHg)	0.258	<0.01*	-0.016	NS

Test correlación de *Pearson*, * $p < 0.05$. NS: no significativo.

Tabla 31. Relación de los 8-ISOP con hormonas y características clínicas de HA.

Variable	SOP		Control	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Acné	0.013	NS	0.005	NS
Hirsutismo	0.040	NS	-0.037	NS
Alopecia	0.054	NS	-0.017	NS
T_T (ng/ml)	0.267	<0.01*	0.031	NS
T_L (pg/ml)	0.372	<0.01*	-0.128	NS
FAI	0.338	0.028*	-0.084	NS
ANDRS (ng/ml)	0.014	NS	0.011	NS
DHEAS (mcg/100ml)	0.081	NS	0.147	NS
SHBG (nmol/l)	-0.281	0.015*	0.032	NS
LH (mUI/ml)	0.062	NS	0.005	NS
FSH (mUI/ml)	-0.052	NS	-0.069	NS
LH/FSH	0.072	NS	0.101	NS
E₂ (pg/mL)	0.222	NS	0.097	NS
MULLE (ng/mL)	0.022	NS	0.060	NS

Test correlación de *Pearson*, * $p < 0.05$. NS: no significativo.

Tabla 32. Relación de los 8-ISOP con el perfil lipídico.

Variable	SOP		Control	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
C_T (mg/dl)	0.104	NS	0.154	NS
HDL-C (mg/dl)	-0.195	0.031*	-0.067	NS
LDL-C (mg/dl)	0.191	0.035*	0.192	0.018*
TG (mg/dl)	0.424	0.013*	0.189	0.026*
ApoA1 (mg/dl)	-0.083	NS	-0.043	NS
ApoB (mg/dl)	0.219	0.016*	-0.097	NS
ApoB/ApoA1	0.192	0.037*	-0.065	NS
C_T/HDL-C	0.232	0.010*	-0.078	NS
LAP	0.266	<0.01*	0.041	NS

Test correlación de *Pearson*, * $p < 0.05$. NS: no significativo.

Tabla 33. Relación de los 8-ISOP con variables del metabolismo de hidratos de carbono y de inflamación.

Variable	SOP		Control	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
GLU (mg/dl)	0.232	0.010*	-0.046	NS
Insulina (μUI/ml)	0.286	0.046*	-0.093	NS
HOMA-IR	0.216	0.017*	-0.126	NS
HbA1c (%)	0.192	0.036*	-0.007	NS
PCR (mg/dL)	0.170	NS	-0.156	NS
HCY (μmol/L)	0.187	0.039*	0.168	0.044*

Test correlación de *Pearson*, * $p < 0.05$. NS: no significativo.

Tabla 34. Relación de los 8-ISOP con variables EO.

Variable	SOP		Control	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Alb (g/L)	0.009	NS	-0.119	NS
BIL _T (mg/dL)	0.077	NS	-0.006	NS
BIL _D (mg/dL)	0.114	NS	0.070	NS
BIL _I (mg/dL)	0.013	NS	-0.034	NS
Ác. URI (mg/dL)	0.089	NS	-0.078	NS
TAC (mmol/L)	-0.329	0.018*	-0.219	<0.01*
VitA (µg/L)	0.071	NS	-0.005	NS
VitE (µg/L)	0.110	NS	0.075	NS
Fe (µg/dL)	0.028	NS	-0.078	NS
SE (µg/L)	-0.273	0.037*	-0.215	<0.01*
Cu (µg/L)	0.185	0.042*	0.002	NS
Zn (µg/dL)	0.107	NS	-0.063	NS

Test correlación de *Pearson*, **p*<0.05. NS: no significativo.

5.2.7 Análisis de curvas ROC

Se llevó a cabo un análisis de curvas ROC para determinar la habilidad de los diferentes parámetros solos y en combinación para predecir SOP. La tabla 35 presenta las ABC y las sensibilidades a las especificidades predefinidas del 90%, 95%, y 98% de todos los parámetros y combinaciones que fueron estadísticamente significativos en el test *t* de Student, y cuyas ABC son mayores de 0.750 (el resto de parámetros mostró ABC<0.750). De los marcadores individuales, la MULLE tuvo las sensibilidades más altas para detectar SOP, 61.5%, 39.9% y 29.1% para las correspondientes especificidades del 90%, 95% y 98%. El resto de marcadores presentaron sensibilidades más bajas que la MULLE cuando se analizaron como marcadores únicos.

Las combinaciones de MULLE+B_T y MULLE+8-ISOP obtuvieron las sensibilidades más altas de todas las combinaciones duales, obteniéndose una sensibilidad del 69.2%, 56.0% y 40.0% a las especificidades del 90, 95% y 98% respectivamente para la combinación de MULLE+B_T, y una sensibilidad del 64.8%, 52.8% y 48.0% a las especificidades del 90%, 95% y 98% respectivamente para la combinación de MULLE+8-ISOP.

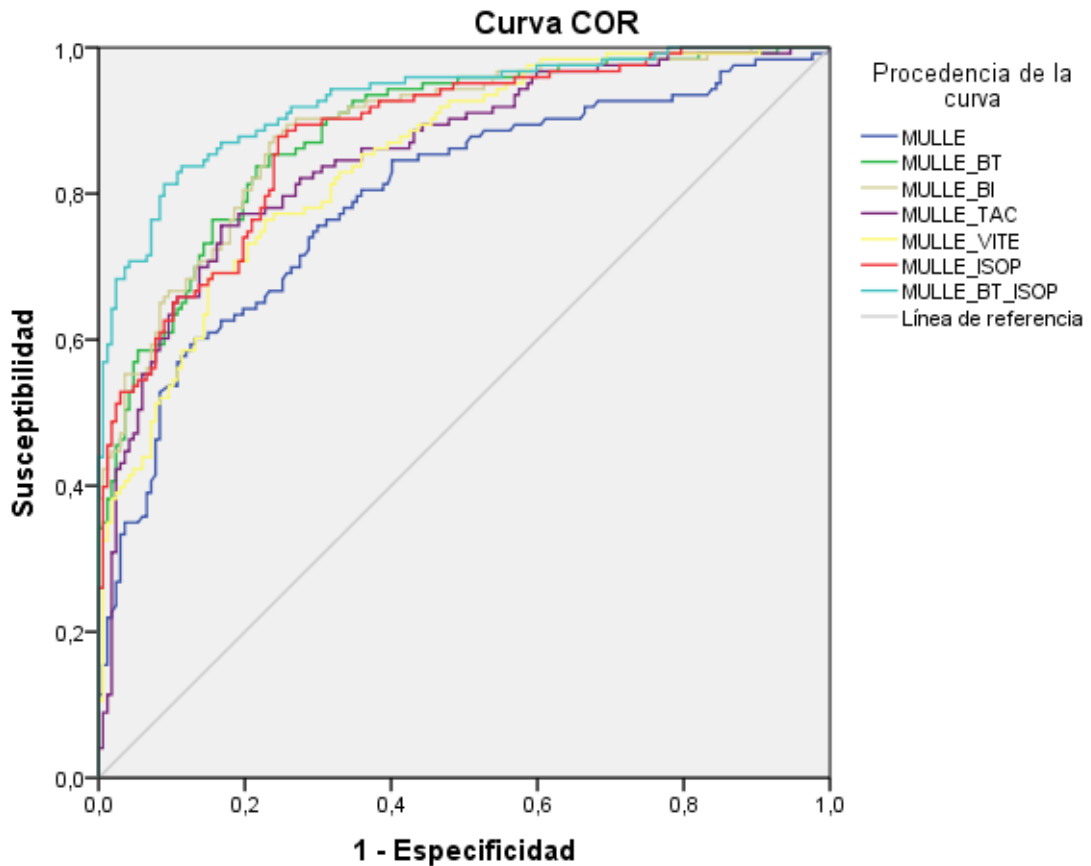
La combinación de MULLE+B_T+8-ISOP obtuvo una ABC de 0.923 (0.892-0.954) y con las sensibilidades más altas, 81.6%, 69.6% y 63.2% a las especificidades del 90, 95% y 98% respectivamente. Esta combinación añadió 20.1%, 29.7% y 34.1% a las sensibilidades de la MULLE como marcador único a las especificidades del 90, 95% y 98% respectivamente. A la combinación de MULLE+B_T añadió 12.4%, 13.6% y 23.2% a las sensibilidades de la MULLE como marcador único a las especificidades del 90, 95% y 98% respectivamente, y a la combinación de MULLE+8-ISOP añadió 3.3%, 12.9% y 18.9% a las sensibilidades de la MULLE como marcador único a las especificidades del 90, 95% y 98% respectivamente.

La curva ROC para la MULLE como único marcador predictivo de SOP resultó un ABC de 0.808 (95% IC; 0.754-0.861). Las curvas ROC para las combinaciones de MULLE+B_T y MULLE+8-ISOP obtuvieron unas ABC de 0.884 (95% IC; 0.846-0.922) y 0.868 (95% IC; 0.827-0.910) respectivamente. La curva ROC para la combinación de MULLE+B_T+8-ISOP obtuvo un ABC de 0.923 (95% IC; 0.892-0.954), mostrando un valor más alto que el obtenido para la MULLE y las otras dos combinaciones y existiendo diferencias estadísticamente significativas entre dichas ABC ($p<0.05$). Figura 5.

Tabla 35. Modelo de validación cruzada de regresión logística dejando uno fuera con una sensibilidad a las especificidades establecidas del 90%, 95% y 98%.

Marcador y combinación de marcadores	Control vs. SOP				
	ABC (95% IC)	Sensibilidad cruzada validada al:			<i>p</i>
		90% Especificidad	95% Especificidad	98% Especificidad	
BIL_T (mg/dL)	0.802 (0.745-0.860)	59.2%	39.4%	23.2%	<0.001*
BIL_I (mg/dL)	0.799 (0.742-0.855)	56.3%	35.2%	20.4%	<0.001*
TAC (mmol/L)	0.746 (0.863-0.808)	38.0%	29.6%	13.4%	<0.001*
VitE (µg/L)	0.754 (0.692-0.815)	41.5%	21.1%	13.4%	<0.001*
8-ISOP (pg/mL)	0.768 (0.706-0.829)	51.0%	34.0%	30.0%	<0.001*
MULLE (ng/mL)	0.808 (0.754-0.861)	61.5%	39.9%	29.1%	<0.001*
MULLE + BIL_T	0.884 (0.846-0.922)	69.2%	56.0%	40.0%	<0.001*
MULLE + BIL_I	0.863 (0.848-0.924)	64.6%	52.4%	44.0%	<0.001*
MULLE + TAC	0.850 (0.806-0.884)	64.8%	46.4%	30.4%	<0.001*
MULLE + VitE	0.841 (0.796-0.885)	55.2%	41.6%	37.6%	<0.001*
MULLE + 8-ISOP	0.868 (0.827-0.910)	64.8%	52.8%	48.0%	<0.001*
MULLE + BIL_T + 8-ISOP	0.923 (0.892-0.954)	81.6%	69.6%	63.2%	<0.001*

**p*<0.05.



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

Figura 5. Curva característica operativa del receptor (ROC) de MULLE, MULLE+B_T, MULLE+B_I, MULLE+TAC, MULLE+VitE, MULLE+8-ISOP y MULLE+B_T+8-ISOP. Se utilizaron modelos de regresión logística para identificar combinaciones de estos biomarcadores que distinguirían a los pacientes con SOP. El método *DeLong* (299) se utilizó para comparar estadísticamente las ABC mayores.

6 DISCUSIÓN

El SOP es una importante causa de irregularidades ovulatorias y menstruales y de exceso de andrógenos en la mujer, afectando en torno al 10% de las mujeres de edad fértil (12). Los resultados de nuestro estudio confirman una vez más las características clínicas bien reconocidas que se presentan en dicho síndrome: aumento del IMC, signos de virilización y alteraciones menstruales.

La prevalencia de la obesidad varía mucho en todo el mundo; Sin embargo, estudios en diferentes países con tasas significativamente diferentes de obesidad (30-70%) han reportado tasas similares para la prevalencia de SOP (22) que coinciden con nuestros datos: un 29% de las mujeres con SOP presentaban obesidad, frente al 8% en el grupo de mujeres sanas. Se desconoce la incidencia de SOP junto con la creciente epidemia de obesidad, aunque se ha informado de una tendencia modesta pero no significativa en la prevalencia de SOP con aumento del IMC (300).

En nuestro estudio, las mujeres diagnosticadas de SOP presentaron mayor grado de hirsutismo en comparación con las mujeres control, con una prevalencia (89%) un poco superior a la descrita en la literatura (74%) (301). Este incremento en cuanto a la prevalencia de hirsutismo, podría deberse a la subjetividad de los síntomas, a pesar de la evaluación semicuantitativa proporcionada por la escala de *Ferriman-Gallwey*. De hecho, muchos autores consideran que la única queja de crecimiento de vello no deseado en ausencia de hirsutismo franco en el examen físico, puede señalar la presencia de SOP.

La prevalencia de acné en el SOP es variable (14-25%), con algunas diferencias en cuanto a la etnia y a la edad (302). En nuestro estudio el acné fue más frecuente entre las mujeres con SOP, con una prevalencia (43.8%) mayor a la mencionada. Pero es que el acné también tiene su parte de subjetivismo, y está lejos de ser un signo específico del SOP, especialmente entre adolescentes.

Respecto a la alopecia, nosotros no encontramos diferencias entre mujeres con SOP y controles, lo que puede deberse a que la alopecia androgénica en

menos frecuente y tardía. Además, algunos estudios encuentran que el acné y la alopecia androgénica no son buenos marcadores de HA en el SOP, comparado con el hirsutismo (301, 303).

El 77% de las mujeres con SOP presentó alteraciones menstruales frente al 32% de las mujeres control, lo que se asemeja a los datos arrojados en el informe de trabajo de la AE-PCOS Society, según el cual hasta el 85% de mujeres con SOP tienen evidencia clínica de irregularidades menstruales (1). Sin embargo, la clasificación de la Organización Mundial de la Salud es mucho más sensible, con una prevalencia de OA del 51% (304). Creemos que una definición más estricta de OA, como la de *Van Hooff et al. (2004)*, según la cual <8 menstruaciones y/o ≥ 2 ciclos para <22 o >42 días por año, es necesaria para mejorar el diagnóstico del SOP. Con esta definición, la prevalencia de OA cae al 14% y la OA se convierte en altamente predictivo de SOP (305).

Nuestros resultados coinciden con estudios epidemiológicos que han mostrado una alta prevalencia de hipertensión en el SOP, particularmente de hipertensión sistólica y 2.5 veces mayor probabilidad de desarrollar hipertensión en la menopausia las mujeres con SOP que los controles, y que podría deberse en parte a la obesidad asociada al síndrome. (306). Sin embargo, en un estudio retrospectivo de una cohorte de mujeres con SOP no se confirmó la alta incidencia de hipertensión (307). La disfunción endotelial, debida al incremento de los niveles de endotelina-1 en mujeres con SOP sin tener en cuenta el IMC ni el alto nivel de andrógenos, ha sido propuesta como mecanismo potencialmente patogénico de hipertensión en SOP (80).

En cuanto al perfil bioquímico general, solamente encontramos diferencias significativas en los niveles de GPT y GGT, aunque en ambos casos los niveles fueron normales. *Karoli et al. (2013)* también hallaron diferencias en los niveles de GPT, GOT y GGT en pacientes con SOP. Sin embargo, en su caso estos niveles sí que fueron patológicos. Debido a que actualmente se calcula que alrededor del 50% de las mujeres con SOP presentan hígado graso no alcohólico (HGNA), y que es considerado una complicación más del SOP (308), estos autores proponen que la evaluación de la enfermedad hepática debería

ser considerada en edad temprana en las mujeres con SOP, particularmente en aquellas con evidencia de SMet (309), puesto que la obesidad y la RI son factores contribuyentes del HGNA (310). En nuestro caso los niveles de GOT fueron similares en ambos grupos, pero como es bien sabido, esta transaminasa es menos específica del tejido hepático.

A nivel hormonal encontramos diferencias significativas en la LH, T_T , T_L , ANDRS y FAI, cuyos niveles fueron más elevados en las mujeres con SOP. Al mismo tiempo, los niveles de SHBG y FSH fueron más reducidos en éstas que en las mujeres control. Estos datos reafirman una vez más la presencia de HA como punto clave del SOP (32). Aunque la testosterona sea el andrógeno más conocido y medido, numerosos modelos abogan por medir los niveles de T_L por ser mucho más sensibles que la medida de la T_T en el diagnóstico de desórdenes hiperandrogénicos. El FAI, el cual requiere sólo de la medida de T_L y SHBG, es recomendado por la mayoría de autores y parece ser el índice biológico más sensible de HA. En nuestro caso, los tres marcadores fueron diferentes entre ambos grupos.

La DHEAS, que se usa como marcador del exceso de andrógenos adrenal, puesto que el 98% es de origen adrenocortical (311), se ha visto aumentado en mujeres con SOP (312). Sin embargo, en nuestro estudio no hubo diferencia significativa en cuanto a los niveles de dicha hormona. Esto puede deberse a que el nivel de este esteroide disminuye con la edad, y si no se ajustan los valores de referencia a la edad puede provocar prevalencias de DHEAS más bajos (313). Además, se ha reportado que la fuente predominante de sobreproducción de andrógenos en mujeres con hirsutismo y SOP es la ovárica más que la adrenal (314).

Desde hace décadas se conoce también que las mujeres con SOP presentan alteración en los niveles de gonadotropinas, siendo más elevado el cociente LH/FSH (315, 316). Nuestros resultados verifican esta alteración hormonal, con niveles altos de LH y niveles bajos o normales de FSH en dichas mujeres. Se ha referido por un lado un aumento de la frecuencia del pulso de la GnRH que estimularía la producción excesiva de LH en las células de la teca. No está

claro si esto es debido a una anomalía intrínseca en el pulso generador de GnRH o causado por los niveles bajos de PRG que resultan de la alteración de los eventos ovulatorios en el SOP. Por otro lado, la genética también jugaría su papel, ya que el aumento del ritmo pulsátil hipotalámico de la GnRH favorece la transcripción de la subunidad- β de LH por encima de la de la subunidad- β de la FSH (28).

Cuando la concentración de LH es superior a la de FSH, los ovarios sintetizan preferentemente más andrógenos que estrógenos. En nuestro estudio las mujeres con SOP experimentaron una hiperandrogenemia superior, pero el nivel de E_2 no se vio significativamente reducido con respecto a los controles, al igual que en otras investigaciones (317). Y es que el nivel de estrógenos puede estar compensado por la aromatización de andrógenos. No obstante, algunos autores sí que han informado de niveles disminuidos en este tipo de paciente (318, 319).

Está ampliamente reconocido que las mujeres con SOP presentan elevadas concentraciones séricas de MULLE (320, 321). Nosotros también coincidimos con esto, ya que en nuestro caso los niveles de dicha hormona fueron de más del doble en el grupo de mujeres con SOP (7.03 ± 4.92 ng/mL) que en el de las mujeres control (3.16 ± 2.14 ng/mL).

En cuanto al metabolismo de hidratos de carbono, nuestras pacientes con SOP y controles mantuvieron unas concentraciones similares de glucemia. Sin embargo, las primeras presentaron niveles superiores de insulina y HOMA-IR, lo que se traduce en unos índices de sensibilidad insulínica disminuidos, y una mayor resistencia a la acción de esta hormona, en concordancia con la multitud de trabajos previos que demuestran una alteración en la acción, y quizá en la secreción insulínica, inherente al síndrome (322).

La dislipemia es una consecuencia metabólica común de la obesidad y del SOP. Nuestros datos coinciden con los numerosos estudios en los que se ha demostrado la alteración del perfil lipídico en dicho síndrome (323), ya que el grupo de mujeres con SOP mostró niveles más elevados de TG, ratio C_{7}/HDL -

Ce índice LAP, y niveles más bajos de HDL-C que el grupo control. El ratio ApoB/ApoA1 fue también más alto en pacientes con SOP, lo que coincide con otras investigaciones (324). *Bayram et al. (2012)* no encontraron diferencias en los niveles de las apolipoproteínas entre las mujeres con SOP y mujeres sanas, pero su estudio incluyó a un número muy pequeño de sujetos (325). Este ratio refleja el estado pro y anti-aterogénico de las lipoproteínas y puede servir como un buen marcador para evaluar el RCV en este tipo de paciente.

En nuestro estudio, las mujeres con SOP presentaron niveles más altos de PCR que las mujeres control. Esto coincide con numerosas investigaciones que han mostrado un incremento significativo en los niveles de PCR (326) y de ciertas citoquinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6, interleucina-1 e interleucina-8, en mujeres con SOP comparado con controles de similar IMC (327-331). Este estado crónico de inflamación, relacionado con la RI, al que están sometidas las mujeres con SOP es bien sabido y ampliamente reconocido. Sin embargo, un meta-análisis realizado recientemente sugiere que ciertos polimorfismos presentes en los genes que codifican para estas citoquinas no estarían asociados con el riesgo de padecer SOP (332).

Las mujeres con SOP de este estudio presentaron niveles superiores de HCY, un factor de riesgo de arteriogénesis y daño vascular crónico. *Badawy et al. (2007)* también encontraron niveles mayores de dicho aminoácido en mujeres con SOP, además de una fuerte asociación entre este aminoácido y la RI, ya que más del doble de mujeres con SOP insulinoresistentes tenían niveles más altos de HCY que aquellas con SOP sin RI (333). En cambio, *Sills et al. (2001)* no encontraron correlación entre SOP y HCY, aunque esto pudo deberse a que reclutaron mujeres acorde solo al criterio ecográfico para diagnóstico de SOP (334).

Tal y como se ha mencionado anteriormente, el EO se relaciona con el SOP y podría jugar un papel muy importante en su fisiopatología.

En cuanto a los parámetros estudiados con capacidad antioxidante, los niveles de ALB, AU y VitA fueron similares en ambos grupos, mientras que el nivel de BIL_T, BIL_I, TAC y VitE fueron significativamente inferiores en las mujeres con SOP.

A pesar de su propiedad antioxidante, llevada a cabo a través de su capacidad para unir iones de metales de transición (Cu y Fe esencialmente) (335), nosotros no encontramos diferencias en el nivel de ALB entre las pacientes con y sin SOP. La producción de ROS puede dar como resultado cambios estructurales N-terminales en la ALB, especialmente en la secuencia de N-Asp-Ala-His-Lys, generando así albúmina modificada por isquemia (IMA). Existen datos de valores elevados de IMA en pacientes con SOP (336), además de una correlación entre la IMA sérica y los niveles de testosterona que podrían influir en la calidad de los ovocitos a través de alteraciones en el equilibrio de factores de líquido folicular críticos en el microambiente folicular (317).

El complejo BIL-ALB actúa como un inhibidor de la peroxidación lipídica, representando así el papel indirecto antioxidante de la ALB (337). Como ya se ha mencionado, observamos diferencias significativas en cuanto a los niveles de BIL, que fueron menores en el grupo de las pacientes con SOP. La capacidad antioxidante de la BIL es más fuerte que la de la VitE, CAT y SOD. No tenemos constancia de datos acerca de niveles de BIL en el SOP, pero hay evidencia sobre el efecto protector de los niveles leve a moderadamente altos de ésta, los cuales se asocian con un mejor pronóstico de enfermedades relacionadas con el EO, como enfermedad isquémica cardiovascular, enfermedad del Alzheimer y la lesión por I/R, sugiriendo que la producción incrementada de BIL es una respuesta adaptativa contra la oxidación (338, 339).

Las pacientes con SOP de este estudio mostraron niveles inferiores de VitE y VitA, aunque solo la VitE presentó diferencias significativas entre ambos grupos. Ambas vitaminas pertenecen al equipo antioxidante exógeno del organismo humano, sin embargo, el beneficio potencial de la VitE, el principal antioxidante en la fase lipídica, es mayor que el de la VitA. Nuestros datos

coinciden con el trabajo de *Zhang et al. (2008)* en el que se encontraron también niveles disminuidos de VitE en mujeres con SOP (340). En otro estudio los niveles de dicha vitamina fueron menores en mujeres con SOP que presentaban problemas de fertilidad en comparación con las mujeres control, si bien, este nivel resultó aún menor en un tercer grupo de mujeres también con problemas de fertilidad pero sin SOP, defendiendo así la idea del papel que juega el EO en el sistema reproductivo (341). Por el contrario, en otra investigación que se evaluaron los niveles de VitE durante los primeros cuatro días de la estimulación ovárica, no se encontraron diferencias en los niveles de esta vitamina entre los grupos de mujeres con SOP y mujeres control ni entre los diferentes días de la estimulación; aunque hay que señalar que el número de pacientes incluidas en el estudio fue mínimo (342).

Además de la evidencia del estado hipovitamínico de las mujeres con SOP, se ha demostrado el papel antioxidante de la VitE en pacientes diabéticos por su actividad de eliminación de RL fuera de la célula a través de mecanismos no enzimáticos (343). Recientemente, *Chatziralli et al. (2017)* han demostrado que la ingesta de VitE en pacientes con DMT2 disminuye los niveles séricos de MDA, sugiriendo su papel protector ante la retinopatía diabética que sufren dichos pacientes (344). También se ha hipotetizado los efectos beneficiosos de las vitaminas antioxidantes en el retraso de la aparición de enfermedades neurodegenerativas. En un estudio se encontró evidencia de calidad moderada de la VitE para retardar el declive funcional en la enfermedad de Alzheimer (345). En el tratamiento de algunos cánceres, como próstata (346) y mama (347) también se han encontrado efectos beneficiosos de la VitE. En cuanto al uso de estas vitaminas antioxidantes en el tratamiento del SOP, algunos autores han demostrado que los ácidos grasos omega-3 junto con la VitE durante 12 semanas en mujeres con SOP mejoraron significativamente los índices de RI, T_T y T_L (129, 348). Otro estudio reciente ha demostrado el efecto beneficioso de la suplementación simultánea de VitE y magnesio durante 12 semanas sobre el hirsutismo y los niveles plasmáticos de PCR, NO y TAC (349).

Se midió la TAC con el fin de conocer el estado antioxidante general de las participantes del estudio, ya que ésta mide la capacidad antioxidante en conjunto de todas las sustancias presentes en el suero humano con esta propiedad. La TAC sérica proporciona información válida para la evaluación de la condición de EO, pero existe controversia respecto a los niveles de TAC en mujeres con SOP. Nuestros resultados confirman la disminución de dicha capacidad antioxidante del suero en las pacientes con SOP respecto a los controles. Acorde con esto, *Mori et al (2015)*, también encontraron niveles reducidos de TAC en mujeres iraníes con SOP (350), y el estudio de *Jamilian et al. (2017)* mostró niveles inferiores de TAC en pacientes con SOP y, además demostró cómo tras doce semanas de suplementación con carnitina oral, un compuesto con efectos antioxidantes que previene la acumulación de productos finales de la peroxidación lipídica, los niveles séricos de TAC aumentaban (351). Sin embargo, en un meta análisis que incluyó a 470 mujeres (260 mujeres con SOP y 210 controles) no encontraron diferencias en los niveles de TAC entre ambos grupos (138). Aunque en dicho meta análisis no se encontró diferencias en la TAC, el descenso en los niveles de sustancias antioxidantes como el glutatión y la paroxinasa-I en paralelo con el incremento de otras moléculas oxidantes como la HCY y MDA, sugiere un desequilibrio en el estado oxidante de las mujeres con SOP. Y es que dentro del dinamismo del balance oxidativo, se pueden observar sistemas que al analizarlos presenten niveles elevados de oxidación asociados con una respuesta antioxidante eficiente, y por otro lado se puede tener sistemas que al analizarlos se presenten con moderado nivel de daño y deficiente respuesta defensora, indicando que aun con un ataque menor se puede tener mucho daño al no tener una respuesta eficiente; por lo que la evaluación única e independiente del estado prooxidante o del fenómeno antioxidante, puede propiciar errores de interpretación y limitaciones para su aplicación clínica. Otro estudio también demostró también incremento en dichos niveles tras la administración de 2 gramos diarios de L-carnitina durante tres meses en pacientes con DMT2 y 1 gramo diario durante tres meses en pacientes con enfermedad coronaria (352).

En el caso de los metales estudiados, encontramos unos niveles significativamente aumentados de Fe y Cu en las pacientes con SOP. En el

caso del SE y Zn encontramos niveles disminuidos en las pacientes con SOP, aunque solo el Zn presentó significación estadística.

El Fe libre es un metal altamente tóxico que participa, a través de la reacción de *Fenton*, en la formación de RL que incluyen hidróxido y aniones superóxido, contribuyendo así al EO (353). Nuestros resultados coinciden con la investigación de *Li et al. (2017)* en la que se encontraron también niveles más elevados de Fe en mujeres con SOP respecto a los controles (354). Un estudio reciente en el cual se midieron distintos parámetros del metabolismo del Fe (Fe, capacidad de unión del Fe y FERRI) demostró que existe un exceso de Fe en mujeres con SOP frente a los controles y que no se correlaciona con un defecto en la producción de la hepcidina (proteína que secreta el hígado en respuesta al incremento de Fe, actuando como un regulador negativo de la absorción intestinal de éste) (355). Así mismo, en nuestro estudio, la FERRI, almacén de Fe y proteína reactante de fase aguda indicadora de inflamación, fue también más alta en el grupo de mujeres con SOP con respecto a los controles, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Esto coincide con los resultados de varias investigaciones donde también se han encontrado niveles elevados de dicha proteína en pacientes con SOP (356), indicando una vez más ese estado de inflamación crónica al que están sometidas estas pacientes.

Al igual que nuestros resultados, las pocas investigaciones que han estudiado los niveles de Cu en el SOP demuestran niveles elevados de dicho metal en el suero de estas mujeres (209, 219, 220). Sin embargo, recientemente un estudio en mujeres sudanesas con SOP reveló niveles de Cu sólo un poco más altos en este grupo en comparación con los controles, y dicha diferencia no fue estadísticamente significativa, pero la investigación incluyó un pequeño tamaño muestral (357). Fisicoquímicamente, el Cu se considera prooxidante y oxidante metálico. Existe ambigüedad en cuanto a la actividad de este metal. Por un lado, un nivel bajo de Cu puede conducir a la disminución de la actividad de la SOD y aumentar secuencialmente las generaciones de radicales superóxido, incrementando el EO. Por otro lado, un alto nivel de Cu puede conducir a la generación de ROS a través de la reacción de *Fenton* y la reducción de los

niveles de glutatión (358). Recientemente, *Sun et al (2019)*. han indicado que el aumento de los niveles de Cu en el líquido folicular podría afectar al desarrollo del folículo en pacientes con SOP, y el mecanismo podría estar relacionada con anomalías inducidas por este metal en la esteroidogénesis (359).

En el caso del Zn los resultados de los estudios hasta la fecha son muy heterogéneos, uno de ellos encontró niveles significativamente más altos de Zn en el SOP (209), en un segundo estudio los niveles más altos se presentaban en el grupo control (225), y en otros dos estudios no se encontraron diferencias en los niveles entre ambos grupos (209, 357). En un meta-análisis que incluyó estos estudios, 220 mujeres con SOP y 109 mujeres control, no mostró diferencias estadísticas en la media de Zn entre los grupos SOP y control (360). Sin embargo en otro meta-análisis reciente que incluyó ocho estudios con 552 mujeres con SOP y 464 controles se determinó niveles más bajos en el grupo de SOP (361). El Zn actúa como antioxidante al proteger los grupos sulfidrilo de diferentes proteínas y enzimas contra los RL. Teniendo en cuenta el estatus oxidativo que viene observándose en las mujeres con SOP, parece lógico que sus niveles de Zn se encuentren disminuidos.

El nuevo hallazgo de este estudio fue que los niveles séricos de 8-ISOP fueron significativamente más altos en pacientes con SOP en comparación con controles sanos. Estas observaciones sugieren un aumento de EO en el SOP. Aunque se han estudiado otros marcadores de peroxidación lipídica en el SOP, como MDA o lipoproteína de baja densidad oxidada (138, 362, 363), no tenemos conocimiento de otras investigaciones que hayan evaluado 8-IsoP como marcador de EO en pacientes SOP hasta la fecha. La determinación de 8-ISOP es un importante paso hacia el estudio de RL, particularmente como marcador de peroxidación lipídica, ya que, como se mencionó anteriormente, ellos reflejan daño y estado oxidativo in vivo y sus niveles no están influidos por la ingesta lipídica.

Son numerosos los estudios que han demostrado que los parámetros de EO eran más altos en la población con SOP (138, 152, 364), a través del aumento de las concentraciones de varios precursores y subproductos de EO en estas pacientes en comparación con los controles y la disminución de algunos

marcadores antioxidantes circulantes, lo que concuerda con los resultados de nuestro estudio, niveles aumentados de marcadores de oxidación (8-ISOP, Cu, Fe, TAC) y también niveles disminuidos en el caso de sustancias antioxidantes (VitE, VitA, TAC, SE, Zn).

Por otra parte, se realizó una evaluación para analizar el estado de los biomarcadores de estrés oxidativo en función del peso, RI y SMet, patologías muy frecuentes en SOP.

El EO está presente en los pacientes obesos mórbidos de manera muy evidente, habiéndose definido la obesidad como un estado inflamatorio crónico en el que el EO sería el posible nexo de unión con sus comorbilidades asociadas (hipertensión arterial, diabetes arterioesclerosis, entre otras) (365). Se ha demostrado que el tejido adiposo en pacientes obesos desarrolla un entorno inflamatorio que conduce a un EO, el cual sería un potencial inductor de la susceptibilidad a la obesidad y patologías asociadas. Una posible explicación es quizás que el origen sea intrínseco al propio tejido adiposo, siendo la hipoxia el factor desencadenante que ocasionaría un proceso inflamatorio inducido por agrupaciones de adipocitos modificados que se convertirían en una fuente secretora de citoquinas inflamatorias (286) que inducen la producción de ROS, generando EO y, a su vez, una producción importante e irregular de otras adipokinas (366). Además, existen otros mecanismos a través de los cuales el EO se asocia a la obesidad, como la generación de superóxidos a partir de NADPH oxidasas, fosforilación oxidativa, autooxidación de gliceraldehído, activación de proteínas kinasas y de la vía de los polioles y de las hexaminas (367).

En nuestro estudio los valores de las sustancias antioxidantes, BIL, VitE, SE y TAC fueron significativamente más bajos en las mujeres con SOP frente a los dos subgrupos control, normopeso y con sobrepeso. No encontramos diferencias significativas dentro de los grupos SOP y control entre los grupos de mujeres normopeso y mujeres con sobrepeso, lo que indica que la obesidad no sería un factor influyente por sí sólo en los parámetros de EO. Sin embargo, *Molnar et al. (2004)* confirmaron que existía una correlación negativa entre la

VitE y la obesidad en población infantil (368). En relación a los niveles séricos de SE, el estudio SU.VI.MAX llevado a cabo en una muestra de 13.017 adultos en Francia estableció también una correlación negativa con el IMC en mujeres (369).

De forma similar sucedió con los niveles de Cu y de 8-ISOP. Encontramos diferencias significativas entre los grupos SOP y control, normopeso y con sobrepeso. Aunque los niveles más altos se encontraron en el grupo de mujeres con SOP y sobrepeso, la diferencia entre dicho grupo y el de mujeres con SOP y un peso normal no fue estadísticamente significativa. *Bougoulia et al. (2006)* encontraron niveles más elevados de 8-Isop en el grupo de mujeres obesas que mejoraban tras la pérdida de peso (370). En cuanto a los niveles séricos de Cu en pacientes obesos, *Lima et al. (2006)* observaron un aumento de la concentración plasmática de Cu en el grupo de obesos, si bien las concentraciones intracelulares no estaba afectadas (371).

Estos resultados coinciden con diversos estudios realizados en pacientes con SOP que señalaron la presencia de niveles aumentados de marcadores de EO, independientemente del exceso de peso. En un estudio reciente se han encontrado niveles elevados de MDA y PCR en ambos grupos de mujeres con SOP, obesas y con peso normal (372). *Di Segni et al. (2017)* midieron marcadores plasmáticos e intracelulares en pacientes con SOP obesas y con peso normal. Su estudio confirmó la presencia de EO en mujeres con SOP independientemente de la obesidad, aunque dicho EO se reveló más en tejido que en plasma (373).

La influencia de la obesidad sobre EO se ve reflejada en numerosos estudios. Recientemente, *Karamali et al. (2018)* demostraron que la reducción del IMC en mujeres con SOP supuso la reducción en los niveles del marcador de EO MDA y el incremento de la enzima antioxidante GSH (374). Un estudio que investigó la TAC en sujetos obesos antes y después del procedimiento quirúrgico (201) concluyó que el EO relacionado con la obesidad puede reducirse mediante la pérdida de peso, ya sea mediante dieta y ejercicio físico o mediante balón gástrico (375). *De Tursi Rispoli et al.* también mostraron

descenso de marcadores de EO en pacientes sometidos a cirugía bariátrica, así como una mejora en las comorbilidades (376).

Podemos resumir así, que la presencia de EO en el SOP es independiente de la obesidad, y que ésta, por si sola, no es la causa principal del aumento de EO en estas mujeres. Sin embargo, dicha obesidad sí que podría influir sobre los niveles de marcadores de EO, elevándolos y agravando dicho estado oxidativo.

La RI, definida como un estado metabólico caracterizado por una disminución en la capacidad para responder a la señal de la insulina, parece ser un mecanismo esencial involucrado en la fisiopatología del SOP. Existe evidencia en la bibliografía de la relación existente entre el EO y la RI (154).

En nuestro estudio, no se apreciaron diferencias entre la mayoría de sustancias antioxidantes estudiadas entre grupos en función de la presencia o no de RI. Solamente en el caso del Zn, aparte de la diferencia entre los grupos SOP y control, sí que se observaron diferencias en sus niveles entre las mujeres con SOP sin RI y aquellas con SOP con RI. Estos datos concuerdan con la investigación de *Guler et al. (2014)* en la cual se encontraron también valores de Zn más bajos en mujeres con SOP y RI, independientemente de la obesidad (225). La evidencia sugiere que el Zn está asociado con la RI y la diabetes (377). El Zn participaría en el metabolismo de la glucosa a través de la síntesis de insulina, almacenamiento, secreción y señalización. Dicho metal *per se* tiene una actividad similar a la insulina al unirse al receptor de ésta. Estudios *in vitro* informaron que la insulina se combina con Zn y conduce a un aumento en la solubilidad de aquella y en su afinidad por los receptores (378). Por lo tanto, la deficiencia de Zn podría conducir a trastornos relacionados con la RI como el SOP. Se ha demostrado que la administración de suplementos de Zn mejoró exitosamente la homeostasis de la GLU y redujo la RI (379). En otro estudio reciente, se analizó la asociación entre los niveles séricos de adiponectina y Zn en mujeres con SOP. La adiponectina es un polipéptido sintetizado exclusivamente en el tejido adiposo que regula el metabolismo de la GLU y los AG, participa en la señalización de la insulina y posee propiedades antiinflamatorias. Ellos encontraron una correlación significativa entre los niveles

de adiponectina y los de Zn en estas pacientes (380). Por otra parte, y de manera recíproca, si el Zn es un cofactor de la SOD, un importante marcador antioxidante enzimático en el cuerpo, y la RI produce un aumento en la producción de ROS, esto puede conducir a la deficiencia de Zn.

En el caso de las sustancias oxidantes, encontramos que las mujeres con SOP y RI de nuestro estudio mostraron niveles más elevados de Fe respecto a los controles y a las mujeres con SOP sin RI. La creciente evidencia epidemiológica sugiere que, en la población general, el Fe influye en el metabolismo de la GLU y la sobrecarga severa puede resultar en intolerancia a ésta y diabetes (381). Tal y como han propuesto *Fernández-Real et al. (2002)* (353), el metabolismo del Fe y de la GLU mantiene una diafonía basada en las influencias bidireccionales: el Fe influye en la secreción y sensibilidad de la insulina, y la ésta influye en el metabolismo del Fe. Dicho metal interfiere con la capacidad de la insulina para inhibir la producción de GLU hepática, y tanto la extracción como el metabolismo de la insulina en el hígado se reducen al aumentar las reservas de Fe hepático, lo que lleva a una hiperinsulinemia sistémica (353).

El grupo de mujeres SOP y RI de este estudio obtuvo los niveles de 8-ISOP más elevados. A pesar de no tener constancia de investigaciones de ISOP en mujeres con SOP, existe una clara evidencia de que la peroxidación lipídica, una importante consecuencia del EO y de la sobreproducción de ROS, ha sido vinculada con la RI y la diabetes (382, 383). En el estudio de *Sampson et al. (2002)* se observó incremento en los niveles plasmáticos de 8-ISOP en pacientes con hiperglucemia aguda (384).

En general, nuestros datos sugieren que en el SOP la RI influye sobre el EO. A pesar de que existen evidencias experimentales que sugieren que el EO puede determinar el inicio y la progresión de las complicaciones tardías de la DM, todavía hay controversia sobre si el incremento de este fenómeno sólo es asociativo y no causal (385). Los mecanismos que subyacen a las influencias recíprocas entre RI y EO en SOP aún son poco conocidos. Se ha especulado que un posible mecanismo por el cual el EO cause RI es la oxidación del

transportador de GLU, GLUT4 intracelular, que es dependiente de la señalización de la insulina para mover vesículas a la membrana celular. De hecho, algunos estudios hallaron una disminución de los transportadores GLUT4 en adipocitos de la región subcutánea en mujeres con SOP (386, 387). Además, el EO activa vías de señalización como JNK y IKK β /NF- κ B, p38 MAPK o PKC δ que modulan de forma negativa la vía de señalización de la insulina.

Como se ha referido anteriormente, el SMet es un conjunto de alteraciones metabólicas constituido por la obesidad de distribución central, la disminución del HDL-C, la elevación de los TG, el aumento de la PA y la hiperglucemia.

El SMet aumenta el riesgo de padecer ECV prematura, cuyo sustrato fisiopatológico es la arterosclerosis, conocida como enfermedad macrovascular en el contexto de la DMT2. Entre los posibles mecanismos de desarrollo de arterosclerosis destaca la oxidación de las LDL como estímulo inmunogénico para el reclutamiento de monocitos hacia la pared vascular y la fagocitosis de las LDL oxidadas por los macrófagos.

Cuando se clasificaron a las mujeres según los criterios diagnósticos del SMet, dentro del grupo SOP un 4.8% presentaba anormalidades en el metabolismo de la glucosa, el 8.8% TG elevados y 30.6% HDL-C bajo, el 47.1% obesidad abdominal y el 21.1% HA. En total, cerca del 17% de las mujeres con SOP presentaban SMet, frente al 7% de las mujeres control. Un estudio reciente realizado en población griega que utilizó los mismos criterios que nosotros para diagnosticar SMet, estimó una prevalencia similar de SMet del 12.6% en mujeres con SOP, y entre este grupo se encontró un 7% con anormalidades en el metabolismo de la glucosa, un 10.4% con TG altos y 26.1% con HDL-C bajo, un 72.2% con obesidad abdominal y un 15.7% con HA. Sin embargo estudios anteriores calcularon prevalencias mayores (33-46%) de SMet en el SOP (156, 388), y otro estudio realizado en población checa sólo estimó un 1% (389), aunque todos ellos utilizaron los criterios, y modificaciones posteriores, del National Cholesterol Education Program Adult Treatment Program III (390). La importancia de hacer diagnóstico de SMet radica en que cuando está presente

en un paciente es indicador de un elevado riesgo cardiovascular. Por otra parte, cuando coexisten solamente algunos de los factores simultáneamente (no se cumplen todos los criterios para diagnosticar el síndrome) es una alerta para mantener la vigilancia del paciente. En numerosos estudios se ha confirmado como las mujeres con SOP presentan un perfil metabólico más desfavorable, incluso cuando pacientes y controles son emparejados por peso corporal (92).

Con el fin de establecer la contribución del SMet en el desarrollo de EO, elegimos evaluar pacientes con SOP con y sin SMet, en comparación con grupos control emparejados por edad y peso. En cuanto a las sustancias con capacidad antioxidante, los niveles de BIL_T y TAC fueron significativamente más bajos en los grupos SOP con y sin SMet respecto a los grupos control. Las mujeres con SOP y SMet presentaron el nivel más bajo de VitE en comparación con los grupos control con y sin SMet. EL grupo de mujeres con SOP sin SMet tuvo niveles más bajos de SE en comparación con el grupo de mujeres control también sin SMet.

Por otro lado, los niveles más altos de 8-ISOP se encontraron en el grupo de mujeres con SMet, y esta diferencia fue significativa en comparación con los niveles de los grupos control y del grupo de mujeres con SOP sin SMet. Esto significa que en el contexto del SOP, el SMet estaría relacionado con el desarrollo de EO. Se sabe que el EO generado por el aumento de los ROS o disminución de los sistemas antioxidantes, estimula la producción de citoquinas que inician una respuesta inflamatoria y con ello una alteración en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas.

La evidencia acumulada demuestra la participación del EO como mecanismo fisiopatogénico explicativo de la relación que existe entre la RI, el SMet, la DMT2 y el desarrollo de ECV.

En este estudio, además se evaluaron los niveles de los marcadores de EO según los fenotipos de SOP basados en los criterios de Rotterdam. En cuanto a los niveles de sustancias antioxidantes, las mujeres con el fenotipo D

(OA+MOP) obtuvieron los valores más elevados de VitA, VitE y TAC, mientras que aquellas con el fenotipo B (HA+OA) los niveles más bajos. También se encontraron diferencias significativas en los niveles de Fe y 8-ISOP, siendo éstos más bajos en el fenotipo D, y más altos en el fenotipo C y en el fenotipo B, respectivamente. Estos hallazgos suportan que el HA está fuertemente asociado al incremento de EO en el SOP y coinciden con la investigación de *Zhang et al. (2017)* que estudió el estado oxidativo de 544 pacientes con SOP (319). En el SOP, la TAC y el índice de EO fueron más altos en las mujeres con el fenotipo D, sin HA, y los marcadores de EO se correlacionaron positivamente con la escala de *Ferriman-Gallwey* y el grado de acné. Otros estudios previos también han demostrado que los fenotipos del SOP con HA tienen niveles más altos de MDA comparados con el fenotipo OA+MOP y que el MDA correlaciona positivamente con los niveles de T_T (391, 392).

De acuerdo con nuestros hallazgos, *González et al. (2012)* informaron que la hiperandrogenemia activó y sensibilizó los leucocitos a la GLU y estimuló el EO, como lo demuestran los aumentos en la generación de ROS, la expresión del gen de la subunidad de la NADPH oxidasa p47 y las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico circulante en ayunas y en respuesta a la ingesta de GLU en mujeres delgadas, sanas, en edad reproductiva o en mujeres de peso normal con SOP (393).

El Zn también parece inhibir la actividad de la 5 α -reductasa en la piel, que cataliza la transformación de testosterona en su forma no desaromatizable, la dihidrotestosterona (394), y un estudio informó mejoría sobre la alopecia y el hirsutismo en mujeres SOP después de un corto período de suplementación con Zn (395). Por lo tanto, los niveles más bajos de Zn también podrían estar relacionados con el HA clínico en SOP. En nuestro estudio el fenotipo sin HA obtuvo los valores de Zn más altos, pero dicha diferencia no resultó estadísticamente significativa.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, los factores principales que incrementan el EO en el SOP son la obesidad, la RI y la hiperglucemia; sin embargo, se ha demostrado incremento del EO en mujeres con SOP

normopeso y sin RI, sugiriendo que otros factores podrían contribuir a la producción de ROS en estas mujeres (396). El HA podría ser uno de estos factores influyentes.

En nuestra investigación utilizamos el 8-ISOP como marcador de EO para correlacionarlo con el resto de parámetros. No hubo relación de las variables clínicas con la presencia de EO. Aunque las mujeres con SOP exhibieron niveles más altos de PAS y PAD mientras, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las pacientes con SOP con altos niveles de 8-ISOP y aquellas con niveles normales de 8-ISOP. Esto indica que los niveles de PA no se asocian a los 8-ISOP y que son característicos de los pacientes con SOP independientemente del EO.

Por otra parte, encontramos niveles más altos de T_T , T_L y niveles más bajos de SHBG en el grupo de mujeres con SOP con niveles altos de 8-ISOP en comparación con el grupo con niveles normales de 8-ISOP. *Zhang et al. (2017)* demostraron que los fenotipos con HA tenían niveles más altos de marcadores de EO en comparación con el fenotipo sin HA, y que estos niveles correlacionaban positivamente con los niveles de T_T (319). Al igual que en nuestro estudio, los niveles de 8-ISOP correlacionaron positivamente con los niveles de T_T , T_L y FAI y de manera negativa con los niveles de SHBG. Otro estudio demostró que la hiperandrogenemia activaba y sensibilizaba los leucocitos a la glucosa y estimulaba EO (397). Recientemente, *Condorelli et al. (2018)* concluyeron que el deterioro metabólico en mujeres con SOP podría atribuirse al exceso de andrógenos (398).

Se sabe que el EO juega un papel importante en la patogénesis de varias ECV. La influencia de EO sobre el RCV en el SOP ha sido investigada en varios estudios (362, 363, 399), ya que se ha demostrado que este síndrome está asociado con RCV y metabólico (162, 400).

Las mujeres con SOP con los niveles altos de 8-ISOP exhibieron niveles más altos de TG, índice C_T /HDL-C, LAP, PCR, HCY, insulina e índice HOMA-IR que aquellas mujeres con SOP con niveles normales de 8-ISOP.

Numerosos estudios han demostrado niveles elevados de HOMA-IR en el SOP, y la RI ha sido sugerida como una de las causas más importantes en la etiología del este síndrome (401). En nuestro estudio, además de encontrarse niveles más altos de insulina y HOMA-IR en el grupo de mujeres con SOP, encontramos que el grupo de mujeres con los niveles altos de 8-ISOP mostró niveles más elevados de ambas variables que el grupo de mujeres con SOP con niveles normales de 8-ISOP. Asimismo, la insulina y el HOMA-IR, y la GLU correlacionaron positivamente con los niveles de 8-ISOP. Por tanto, el incremento sérico de 8-ISOP se asocia con la RI presente en nuestras pacientes con SOP. Recientemente, otras proteínas como la resistina, leptina, grelina, quispetina y RBP4, han sido propuestas como nuevos marcadores potenciales de RI en SOP, pero su papel sigue siendo aún controvertido (402).

Niveles elevados de CHO, LDL y TG, y niveles bajos de HDL se asocian de manera independiente con RI y factores de RCV (403). En nuestro estudio, además de encontrarse niveles más altos de TG y niveles más bajos de HDL en mujeres con SOP, aquellas con niveles altos de 8-ISOP tuvieron niveles más altos de la ratio C_T/HDL y TG, y éstos últimos también se correlacionaron positivamente con los niveles de los 8-ISOP. Estos hallazgos sugieren que la dislipemia participa en el camino hacia el SOP, pero sólo los TG son un factor influyente en los cambios de EO en estas mujeres.

La producción de ROS tiene como consecuencia, entre otros procesos, la iniciación de la lipoperoxidación. Los peróxidos lipídicos formados pueden unirse químicamente a proteínas dando lugar a los productos de lipooxidación avanzada ocurriendo así la propagación de la lipooxidación y daño celular. Estos productos de lipooxidación presentan efectos pro-aterogénicos al inducir el incremento en la proliferación de células del músculo liso, el incremento en la apoptosis en las células del endotelio, inducción de la formación de células espumosas a partir de macrófagos, incremento de endotelina-1, incremento de la producción de la matriz, activación de la PCR, así como la inhibición de enzimas antioxidantes.

Varios estudios previos han indicado que el índice LAP podría también ser considerado un mejor predictor de riesgo de ECV que otras medidas antropométricas como el perímetro abdominal y el IMC (404). En nuestro estudio, el IMC, perímetro abdominal e índice LAP fueron más altos en pacientes con SOP, mientras que sólo los niveles del índice LAP fueron más altos en las pacientes con altos niveles de 8-ISOP respecto a aquellas con normal 8-ISOP. Además, los niveles del índice LAP correlacionaron positivamente con los niveles de 8-ISOP. Estos datos sugieren que los niveles altos de perímetro abdominal, IMC e índice LAP contribuyen a la fisiopatología del SOP y a la acumulación lipídica, principalmente abdominal, influyendo sobre los niveles elevados de 8-ISOP. Esto coincide con *Costabile et al. (2015)*, los cuales sugirieron que la obesidad central era independiente del EO, incluso en una población homogénea para adiposidad y riesgo cardiometabólico (405).

En la población general, deficiencias en ApoA1 y niveles elevados de ApoB se correlacionan con un incremento del RCV. Aunque encontramos niveles más altos de ApoA1 en el grupo del SOP, no hubo diferencias en dichas variables respecto al nivel de 8-ISOP. Sin embargo, los niveles de ApoB y la ratio ApoB/ApoA sí que se correlacionaron positivamente con los niveles de 8-ISOP.

Niveles séricos aumentados de PCR y HCY han sido reportados con un factor de riesgo de futuros eventos cardiovasculares (406). Asimismo, los niveles elevados de HCY contribuyen al EO por diversos mecanismos, promoviendo la producción de EROs. En nuestro estudio encontramos PCR y HCY más altas en el grupo de mujeres con SOP. Ambas variables fueron también más elevadas en el grupo de mujeres con SOP con niveles altos de 8-ISOP, aunque sólo la HCY se correlacionó positivamente con los niveles de 8-ISOP. Nuestros datos coinciden con varios autores que han informado de niveles más elevados de PCR y HCY en mujeres con SOP y han sido sugeridos como un riesgo importante e independiente de aterosclerosis precoz y de ECV en comparación con sujetos sanos (407, 408). Marcadores de inflamación, como la PCR, se han sugerido como predictores del RCV, independientemente de otros factores de riesgo (409) y el SMet se asocia con el riesgo de desarrollar ECV y DMT2. Por lo tanto, estos hallazgos demuestran que el EO en el SOP podría ser un signo temprano de RI, síndrome metabólico, y enfermedad

coronaria arterial, lo que incrementa el riesgo de ECV. Asimismo, los 8-ISOP podrían directamente afectar al RCV de mujeres con SOP.

Otro resultado destacable de este estudio fue que los niveles de 8-ISOP se correlacionaron débilmente de manera positiva con el perímetro abdominal, PAS, PAD, índice LAP, TG, LDL-C, ratio C_T/HDL-C, ApoB, ratio ApoB/ApoA, GLU, insulina y HOMA-IR y de manera negativa con el HDL-C. También los niveles de TG, LDL-C y HCY se correlacionaron positivamente y de manera significativa con los niveles de 8-ISOP en el grupo de mujeres control, aunque dichas correlaciones fueron menos fuertes que las del grupo SOP. Estos hallazgos sugieren una vez que el EO aumenta el RCV, independientemente de la presencia de SOP. Sin embargo, niveles elevados de 8-ISOP en mujeres con dicho síndrome incrementan de manera más notable los factores de riesgo de ECV y de una manera más notable.

Las pacientes con SOP tienen niveles más altos de 8-ISOP, los cuales se asocian con la presencia de obesidad, hipertensión, dislipidemia, hiperhomocisteinemia e IR que contribuyen al alto riesgo de ECV. Por esta razón, se ha sugerido que la medición de rutina de los marcadores de EO puede ser una herramienta precisa para identificar el RCV en mujeres con PCOS y puede adoptarse e incluirse en la práctica clínica.

En cuanto a la relación de 8-ISOP con el resto de parámetros de EO, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de mujeres con SOP con altos y normales niveles de 8-ISOP. Únicamente el SE mostró una débil correlación negativa con aquellos en ambos grupos, SOP y control. El SE regula la respuesta inflamatoria, la proliferación y la diferenciación de varias células inmunes. Además, los niveles en sangre de SE están relacionados con una disminución en la producción de ROS al actuar como cofactor de la GPx; por lo que dicho metal parece tener un papel protector contra los trastornos asociados con el EO, incluidas las enfermedades cardiovasculares. El único estudio disponible hasta la fecha que ha investigado la relación del SE con el SOP informó niveles más bajos de dicho metal en el grupo de mujeres con SOP en comparación con los controles (222). Los ISOP pudieran ser

producidos preferentemente bajo condiciones de EO. Por ejemplo, en un estudio realizado en ratas deficientes de VitE y SE se reportaron niveles elevados de ISOP, así como en humanos que perfunden después de terapia trombolítica (410).

El análisis de la curva ROC mostró que MULLE fue el mejor marcador individual para el diagnóstico de SOP con un ABC de 0.792. El valor de corte fue de 5,17 ng/mL, con una especificidad del 83,8% y una sensibilidad del 62,2%. Son numerosas las investigaciones que defienden el nivel sérico de MULLE como buen predictor del SOP y como herramienta útil para el diagnóstico de este síndrome (411). Sin embargo, a la hora de establecer el punto de corte óptimo para el diagnóstico de SOP se encuentran discrepancias (412, 413). Un metanálisis mostró la capacidad de la MULLE en el diagnóstico del SOP de acuerdo con los criterios de Rotterdam, lo que sugiere que el ABC de MULLE varió entre 0,664 y 0,973 (414). *Safier et al. (2016)* informaron que la especificidad y la sensibilidad de la MULLE sérica fueron mayores en el diagnóstico del SOP cuando el valor de corte era de 5 ng/mL (415). Otros investigadores también han comunicado que el nivel sérico de MULLE es un buen predictor cuando el valor de corte era superior a 6 ng/mL (416, 417) y otros informaron un valor de corte inferior a 4,5 ng/mL (414, 418-420). *Jamil et al. (2016)* han publicado que existen diferencias significativas en los índices antropométricos, hormonales y metabólicos entre las diferentes variantes del SOP (421). Recientemente, *Sova et al. (2019)* han señalado dicho punto de corte en 5.9 ng/mL con una especificidad alta (83%) pero una sensibilidad inferior (67%) (422). Este amplio rango de resultados en cuanto al punto de corte de MULLE probablemente se deba a diferencias en los sujetos y los métodos de ensayo.

El análisis de múltiples biomarcadores en este estudio demuestra que la adición de B_T o 8-ISOP a la MULLE proporciona una mayor potencia diagnóstica para el diagnóstico del SOP en comparación con la obtenida solo por la MULLE, con un ABC de 0,884 y una sensibilidad del 83.2% y una especificidad del 78.7% para la combinación MULLE+B_T, y una ABC de 0.868 y una sensibilidad del 84% y una especificidad del 76.3%. La combinación de

MULLE, B_T y 8-ISOP proporciona aun una mayor potencia diagnóstica en comparación con la obtenida sólo por la MULLE y las combinaciones de MULLE con B_T y MULLE con 8-ISOP, con un ABC de 0.923 y una sensibilidad del 84.4% y una especificidad del 84%.

Algunos estudios, que realizaron el análisis de la curva ROC de otras hormonas (aparte de MULLE), encontraron que el FAI y la SHBG eran los mejores parámetros (después de MULLE) para el diagnóstico de SOP (416, 423). Por otra parte, el estudio actual encontró que la combinación de MULLE, B_T y 8-ISOP produjo una mayor sensibilidad, en comparación con los niveles de MULLE solo, y la combinación de MULLE con B_T y MULLE con 8-ISOP. Se encontraron diferencias significativas entre el ABC de MULLE y el ABC de la combinación de MULLE con B_T y el ABC de la combinación MULLE con 8-ISOP. También fueron significativas las diferencias del ABC de la MULLE y de las ABC de estas combinaciones duales con el ABC de la combinación de los tres biomarcadores (MULLE, B_T y 8-ISOP). Además, se puede encontrar un pequeño beneficio adicional al combinar MULLE, B_T y 8-ISOP en comparación con el uso de MULLE solo. Nuestro estudio muestra que la MULLE, B_T y 8-ISOP fue la mejor combinación de parámetros para el diagnóstico de SOP, ya que obtuvo el mejor ABC, y esto podría ayudar a los criterios de Rotterdam comúnmente utilizados.

Existen datos epidemiológicos extensos que demuestran una asociación entre niveles más altos de MULLE y SOP, pero no tenemos constancia de información disponible sobre la combinación del nivel de MULLE con otras hormonas y marcadores de EO para el diagnóstico de SOP. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que ha investigado la asociación de MULLE, B_T y 8-ISOP, en conjunto, con SOP.

En resumen, los resultados sugieren que el nivel sérico de MULLE, B_T y 8-ISOP podría representar una prueba útil y práctica para evaluar a la población general en busca de SOP. Se necesitarán de otros estudios futuros para obtener conclusiones definitivas.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Se considera necesario mencionar algunas de las limitaciones de este diseño que han de tenerse en cuenta a la hora de interpretar los resultados:

- 1) Aunque el cálculo del tamaño muestral previo al inicio del estudio, ha permitido obtener una elevada potencia estadística, el número de mujeres reclutadas puede ser considerado relativamente pequeño. Si bien, como se ha comentado las mujeres del grupo control se han seleccionado en términos de similitud en cuanto a edad e índice de masa corporal, como demuestra la ausencia de diferencias estadísticamente significativas en cuanto a edad y características antropométricas basales, el tamaño muestral de este grupo puede haber sido insuficiente para encontrar diferencias en algunas variables.
- 2) Las mujeres con sobrepeso que presentan síntomas derivados del HA, pueden solicitar con más frecuencia una valoración médica por estos motivos, por lo que la estimación de la prevalencia del SOP en este grupo de mujeres podría encontrarse sobreestimada.
- 3) En cuanto a la presión arterial, el hecho de no haber determinado su existencia mediante un método diagnóstico más sensible como es la medición ambulatoria de la presión arterial, puede haber supuesto el no apreciar diferencias relevantes en cuanto a la presión arterial entre los diferentes grupos de las pacientes con SOP.
- 4) La valoración de la existencia de dislipemia en nuestro estudio, se ha limitado a la cuantificación de los lípidos más comúnmente empleados en la práctica clínica habitual, no descartando, por tanto, la existencia de diferencias cualitativas más sutiles en estos parámetros.

- 5) Al analizar la influencia del grado de obesidad en las diferentes variables entre pacientes SOP, el tamaño muestral de alguno de los subgrupos de peso es pequeño, por lo que, pese a que el análisis estadístico ha sido estricto y correcto, cabe tomar precauciones a la hora de extrapolar ciertos resultados a la población general.
- 6) Aunque se han determinado marcadores inflamatorios habitualmente solicitados en la práctica clínica mediante métodos de alta sensibilidad, no se puede descartar la existencia de diferencias en relación a la inflamación crónica entre ambos grupos de pacientes al no determinar otros marcadores involucrados en estos procesos.
- 7) Respecto al RCV, los marcadores empleados en el presente estudio para valorarlo podrían ser insuficientes y poco precisos, ya que existen otros que estudian la pared arterial para identificar la aterosclerosis subclínica (grosor íntima-media carotídea, calcio en arterias coronarias, vasodilatación mediada por flujo, entre otros) y factores de riesgo genéticos mucho más sensibles y específicos.
- 8) Además del hábito tabáquico y el alcohol, hay otros factores, como pueden ser la dieta y el ejercicio físico, que influyen en el desarrollo de EO y que no se han tenido en cuenta.

7 CONCLUSIONES

-

- I. Los pacientes con el SOP presentan niveles de marcadores de oxidación superiores y niveles de sustancias antioxidantes inferiores que el grupo control. Esto sugiere que estas pacientes presentan un incremento de EO que podría representar un mecanismo subyacente en la patogenicidad de dicho proceso.
- II. Las mujeres con SOP presentan sobrepeso, RI y SMet. En el SOP el EO es independiente de la presencia o no de obesidad, aunque ésta puede incrementarlo. Sin embargo, dicho EO sí que está ligado a la presencia de RI y la condición de SMet en este tipo de paciente.
- III. Las mujeres con SOP con los fenotipos que incluyen la presencia de HA presentan un EO superior a aquellas con el fenotipo sin HA. Esto sugiere que dicho HA juega su papel en el desarrollo del EO en estas mujeres.
- IV. Las pacientes con síndrome de ovario poliquístico que tienen niveles más altos de 8-ISOP presentan niveles de marcadores de RCV más elevados que aquellas con dicho síndrome, pero con niveles normales de 8-ISOP. El SOP por sí sólo es un factor que predispone al desarrollo de ECV, pero la presencia de EO incrementa aún más dicho riesgo en estas pacientes.
- V. De los biomarcadores medidos en este estudio, la combinación de MULLE, BIL_T y 8-ISOP resulta una herramienta útil para el diagnóstico de SOP.

8 BIBLIOGRAFÍA

1. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, et al. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertil Steril*. 2009;91(2):456-88.
2. Azziz R, Marin C, Hoq L, Badamgarav E, Song P. Health care-related economic burden of the polycystic ovary syndrome during the reproductive life span. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(8):4650-8.
3. Stein IFaL, M.L. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1935;29:181-91.
4. Rebar R, Judd HL, Yen SS, Rakoff J, Vandenberg G, Naftolin F. Characterization of the inappropriate gonadotropin secretion in polycystic ovary syndrome. *J Clin Invest*. 1976;57(5):1320-9.
5. Burghen GA, Givens JR, Kitabchi AE. Correlation of hyperandrogenism with hyperinsulinism in polycystic ovarian disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 1980;50(1):113-6.
6. Swanson M, Sauerbrei EE, Cooperberg PL. Medical implications of ultrasonically detected polycystic ovaries. *J Clin Ultrasound*. 1981;9(5):219-22.
7. Adams J, Franks S, Polson DW, Mason HD, Abdulwahid N, Tucker M, et al. Multifollicular ovaries: clinical and endocrine features and response to pulsatile gonadotropin releasing hormone. *Lancet*. 1985;2(8469-70):1375-9.
8. Zawadzki JK DA. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: towards a rational approach. Boston Blackwell. 1992:377-84.
9. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2004;81(1):19-25.
10. Azziz R, Dumesic DA, Goodarzi MO. Polycystic ovary syndrome: an ancient disorder? *Fertil Steril*. 2011;95(5):1544-8.
11. Norman RJ, Dewailly D, Legro RS, Hickey TE. Polycystic ovary syndrome. *Lancet*. 2007;370(9588):685-97.
12. March WA, Moore VM, Willson KJ, Phillips DI, Norman RJ, Davies MJ. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. *Hum Reprod*. 2010;25(2):544-51.
13. Musmar S, Afaneh A, Mo'alla H. Epidemiology of polycystic ovary syndrome: a cross sectional study of university students at An-Najah national university-Palestine. *Reprod Biol Endocrinol*. 2013;11:47.

14. Goodarzi MO, Quinones MJ, Azziz R, Rotter JI, Hsueh WA, Yang H. Polycystic ovary syndrome in Mexican-Americans: prevalence and association with the severity of insulin resistance. *Fertil Steril*. 2005;84(3):766-9.
15. Boyle J, Teede HJ. Polycystic ovary syndrome - an update. *Aust Fam Physician*. 2012;41(10):752-6.
16. Elting MW, Korsen TJ, Rekers-Mombarg LT, Schoemaker J. Women with polycystic ovary syndrome gain regular menstrual cycles when ageing. *Hum Reprod*. 2000;15(1):24-8.
17. Bridges NA, Cooke A, Healy MJ, Hindmarsh PC, Brook CG. Standards for ovarian volume in childhood and puberty. *Fertil Steril*. 1993;60(3):456-60.
18. Asuncion M, Calvo RM, San Millan JL, Sancho J, Avila S, Escobar-Morreale HF. A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(7):2434-8.
19. Sanchon R, Gambineri A, Alpanes M, Martinez-Garcia MA, Pasquali R, Escobar-Morreale HF. Prevalence of functional disorders of androgen excess in unselected premenopausal women: a study in blood donors. *Hum Reprod*. 2012;27(4):1209-16.
20. Knochenhauer ES, Key TJ, Kahsar-Miller M, Waggoner W, Boots LR, Azziz R. Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the southeastern United States: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(9):3078-82.
21. Diamanti-Kandarakis E, Kouli CR, Bergiele AT, Filandra FA, Tsianateli TC, Spina GG, et al. A survey of the polycystic ovary syndrome in the Greek island of Lesbos: hormonal and metabolic profile. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(11):4006-11.
22. Azziz R, Woods KS, Reyna R, Key TJ, Knochenhauer ES, Yildiz BO. The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(6):2745-9.
23. Chae SJ, Kim JJ, Choi YM, Hwang KR, Jee BC, Ku SY, et al. Clinical and biochemical characteristics of polycystic ovary syndrome in Korean women. *Hum Reprod*. 2008;23(8):1924-31.

24. Roumain J, Charles MA, de Courten MP, Hanson RL, Brodie TD, Pettitt DJ, et al. The relationship of menstrual irregularity to type 2 diabetes in Pima Indian women. *Diabetes Care*. 1998;21(3):346-9.
25. Escobar-Morreale HF, Roldan B, Barrio R, Alonso M, Sancho J, de la Calle H, et al. High prevalence of the polycystic ovary syndrome and hirsutism in women with type 1 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(11):4182-7.
26. Jalilian A, Kiani F, Sayehmiri F, Sayehmiri K, Khodaei Z, Akbari M. Prevalence of polycystic ovary syndrome and its associated complications in Iranian women: A meta-analysis. *Iran J Reprod Med*. 2015;13(10):591-604.
27. Nelson VL, Qin KN, Rosenfield RL, Wood JR, Penning TM, Legro RS, et al. The biochemical basis for increased testosterone production in theca cells propagated from patients with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(12):5925-33.
28. Haisenleder DJ, Dalkin AC, Ortolano GA, Marshall JC, Shupnik MA. A pulsatile gonadotropin-releasing hormone stimulus is required to increase transcription of the gonadotropin subunit genes: evidence for differential regulation of transcription by pulse frequency in vivo. *Endocrinology*. 1991;128(1):509-17.
29. Legro RS. Diagnostic criteria in polycystic ovary syndrome. *Semin Reprod Med*. 2003;21(3):267-75.
30. Homburg R. What is polycystic ovarian syndrome? A proposal for a consensus on the definition and diagnosis of polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod*. 2002;17(10):2495-9.
31. Azziz R, Sanchez LA, Knochenhauer ES, Moran C, Lazenby J, Stephens KC, et al. Androgen excess in women: experience with over 1000 consecutive patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(2):453-62.
32. Huang A, Brennan K, Azziz R. Prevalence of hyperandrogenemia in the polycystic ovary syndrome diagnosed by the National Institutes of Health 1990 criteria. *Fertil Steril*. 2010;93(6):1938-41.
33. DeUgarte CM, Bartolucci AA, Azziz R. Prevalence of insulin resistance in the polycystic ovary syndrome using the homeostasis model assessment. *Fertil Steril*. 2005;83(5):1454-60.

34. Poretsky L, Cataldo NA, Rosenwaks Z, Giudice LC. The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. *Endocr Rev.* 1999;20(4):535-82.
35. Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev.* 1997;18(6):774-800.
36. Diamanti-Kandarakis E, Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications. *Endocr Rev.* 2012;33(6):981-1030.
37. Escobar-Morreale HF, San Millan JL. Abdominal adiposity and the polycystic ovary syndrome. *Trends Endocrinol Metab.* 2007;18(7):266-72.
38. Dunaif A, Segal KR, Futterweit W, Dobrjansky A. Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. *Diabetes.* 1989;38(9):1165-74.
39. Stepto NK, Cassar S, Joham AE, Hutchison SK, Harrison CL, Goldstein RF, et al. Women with polycystic ovary syndrome have intrinsic insulin resistance on euglycaemic-hyperinsulinaemic clamp. *Hum Reprod.* 2013;28(3):777-84.
40. Goodarzi MO, Dumesic DA, Chazenbalk G, Azziz R. Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis. *Nat Rev Endocrinol.* 2011;7(4):219-31.
41. Vink JM, Sadrzadeh S, Lambalk CB, Boomsma DI. Heritability of polycystic ovary syndrome in a Dutch twin-family study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(6):2100-4.
42. Day FR, Hinds DA, Tung JY, Stolk L, Styrkarsdottir U, Saxena R, et al. Causal mechanisms and balancing selection inferred from genetic associations with polycystic ovary syndrome. *Nat Commun.* 2015;6:8464.
43. Chen ZJ, Zhao H, He L, Shi Y, Qin Y, Li Z, et al. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for polycystic ovary syndrome on chromosome 2p16.3, 2p21 and 9q33.3. *Nat Genet.* 2011;43(1):55-9.
44. Shi Y, Zhao H, Cao Y, Yang D, Li Z, Zhang B, et al. Genome-wide association study identifies eight new risk loci for polycystic ovary syndrome. *Nat Genet.* 2012;44(9):1020-5.

45. Lee H, Oh JY, Sung YA, Chung H, Kim HL, Kim GS, et al. Genome-wide association study identified new susceptibility loci for polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2015;30(3):723-31.
46. Hayes MG, Urbanek M, Ehrmann DA, Armstrong LL, Lee JY, Sisk R, et al. Genome-wide association of polycystic ovary syndrome implicates alterations in gonadotropin secretion in European ancestry populations. *Nat Commun.* 2015;6:7502.
47. Toyoda-Ohno H, Obinata M, Matsui Y. Members of the ErbB receptor tyrosine kinases are involved in germ cell development in fetal mouse gonads. *Dev Biol.* 1999;215(2):399-406.
48. Xiang C, Li J, Hu L, Huang J, Luo T, Zhong Z, et al. Hippo signaling pathway reveals a spatio-temporal correlation with the size of primordial follicle pool in mice. *Cell Physiol Biochem.* 2015;35(3):957-68.
49. Goodarzi MO, Jones MR, Li X, Chua AK, Garcia OA, Chen YD, et al. Replication of association of DENND1A and THADA variants with polycystic ovary syndrome in European cohorts. *J Med Genet.* 2012;49(2):90-5.
50. Welt CK, Styrkarsdottir U, Ehrmann DA, Thorleifsson G, Arason G, Gudmundsson JA, et al. Variants in DENND1A are associated with polycystic ovary syndrome in women of European ancestry. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(7):E1342-7.
51. Tasaka K, Masumoto N, Mizuki J, Ikebuchi Y, Ohmichi M, Kurachi H, et al. Rab3B is essential for GnRH-induced gonadotrophin release from anterior pituitary cells. *J Endocrinol.* 1998;157(2):267-74.
52. Zeggini E, Scott LJ, Saxena R, Voight BF, Marchini JL, Hu T, et al. Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes. *Nat Genet.* 2008;40(5):638-45.
53. Mutharasan P, Galdones E, Penalver Bernabe B, Garcia OA, Jafari N, Shea LD, et al. Evidence for chromosome 2p16.3 polycystic ovary syndrome susceptibility locus in affected women of European ancestry. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(1):E185-90.
54. Almawi WY, Hubail B, Arekat DZ, Al-Farsi SM, Al-Kindi SK, Arekat MR, et al. Leutinizing hormone/choriogonadotropin receptor and follicle stimulating hormone receptor gene variants in polycystic ovary syndrome. *J Assist Reprod Genet.* 2015;32(4):607-14.

55. Dasgupta S, Reddy BM. The role of epistasis in the etiology of Polycystic Ovary Syndrome among Indian women: SNP-SNP and SNP-environment interactions. *Ann Hum Genet.* 2013;77(4):288-98.
56. Nambiar V, Vijesh VV, Lakshmanan P, Sukumaran S, Suganthi R. Association of adiponectin and resistin gene polymorphisms in South Indian women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2016;200:82-8.
57. Liu Q, Liu H, Bai H, Huang W, Zhang R, Tan J, et al. Association of SOD2 A16V and PON2 S311C polymorphisms with polycystic ovary syndrome in Chinese women. *J Endocrinol Invest.* 2019.
58. Saxena R, Bjornnes AC, Georgopoulos NA, Koika V, Panidis D, Welt CK. Gene variants associated with age at menopause are also associated with polycystic ovary syndrome, gonadotrophins and ovarian volume. *Hum Reprod.* 2015;30(7):1697-703.
59. Chen Y, Fang SY. Potential genetic polymorphisms predicting polycystic ovary syndrome. *Endocr Connect.* 2018.
60. Deligeoroglou E, Vrachnis N, Athanasopoulos N, Iliodromiti Z, Sifakis S, Iliodromiti S, et al. Mediators of chronic inflammation in polycystic ovarian syndrome. *Gynecol Endocrinol.* 2012;28(12):974-8.
61. Sathyapalan T, Atkin SL. Mediators of inflammation in polycystic ovary syndrome in relation to adiposity. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:758656.
62. Bloomgarden ZT. Inflammation and insulin resistance. *Diabetes Care.* 2003;26(6):1922-6.
63. Lam UD, Lerchbaum E, Schweighofer N, Trummer O, Eberhard K, Genser B, et al. Association of MEP1A gene variants with insulin metabolism in central European women with polycystic ovary syndrome. *Gene.* 2014;537(2):245-52.
64. Ibanez L, de Zegher F, Potau N. Premature pubarche, ovarian hyperandrogenism, hyperinsulinism and the polycystic ovary syndrome: from a complex constellation to a simple sequence of prenatal onset. *J Endocrinol Invest.* 1998;21(9):558-66.
65. Cresswell JL, Barker DJ, Osmond C, Egger P, Phillips DI, Fraser RB. Fetal growth, length of gestation, and polycystic ovaries in adult life. *Lancet.* 1997;350(9085):1131-5.

66. Ibanez L, Potau N, Zampolli M, Prat N, Virdis R, Vicens-Calvet E, et al. Hyperinsulinemia in postpubertal girls with a history of premature pubarche and functional ovarian hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(3):1237-43.
67. Carmina E, Rosato F, Janni A, Rizzo M, Longo RA. Extensive clinical experience: relative prevalence of different androgen excess disorders in 950 women referred because of clinical hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(1):2-6.
68. Carmina E, Lobo RA. Do hyperandrogenic women with normal menses have polycystic ovary syndrome? *Fertil Steril.* 1999;71(2):319-22.
69. Balen AH, Laven JS, Tan SL, Dewailly D. Ultrasound assessment of the polycystic ovary: international consensus definitions. *Hum Reprod Update.* 2003;9(6):505-14.
70. Ficicioglu C, Kutlu T, Baglam E, Bakacak Z. Early follicular antimullerian hormone as an indicator of ovarian reserve. *Fertil Steril.* 2006;85(3):592-6.
71. Cui Y, Shi Y, Cui L, Han T, Gao X, Chen ZJ. Age-specific serum antimullerian hormone levels in women with and without polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2014;102(1):230-6 e2.
72. Dumesic DA, Phan JD, Leung KL, Grogan TR, Ding X, Li X, et al. Adipose Insulin Resistance in Normal-Weight Polycystic Ovary Syndrome Women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2019.
73. Ardawi MS, Rouzi AA. Plasma adiponectin and insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2005;83(6):1708-16.
74. Niafar M, Nader ND. Adiponectin as serum biomarker of insulin resistance in patients with polycystic ovarian syndrome. *Gynecol Endocrinol.* 2015;31(6):473-6.
75. Boomsma CM, Eijkemans MJ, Hughes EG, Visser GH, Fauser BC, Macklon NS. A meta-analysis of pregnancy outcomes in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update.* 2006;12(6):673-83.
76. Essah PA, Nestler JE, Carmina E. Differences in dyslipidemia between American and Italian women with polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest.* 2008;31(1):35-41.
77. Hoffman LK, Ehrmann DA. Cardiometabolic features of polycystic ovary syndrome. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2008;4(4):215-22.

78. Valkenburg O, Steegers-Theunissen RP, Smedts HP, Dallinga-Thie GM, Fauser BC, Westerveld EH, et al. A more atherogenic serum lipoprotein profile is present in women with polycystic ovary syndrome: a case-control study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(2):470-6.
79. Elting MW, Korsen TJ, Schoemaker J. Obesity, rather than menstrual cycle pattern or follicle cohort size, determines hyperinsulinaemia, dyslipidaemia and hypertension in ageing women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2001;55(6):767-76.
80. Diamanti-Kandarakis E, Spina G, Kouli C, Migdalis I. Increased endothelin-1 levels in women with polycystic ovary syndrome and the beneficial effect of metformin therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(10):4666-73.
81. Cascella T, Palomba S, Tauchmanova L, Manguso F, Di Biase S, Labella D, et al. Serum aldosterone concentration and cardiovascular risk in women with polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(11):4395-400.
82. Gambineri A, Pelusi C, Vicennati V, Pagotto U, Pasquali R. Obesity and the polycystic ovary syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002;26(7):883-96.
83. Dahlgren E, Janson PO, Johansson S, Lapidus L, Oden A. Polycystic ovary syndrome and risk for myocardial infarction. Evaluated from a risk factor model based on a prospective population study of women. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1992;71(8):599-604.
84. Zhu S, Zhang B, Jiang X, Li Z, Zhao S, Cui L, et al. Metabolic disturbances in non-obese women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 2019;111(1):168-77.
85. Cascella T, Palomba S, De Sio I, Manguso F, Giallauria F, De Simone B, et al. Visceral fat is associated with cardiovascular risk in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2008;23(1):153-9.
86. Carmina E, Orio F, Palomba S, Longo RA, Cascella T, Colao A, et al. Endothelial dysfunction in PCOS: role of obesity and adipose hormones. *Am J Med.* 2006;119(4):356 e1-6.
87. Luque-Ramirez M, Mendieta-Azcona C, Alvarez-Blasco F, Escobar-Morreale HF. Androgen excess is associated with the increased carotid intima-

media thickness observed in young women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2007;22(12):3197-203.

88. Christian RC, Dumesic DA, Behrenbeck T, Oberg AL, Sheedy PF, 2nd, Fitzpatrick LA. Prevalence and predictors of coronary artery calcification in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(6):2562-8.

89. de Mendonca-Louzeiro MR, Annichino-Bizzacchi JM, Magna LA, Quaino SK, Benetti-Pinto CL. Faster thrombin generation in women with polycystic ovary syndrome compared with healthy controls matched for age and body mass index. *Fertil Steril.* 2013;99(6):1786-90.

90. Shaw LJ, Bairey Merz CN, Azziz R, Stanczyk FZ, Sopko G, Braunstein GD, et al. Postmenopausal women with a history of irregular menses and elevated androgen measurements at high risk for worsening cardiovascular event-free survival: results from the National Institutes of Health--National Heart, Lung, and Blood Institute sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(4):1276-84.

91. Boudreaux MY, Talbott EO, Kip KE, Brooks MM, Witchel SF. Risk of T2DM and impaired fasting glucose among PCOS subjects: results of an 8-year follow-up. *Curr Diab Rep.* 2006;6(1):77-83.

92. Moran LJ, Misso ML, Wild RA, Norman RJ. Impaired glucose tolerance, type 2 diabetes and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2010;16(4):347-63.

93. Kakoly NS, Earnest A, Teede HJ, Moran LJ, Joham AE. The Impact of Obesity on the Incidence of Type 2 Diabetes Among Women With Polycystic Ovary Syndrome. *Diabetes Care.* 2019.

94. Talbott EO, Zborowski JV, Rager JR, Kip KE, Xu X, Orchard TJ. Polycystic ovarian syndrome (PCOS): a significant contributor to the overall burden of type 2 diabetes in women. *J Womens Health (Larchmt).* 2007;16(2):191-7.

95. Teede HJ, Misso ML, Costello MF, Dokras A, Laven J, Moran L, et al. Erratum. Recommendations from the international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2019;34(2):388.

96. Consensus on infertility treatment related to polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2008;23(3):462-77.
97. Patel SS, Carr BR. Oocyte quality in adult polycystic ovary syndrome. *Semin Reprod Med.* 2008;26(2):196-203.
98. Hardy K, Robinson FM, Paraschos T, Wicks R, Franks S, Winston RM. Normal development and metabolic activity of preimplantation embryos in vitro from patients with polycystic ovaries. *Hum Reprod.* 1995;10(8):2125-35.
99. Heijnen EM, Eijkemans MJ, Hughes EG, Laven JS, Macklon NS, Fauser BC. A meta-analysis of outcomes of conventional IVF in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update.* 2006;12(1):13-21.
100. Chang PL, Lindheim SR, Lowre C, Ferin M, Gonzalez F, Berglund L, et al. Normal ovulatory women with polycystic ovaries have hyperandrogenic pituitary-ovarian responses to gonadotropin-releasing hormone-agonist testing. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(3):995-1000.
101. Chittenden BG, Fullerton G, Maheshwari A, Bhattacharya S. Polycystic ovary syndrome and the risk of gynaecological cancer: a systematic review. *Reprod Biomed Online.* 2009;19(3):398-405.
102. Gottschau M, Kjaer SK, Jensen A, Munk C, Møller M, L. Risk of cancer among women with polycystic ovary syndrome: a Danish cohort study. *Gynecol Oncol.* 2015;136(1):99-103.
103. Annagur BB, Tazegul A, Uguz F, Kerimoglu OS, Tekinarslan E, Celik C. Biological correlates of major depression and generalized anxiety disorder in women with polycystic ovary syndrome. *J Psychosom Res.* 2013;74(3):244-7.
104. Ferraresi SR, Lara LA, Reis RM, Rosa e Silva AC. Changes in sexual function among women with polycystic ovary syndrome: a pilot study. *J Sex Med.* 2013;10(2):467-73.
105. Fauser BC, Tarlatzis BC, Rebar RW, Legro RS, Balen AH, Lobo R, et al. Consensus on women's health aspects of polycystic ovary syndrome (PCOS): the Amsterdam ESHRE/ASRM-Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop Group. *Fertil Steril.* 2012;97(1):28-38 e25.
106. Ladenson PW, Singer PA, Ain KB, Bagchi N, Bigos ST, Levy EG, et al. American Thyroid Association guidelines for detection of thyroid dysfunction. *Arch Intern Med.* 2000;160(11):1573-5.

107. Melmed S, Casanueva FF, Hoffman AR, Kleinberg DL, Montori VM, Schlechte JA, et al. Diagnosis and treatment of hyperprolactinemia: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(2):273-88.
108. Speiser PW, Azziz R, Baskin LS, Ghizzoni L, Hensle TW, Merke DP, et al. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(9):4133-60.
109. Radosh L. Drug treatments for polycystic ovary syndrome. *Am Fam Physician.* 2009;79(8):671-6.
110. Mes-Krowinkel MG, Louwers YV, Mulders AG, de Jong FH, Fauser BC, Laven JS. Influence of oral contraceptives on anthropomorphometric, endocrine, and metabolic profiles of anovulatory polycystic ovary syndrome patients. *Fertil Steril.* 2014;101(6):1757-65 e1.
111. de Zegher F, Ibanez L. Therapy: Low-dose flutamide for hirsutism: into the limelight, at last. *Nat Rev Endocrinol.* 2010;6(8):421-2.
112. Witchel SF, Oberfield S, Rosenfield RL, Codner E, Bonny A, Ibanez L, et al. The Diagnosis of Polycystic Ovary Syndrome during Adolescence. *Horm Res Paediatr.* 2015.
113. Homburg R. The management of infertility associated with polycystic ovary syndrome. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003;1:109.
114. Farquhar C, Brown J, Marjoribanks J. Laparoscopic drilling by diathermy or laser for ovulation induction in anovulatory polycystic ovary syndrome. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012(6):CD001122.
115. Palomba S, Falbo A, Zullo F, Orio F, Jr. Evidence-based and potential benefits of metformin in the polycystic ovary syndrome: a comprehensive review. *Endocr Rev.* 2009;30(1):1-50.
116. Tang T, Lord JM, Norman RJ, Yasmin E, Balen AH. Insulin-sensitising drugs (metformin, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiro-inositol) for women with polycystic ovary syndrome, oligo amenorrhoea and subfertility. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012(5):CD003053.
117. Fux Otta C, Wior M, Iraci GS, Kaplan R, Torres D, Gaido MI, et al. Clinical, metabolic, and endocrine parameters in response to metformin and

- lifestyle intervention in women with polycystic ovary syndrome: a randomized, double-blind, and placebo control trial. *Gynecol Endocrinol*. 2010;26(3):173-8.
118. Costello MF, Eden JA. A systematic review of the reproductive system effects of metformin in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2003;79(1):1-13.
119. Mikola M, Hiilesmaa V, Halttunen M, Suhonen L, Tiitinen A. Obstetric outcome in women with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod*. 2001;16(2):226-9.
120. Glueck CJ, Wang P, Kobayashi S, Phillips H, Sieve-Smith L. Metformin therapy throughout pregnancy reduces the development of gestational diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2002;77(3):520-5.
121. Unfer V, Carlomagno G, Dante G, Facchinetti F. Effects of myo-inositol in women with PCOS: a systematic review of randomized controlled trials. *Gynecol Endocrinol*. 2012;28(7):509-15.
122. Minozzi M, D'Andrea G, Unfer V. Treatment of hirsutism with myo-inositol: a prospective clinical study. *Reprod Biomed Online*. 2008;17(4):579-82.
123. Croze ML, Soulage CO. Potential role and therapeutic interests of myo-inositol in metabolic diseases. *Biochimie*. 2013;95(10):1811-27.
124. Papaleo E, Unfer V, Baillargeon JP, De Santis L, Fusi F, Brigante C, et al. Myo-inositol in patients with polycystic ovary syndrome: a novel method for ovulation induction. *Gynecol Endocrinol*. 2007;23(12):700-3.
125. Elkind-Hirsch K, Marrioneaux O, Bhushan M, Vernor D, Bhushan R. Comparison of single and combined treatment with exenatide and metformin on menstrual cyclicity in overweight women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(7):2670-8.
126. Kahal H, Aburima A, Ungvari T, Rigby AS, Coady AM, Vince RV, et al. The effects of treatment with liraglutide on atherothrombotic risk in obese young women with polycystic ovary syndrome and controls. *BMC Endocr Disord*. 2015;15:14.
127. Liepa GU, Sengupta A, Karsies D. Polycystic ovary syndrome (PCOS) and other androgen excess-related conditions: can changes in dietary intake make a difference? *Nutr Clin Pract*. 2008;23(1):63-71.
128. Mohammadi E, Rafrat M, Farzadi L, Asghari-Jafarabadi M, Sabour S. Effects of omega-3 fatty acids supplementation on serum adiponectin levels and

some metabolic risk factors in women with polycystic ovary syndrome. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2012;21(4):511-8.

129. Rahmani E, Samimi M, Ebrahimi FA, Foroozanfard F, Ahmadi S, Rahimi M, et al. The effects of omega-3 fatty acids and vitamin E co-supplementation on gene expression of lipoprotein(a) and oxidized low-density lipoprotein, lipid profiles and biomarkers of oxidative stress in patients with polycystic ovary syndrome. *Mol Cell Endocrinol.* 2017;439:247-55.

130. Yang K, Zeng L, Bao T, Ge J. Effectiveness of Omega-3 fatty acid for polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biol Endocrinol.* 2018;16(1):27.

131. Amr N, Abdel-Rahim HE. The effect of chromium supplementation on polycystic ovary syndrome in adolescents. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2015;28(2):114-8.

132. Mohammad Hosseinzadeh F, Hosseinzadeh-Attar MJ, Yekaninejad MS, Rashidi B. Effects of selenium supplementation on glucose homeostasis and free androgen index in women with polycystic ovary syndrome: A randomized, double blinded, placebo controlled clinical trial. *J Trace Elem Med Biol.* 2016;34:56-61.

133. Kose SA, Naziroglu M. Selenium reduces oxidative stress and calcium entry through TRPV1 channels in the neutrophils of patients with polycystic ovary syndrome. *Biol Trace Elem Res.* 2014;158(2):136-42.

134. Razavi M, Jamilian M, Kashan ZF, Heidar Z, Mohseni M, Ghandi Y, et al. Selenium Supplementation and the Effects on Reproductive Outcomes, Biomarkers of Inflammation, and Oxidative Stress in Women with Polycystic Ovary Syndrome. *Horm Metab Res.* 2016;48(3):185-90.

135. Escobar-Morreale HF, Luque-Ramirez M, San Millan JL. The molecular-genetic basis of functional hyperandrogenism and the polycystic ovary syndrome. *Endocr Rev.* 2005;26(2):251-82.

136. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med.* 1992;119(6):598-620.

137. Gutteridge JM. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem Biol Interact.* 1994;91(2-3):133-40.

138. Murri M, Luque-Ramirez M, Insenser M, Ojeda-Ojeda M, Escobar-Morreale HF. Circulating markers of oxidative stress and polycystic ovary

syndrome (PCOS): a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2013;19(3):268-88.

139. Brown NC, Andreazza AC, Young LT. An updated meta-analysis of oxidative stress markers in bipolar disorder. *Psychiatry Res*. 2014;218(1-2):61-8.

140. Siwek M, Sowa-Kucma M, Dudek D, Styczen K, Szewczyk B, Kotarska K, et al. Oxidative stress markers in affective disorders. *Pharmacol Rep*. 2013;65(6):1558-71.

141. Gustafsson S, Lind L, Soderberg S, Zilmer M, Hulthe J, Ingelsson E. Oxidative stress and inflammatory markers in relation to circulating levels of adiponectin. *Obesity (Silver Spring)*. 2013;21(7):1467-73.

142. Bloch-Damti A, Bashan N. Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2005;7(11-12):1553-67.

143. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem*. 2015;97:55-74.

144. Fardoun RZ. The use of vitamin E in type 2 diabetes mellitus. *Clin Exp Hypertens*. 2007;29(3):135-48.

145. Ren D, Hu Y, Luo Y, Yang X. Selenium-containing polysaccharides from Ziyang green tea ameliorate high-fructose diet induced insulin resistance and hepatic oxidative stress in mice. *Food Funct*. 2015;6(10):3342-50.

146. Castro MC, Massa ML, Arbelaez LG, Schinella G, Gagliardino JJ, Francini F. Fructose-induced inflammation, insulin resistance and oxidative stress: A liver pathological triad effectively disrupted by lipoic acid. *Life Sci*. 2015;137:1-6.

147. Maddux BA, See W, Lawrence JC, Jr., Goldfine AL, Goldfine ID, Evans JL. Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by micromolar concentrations of alpha-lipoic acid. *Diabetes*. 2001;50(2):404-10.

148. Rudich A, Kozlovsky N, Potashnik R, Bashan N. Oxidant stress reduces insulin responsiveness in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol*. 1997;272(5 Pt 1):E935-40.

149. Tangvarasittichai S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes*. 2015;6(3):456-80.

150. Pi J, Bai Y, Zhang Q, Wong V, Floering LM, Daniel K, et al. Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes*. 2007;56(7):1783-91.
151. MacLaren R, Cui W, Simard S, Cianflone K. Influence of obesity and insulin sensitivity on insulin signaling genes in human omental and subcutaneous adipose tissue. *J Lipid Res*. 2008;49(2):308-23.
152. Zuo T, Zhu M, Xu W. Roles of Oxidative Stress in Polycystic Ovary Syndrome and Cancers. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:8589318.
153. Evans JL, Maddux BA, Goldfine ID. The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. *Antioxid Redox Signal*. 2005;7(7-8):1040-52.
154. Kurdoglu Z, Ozkol H, Tuluce Y, Koyuncu I. Oxidative status and its relation with insulin resistance in young non-obese women with polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest*. 2012;35(3):317-21.
155. Shi X, Xie X, Jia Y, Li S. Associations of insulin receptor and insulin receptor substrates genetic polymorphisms with polycystic ovary syndrome: A systematic review and meta-analysis. *J Obstet Gynaecol Res*. 2016;42(7):844-54.
156. Ehrmann DA, Liljenquist DR, Kasza K, Azziz R, Legro RS, Ghazzi MN. Prevalence and predictors of the metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(1):48-53.
157. Goodman NF, Cobin RH, Futterweit W, Glueck JS, Legro RS, Carmina E, et al. American Association of Clinical Endocrinologists, American College of Endocrinology, and Androgen Excess and Pcos Society Disease State Clinical Review: Guide to the Best Practices in the Evaluation and Treatment of Polycystic Ovary Syndrome - Part 2. *Endocr Pract*. 2015;21(12):1415-26.
158. Guzick DS, Talbott EO, Sutton-Tyrrell K, Herzog HC, Kuller LH, Wolfson SK, Jr. Carotid atherosclerosis in women with polycystic ovary syndrome: initial results from a case-control study. *Am J Obstet Gynecol*. 1996;174(4):1224-9; discussion 9-32.
159. Talbott E, Guzick D, Clerici A, Berga S, Detre K, Weimer K, et al. Coronary heart disease risk factors in women with polycystic ovary syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15(7):821-6.

160. Birdsall MA, Farquhar CM, White HD. Association between polycystic ovaries and extent of coronary artery disease in women having cardiac catheterization. *Ann Intern Med.* 1997;126(1):32-5.
161. Mather KJ, Kwan F, Corenblum B. Hyperinsulinemia in polycystic ovary syndrome correlates with increased cardiovascular risk independent of obesity. *Fertil Steril.* 2000;73(1):150-6.
162. Paradisi G, Steinberg HO, Hempfling A, Cronin J, Hook G, Shepard MK, et al. Polycystic ovary syndrome is associated with endothelial dysfunction. *Circulation.* 2001;103(10):1410-5.
163. Rosselli M, Keller PJ, Dubey RK. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Hum Reprod Update.* 1998;4(1):3-24.
164. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82(1):47-95.
165. Madamanchi NR, Runge MS. Redox signaling in cardiovascular health and disease. *Free Radic Biol Med.* 2013;61:473-501.
166. Gonzalez F, Rote NS, Minium J, Kirwan JP. Reactive oxygen species-induced oxidative stress in the development of insulin resistance and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(1):336-40.
167. Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J.* 2007;401(1):1-11.
168. Krstic J, Trivanovic D, Mojsilovic S, Santibanez JF. Transforming Growth Factor-Beta and Oxidative Stress Interplay: Implications in Tumorigenesis and Cancer Progression. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:654594.
169. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med.* 2010;49(11):1603-16.
170. Ziech D, Franco R, Pappa A, Panayiotidis MI. Reactive oxygen species (ROS)--induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. *Mutat Res.* 2011;711(1-2):167-73.
171. Lebedeva MA, Eaton JS, Shadel GS. Loss of p53 causes mitochondrial DNA depletion and altered mitochondrial reactive oxygen species homeostasis. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1787(5):328-34.

172. Bartsch H, Nair J. Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. *Langenbecks Arch Surg.* 2006;391(5):499-510.
173. Donkena KV, Young CY, Tindall DJ. Oxidative stress and DNA methylation in prostate cancer. *Obstet Gynecol Int.* 2010;2010:302051.
174. Franco R, Schoneveld O, Georgakilas AG, Panayiotidis MI. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Lett.* 2008;266(1):6-11.
175. Lai Q, Xiang W, Li Q, Zhang H, Li Y, Zhu G, et al. Oxidative stress in granulosa cells contributes to poor oocyte quality and IVF-ET outcomes in women with polycystic ovary syndrome. *Frontiers of medicine.* 2017.
176. Kawakami A, Kubota K, Yamada N, Tagami U, Takehana K, Sonaka I, et al. Identification and characterization of oxidized human serum albumin. A slight structural change impairs its ligand-binding and antioxidant functions. *FEBS J.* 2006;273(14):3346-57.
177. Vertuani S, Angusti A, Manfredini S. The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Curr Pharm Des.* 2004;10(14):1677-94.
178. Quinlan GJ, Mumby S, Martin GS, Bernard GR, Gutteridge JM, Evans TW. Albumin influences total plasma antioxidant capacity favorably in patients with acute lung injury. *Crit Care Med.* 2004;32(3):755-9.
179. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science.* 1987;235(4792):1043-6.
180. Sedlak TW, Snyder SH. Bilirubin benefits: cellular protection by a biliverdin reductase antioxidant cycle. *Pediatrics.* 2004;113(6):1776-82.
181. Meadows J, Smith RC. Uric acid protects erythrocytes from ozone-induced changes. *Environ Res.* 1987;43(2):410-6.
182. Becker BF, Reinholz N, Ozcelik T, Leipert B, Gerlach E. Uric acid as radical scavenger and antioxidant in the heart. *Pflugers Arch.* 1989;415(2):127-35.
183. Alcaïno H, Greig D, Chiong M, Verdejo H, Miranda R, Concepcion R, et al. Serum uric acid correlates with extracellular superoxide dismutase activity in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2008;10(7):646-51.

184. Verdejo H, Alcaíno H, Greig D, García L, Pizarro M, Chiong M, et al. Uric acid, xanthine oxidase and heart failure: unresolved issues. *Eur J Heart Fail.* 2008;10(12):1271-2.
185. Hink HU, Santanam N, Dikalov S, McCann L, Nguyen AD, Parthasarathy S, et al. Peroxidase properties of extracellular superoxide dismutase: role of uric acid in modulating in vivo activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(9):1402-8.
186. Das NP. Effects of vitamin A and its analogs on nonenzymatic lipid peroxidation in rat brain mitochondria. *J Neurochem.* 1989;52(2):585-8.
187. Geesin JC, Gordon JS, Berg RA. Retinoids affect collagen synthesis through inhibition of ascorbate-induced lipid peroxidation in cultured human dermal fibroblasts. *Arch Biochem Biophys.* 1990;278(2):350-5.
188. Ma L, Zhou P, Neu J, Lin HC. Potential Nutrients for Preventing or Treating Bronchopulmonary Dysplasia. *Paediatr Respir Rev.* 2017;22:83-8.
189. Aibana O, Franke MF, Huang CC, Galea JT, Calderon R, Zhang Z, et al. Impact of Vitamin A and Carotenoids on the Risk of Tuberculosis Progression. *Clin Infect Dis.* 2017.
190. Neuzil J, Weber C, Kontush A. The role of vitamin E in atherogenesis: linking the chemical, biological and clinical aspects of the disease. *Atherosclerosis.* 2001;157(2):257-83.
191. Thomas DR. Vitamins in aging, health, and longevity. *Clin Interv Aging.* 2006;1(1):81-91.
192. Vivekananthan DP, Penn MS, Sapp SK, Hsu A, Topol EJ. Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials. *Lancet.* 2003;361(9374):2017-23.
193. Butterfield D, Castegna A, Pocernich C, Drake J, Scapagnini G, Calabrese V. Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem.* 2002;13(8):444.
194. Giustarini D, Dalle-Donne I, Tsikas D, Rossi R. Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2009;46(5-6):241-81.
195. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond).* 1993;84(4):407-12.

196. Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med.* 2000;29(11):1106-14.
197. Lotito SB, Frei B. The increase in human plasma antioxidant capacity after apple consumption is due to the metabolic effect of fructose on urate, not apple-derived antioxidant flavonoids. *Free Radic Biol Med.* 2004;37(2):251-8.
198. Attri S, Sharma N, Jahagirdar S, Thapa BR, Prasad R. Erythrocyte metabolism and antioxidant status of patients with Wilson disease with hemolytic anemia. *Pediatr Res.* 2006;59(4 Pt 1):593-7.
199. Chrysohoou C, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Skoumas J, Economou M, Papadimitriou L, et al. The association between pre-hypertension status and oxidative stress markers related to atherosclerotic disease: the ATTICA study. *Atherosclerosis.* 2007;192(1):169-76.
200. Mandrioli J, Del Rio D, Zini A, Nichelli P, Merelli E, Beltrami D, et al. Total antioxidant capacity of cerebrospinal fluid is decreased in patients with motor neuron disease. *Neurosci Lett.* 2006;401(3):203-8.
201. Melissas J, Malliaraki N, Papadakis JA, Taflampas P, Kampa M, Castanas E. Plasma antioxidant capacity in morbidly obese patients before and after weight loss. *Obes Surg.* 2006;16(3):314-20.
202. Ozdogan M, Devay AO, Gurer A, Ersoy E, Devay SD, Kulacoglu H, et al. Plasma total anti-oxidant capacity correlates inversely with the extent of acute appendicitis: a case control study. *World J Emerg Surg.* 2006;1:6.
203. Schulpis KH, Papassotiriou I, Tsakiris S. 8-hydroxy-2-desoxyguanosine serum concentrations as a marker of DNA damage in patients with classical galactosaemia. *Acta Paediatr.* 2006;95(2):164-9.
204. Stephensen CB, Marquis GS, Kruzich LA, Douglas SD, Aldrovandi GM, Wilson CM. Vitamin D status in adolescents and young adults with HIV infection. *Am J Clin Nutr.* 2006;83(5):1135-41.
205. Zitnanova I, Korytar P, Sobotova H, Horakova L, Sustrova M, Pueschel S, et al. Markers of oxidative stress in children with Down syndrome. *Clin Chem Lab Med.* 2006;44(3):306-10.
206. Sajewicz W, Milnerowicz S, Nabzdyk S. Blood plasma antioxidant defense in patients with pancreatitis. *Pancreas.* 2006;32(2):139-44.

207. Kim YH, Kim CH, Cho MK, Kim KM, Lee SY, Ahn BW, et al. Total peroxy radical-trapping ability and anti-oxidant vitamins of the umbilical venous plasma and the placenta in pre-eclampsia. *J Obstet Gynaecol Res.* 2006;32(1):32-41.
208. Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem.* 2005;12(10):1161-208.
209. Kurdoglu Z, Kurdoglu M, Demir H, Sahin HG. Serum trace elements and heavy metals in polycystic ovary syndrome. *Hum Exp Toxicol.* 2012;31(5):452-6.
210. Pollack AZ, Schisterman EF, Goldman LR, Mumford SL, Albert PS, Jones RL, et al. Cadmium, lead, and mercury in relation to reproductive hormones and anovulation in premenopausal women. *Environ Health Perspect.* 2011;119(8):1156-61.
211. Yaman M, Kaya G, Yekeler H. Distribution of trace metal concentrations in paired cancerous and non-cancerous human stomach tissues. *World J Gastroenterol.* 2007;13(4):612-8.
212. Moirand R, Mortaji AM, Loreal O, Paillard F, Brissot P, Deugnier Y. A new syndrome of liver iron overload with normal transferrin saturation. *Lancet.* 1997;349(9045):95-7.
213. Jehn M, Clark JM, Guallar E. Serum ferritin and risk of the metabolic syndrome in U.S. adults. *Diabetes Care.* 2004;27(10):2422-8.
214. Jiang R, Manson JE, Meigs JB, Ma J, Rifai N, Hu FB. Body iron stores in relation to risk of type 2 diabetes in apparently healthy women. *JAMA.* 2004;291(6):711-7.
215. Escobar-Morreale HF, Luque-Ramirez M, Alvarez-Blasco F, Botella-Carretero JL, Sancho J, San Millan JL. Body iron stores are increased in overweight and obese women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care.* 2005;28(8):2042-4.
216. Martinez-Garcia MA, Luque-Ramirez M, San-Millan JL, Escobar-Morreale HF. Body iron stores and glucose intolerance in premenopausal women: role of hyperandrogenism, insulin resistance, and genomic variants related to inflammation, oxidative stress, and iron metabolism. *Diabetes Care.* 2009;32(8):1525-30.
217. Tapiero H, Tew KD. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomed Pharmacother.* 2003;57(9):399-411.

218. Zheng G, Wang L, Guo Z, Sun L, Wang C, Zuo Z, et al. Association of Serum Heavy Metals and Trace Element Concentrations with Reproductive Hormone Levels and Polycystic Ovary Syndrome in a Chinese Population. *Biol Trace Elem Res.* 2015;167(1):1-10.
219. Chakraborty P, Ghosh S, Goswami SK, Kabir SN, Chakravarty B, Jana K. Altered trace mineral milieu might play an aetiological role in the pathogenesis of polycystic ovary syndrome. *Biol Trace Elem Res.* 2013;152(1):9-15.
220. Celik C, Bastu E, Abali R, Alpsoy S, Guzel EC, Aydemir B, et al. The relationship between copper, homocysteine and early vascular disease in lean women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol.* 2013;29(5):488-91.
221. Mistry HD, Broughton Pipkin F, Redman CW, Poston L. Selenium in reproductive health. *Am J Obstet Gynecol.* 2012;206(1):21-30.
222. Coskun A, Arikan T, Kilinc M, Arikan DC, Ekerbicer HC. Plasma selenium levels in Turkish women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013;168(2):183-6.
223. Valenta J, Brodska H, Drabek T, Hendl J, Kazda A. High-dose selenium substitution in sepsis: a prospective randomized clinical trial. *Intensive Care Med.* 2011;37(5):808-15.
224. Jamilian M, Mansury S, Bahmani F, Heidar Z, Amirani E, Asemi Z. The effects of probiotic and selenium co-supplementation on parameters of mental health, hormonal profiles, and biomarkers of inflammation and oxidative stress in women with polycystic ovary syndrome. *J Ovarian Res.* 2018;11(1):80.
225. Guler I, Himmetoglu O, Turp A, Erdem A, Erdem M, Onan MA, et al. Zinc and homocysteine levels in polycystic ovarian syndrome patients with insulin resistance. *Biol Trace Elem Res.* 2014;158(3):297-304.
226. Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ, 2nd. A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(23):9383-7.
227. Morrow JD, Roberts LJ, 2nd. Mass spectrometry of prostanoids: F₂-isoprostanes produced by non-cyclooxygenase free radical-catalyzed mechanism. *Methods Enzymol.* 1994;233:163-74.

228. Taber DF, Morrow JD, Roberts LJ, 2nd. A nomenclature system for the isoprostanes. *Prostaglandins*. 1997;53(2):63-7.
229. Rokach J, Khanapure SP, Hwang SW, Adiyaman M, Lawson JA, FitzGerald GA. Nomenclature of isoprostanes: a proposal. *Prostaglandins*. 1997;54(6):853-73.
230. Morrow JD, Minton TA, Mukundan CR, Campbell MD, Zackert WE, Daniel VC, et al. Free radical-induced generation of isoprostanes in vivo. Evidence for the formation of D-ring and E-ring isoprostanes. *J Biol Chem*. 1994;269(6):4317-26.
231. Klein T, Reutter F, Schweer H, Seyberth HW, Nusing RM. Generation of the isoprostane 8-epi-prostaglandin F2alpha in vitro and in vivo via the cyclooxygenases. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;282(3):1658-65.
232. Catella F, Reilly MP, Delanty N, Lawson JA, Moran N, Meagher E, et al. Physiological formation of 8-epi-PGF2 alpha in vivo is not affected by cyclooxygenase inhibition. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res*. 1995;23:233-6.
233. Stafforini DM, Sheller JR, Blackwell TS, Sapirstein A, Yull FE, McIntyre TM, et al. Release of free F2-isoprostanes from esterified phospholipids is catalyzed by intracellular and plasma platelet-activating factor acetylhydrolases. *J Biol Chem*. 2006;281(8):4616-23.
234. Li H, Lawson JA, Reilly M, Adiyaman M, Hwang SW, Rokach J, et al. Quantitative high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric analysis of the four classes of F(2)-isoprostanes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(23):13381-6.
235. Yan Z, Mas E, Mori TA, Croft KD, Barden AE. A significant proportion of F2-isoprostanes in human urine are excreted as glucuronide conjugates. *Anal Biochem*. 2010;403(1-2):126-8.
236. Schwedhelm E, Tsikas D, Durand T, Gutzki FM, Guy A, Rossi JC, et al. Tandem mass spectrometric quantification of 8-iso-prostaglandin F2alpha and its metabolite 2,3-dinor-5,6-dihydro-8-iso-prostaglandin F2alpha in human urine. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 2000;744(1):99-112.
237. Nourooz-Zadeh J, Cooper MB, Ziegler D, Betteridge DJ. Urinary 8-epi-PGF2alpha and its endogenous beta-oxidation products (2,3-dinor and 2,3-

dinor-5,6-dihydro) as biomarkers of total body oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;330(3):731-6.

238. Basu S. Radioimmunoassay of 15-keto-13,14-dihydro-prostaglandin F2alpha: an index for inflammation via cyclooxygenase catalysed lipid peroxidation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1998;58(5):347-52.

239. Banerjee M, Kang KH, Morrow JD, Roberts LJ, Newman JH. Effects of a novel prostaglandin, 8-epi-PGF2 alpha, in rabbit lung in situ. *Am J Physiol*. 1992;263(3 Pt 2):H660-3.

240. Kang KH, Morrow JD, Roberts LJ, 2nd, Newman JH, Banerjee M. Airway and vascular effects of 8-epi-prostaglandin F2 alpha in isolated perfused rat lung. *J Appl Physiol* (1985). 1993;74(1):460-5.

241. Kromer BM, Tippins JR. Coronary artery constriction by the isoprostane 8-epi prostaglandin F2 alpha. *Br J Pharmacol*. 1996;119(6):1276-80.

242. Takahashi K, Nammour TM, Fukunaga M, Ebert J, Morrow JD, Roberts LJ, 2nd, et al. Glomerular actions of a free radical-generated novel prostaglandin, 8-epi-prostaglandin F2 alpha, in the rat. Evidence for interaction with thromboxane A2 receptors. *J Clin Invest*. 1992;90(1):136-41.

243. Okazawa A, Kawikova I, Cui ZH, Skoogh BE, Lotvall J. 8-Epi-PGF2alpha induces airflow obstruction and airway plasma exudation in vivo. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155(2):436-41.

244. Hoffman SW, Moore S, Ellis EF. Isoprostanes: free radical-generated prostaglandins with constrictor effects on cerebral arterioles. *Stroke*. 1997;28(4):844-9.

245. Lahaie I, Hardy P, Hou X, Hassessian H, Asselin P, Lachapelle P, et al. A novel mechanism for vasoconstrictor action of 8-isoprostaglandin F2 alpha on retinal vessels. *Am J Physiol*. 1998;274(5 Pt 2):R1406-16.

246. Pratico D, Smyth EM, Violi F, FitzGerald GA. Local amplification of platelet function by 8-Epi prostaglandin F2alpha is not mediated by thromboxane receptor isoforms. *J Biol Chem*. 1996;271(25):14916-24.

247. Minuz P, Andrioli G, Degan M, Gaino S, Ortolani R, Tommasoli R, et al. The F2-isoprostane 8-epiprostaglandin F2alpha increases platelet adhesion and reduces the antiadhesive and antiaggregatory effects of NO. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18(8):1248-56.

248. Bauer J, Ripperger A, Frantz S, Ergun S, Schwedhelm E, Benndorf RA. Pathophysiology of isoprostanes in the cardiovascular system: implications of isoprostane-mediated thromboxane A₂ receptor activation. *Br J Pharmacol*. 2014;171(13):3115-31.
249. Elmhurst JL, Betti PA, Rangachari PK. Intestinal effects of isoprostanes: evidence for the involvement of prostanoid EP and TP receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;282(3):1198-205.
250. Weber TJ, Markillie LM. Regulation of activator protein-1 by 8-iso-prostaglandin E₂ in a thromboxane A₂ receptor-dependent and -independent manner. *Mol Pharmacol*. 2003;63(5):1075-81.
251. Joy AP, Cowley EA. 8-iso-PGE₂ stimulates anion efflux from airway epithelial cells via the EP₄ prostanoid receptor. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2008;38(2):143-52.
252. Evans AR, Junger H, Southall MD, Nicol GD, Sorkin LS, Broome JT, et al. Isoprostanes, novel eicosanoids that produce nociception and sensitize rat sensory neurons. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000;293(3):912-20.
253. Junger H, Sorkin LS. C-nociceptor sensitization by isoprostanes is cyclooxygenase dependent. *Brain Res*. 2000;867(1-2):255-8.
254. Cracowski JL, Durand T, Bessard G. Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: physiology, pharmacology and clinical implications. *Trends Pharmacol Sci*. 2002;23(8):360-6.
255. Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA. Isoprostanes: formation, analysis and use as indices of lipid peroxidation in vivo. *J Biol Chem*. 1999;274(35):24441-4.
256. Milne GL, Dai Q, Roberts LJ, 2nd. The isoprostanes--25 years later. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1851(4):433-45.
257. Kadiiska MB, Gladen BC, Baird DD, Germolec D, Graham LB, Parker CE, et al. Biomarkers of oxidative stress study II: are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl₄ poisoning? *Free Radic Biol Med*. 2005;38(6):698-710.
258. Il'yasova D, Spasojevic I, Wang F, Tolun AA, Base K, Young SP, et al. Urinary biomarkers of oxidative status in a clinical model of oxidative assault. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19(6):1506-10.

259. Sakamoto H, Corcoran TB, Laffey JG, Shorten GD. Isoprostanes--markers of ischaemia reperfusion injury. *Eur J Anaesthesiol.* 2002;19(8):550-9.
260. Kelly PJ, Morrow JD, Ning M, Koroshetz W, Lo EH, Terry E, et al. Oxidative stress and matrix metalloproteinase-9 in acute ischemic stroke: the Biomarker Evaluation for Antioxidant Therapies in Stroke (BEAT-Stroke) study. *Stroke.* 2008;39(1):100-4.
261. Seet RC, Lee CY, Chan BP, Sharma VK, Teoh HL, Venketasubramanian N, et al. Oxidative damage in ischemic stroke revealed using multiple biomarkers. *Stroke.* 2011;42(8):2326-9.
262. Ulus AT, Aksoyek A, Ozkan M, Katircioglu SF, Basu S. Cardiopulmonary bypass as a cause of free radical-induced oxidative stress and enhanced blood-borne isoprostanes in humans. *Free Radic Biol Med.* 2003;34(7):911-7.
263. Veglia F, Werba JP, Tremoli E, Squellerio I, Sisillo E, Parolari A, et al. Assessment of oxidative stress in coronary artery bypass surgery: comparison between the global index OXY-SCORE and individual biomarkers. *Biomarkers.* 2009;14(7):465-72.
264. Berg K, Langaas M, Ericsson M, Pleym H, Basu S, Nordrum IS, et al. Acetylsalicylic acid treatment until surgery reduces oxidative stress and inflammation in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2013;43(6):1154-63.
265. Pratico D, Clark CM, Lee VM, Trojanowski JQ, Rokach J, FitzGerald GA. Increased 8,12-iso-iPF₂α-VI in Alzheimer's disease: correlation of a noninvasive index of lipid peroxidation with disease severity. *Ann Neurol.* 2000;48(5):809-12.
266. Montine TJ, Beal MF, Robertson D, Cudkowicz ME, Biaggioni I, O'Donnell H, et al. Cerebrospinal fluid F₂-isoprostanes are elevated in Huntington's disease. *Neurology.* 1999;52(5):1104-5.
267. Seet RC, Lee CY, Lim EC, Tan JJ, Quek AM, Chong WL, et al. Oxidative damage in Parkinson disease: Measurement using accurate biomarkers. *Free Radic Biol Med.* 2010;48(4):560-6.
268. Minghetti L, Cardone F, Greco A, Puopolo M, Levi G, Green AJ, et al. Increased CSF levels of prostaglandin E(2) in variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology.* 2002;58(1):127-9.

269. D'Amico E, Factor-Litvak P, Santella RM, Mitsumoto H. Clinical perspective on oxidative stress in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Biol Med*. 2013;65:509-27.
270. Mattsson N, Haghighi S, Andersen O, Yao Y, Rosengren L, Blennow K, et al. Elevated cerebrospinal fluid F2-isoprostane levels indicating oxidative stress in healthy siblings of multiple sclerosis patients. *Neurosci Lett*. 2007;414(3):233-6.
271. Makila-Mabe BG, Kikandau KJ, Sombo TM, Okitundu DL, Mwanza JC, Boivin MJ, et al. Serum 8,12-iso-iPF2alpha-VI isoprostane marker of oxidative damage and cognition deficits in children with konzo. *PLoS One*. 2014;9(9):e107191.
272. Wu HC, Wang Q, Yang HI, Ahsan H, Tsai WY, Wang LY, et al. Urinary 15-F2t-isoprostane, aflatoxin B1 exposure and hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Carcinogenesis*. 2008;29(5):971-6.
273. Epplein M, Franke AA, Cooney RV, Morris JS, Wilkens LR, Goodman MT, et al. Association of plasma micronutrient levels and urinary isoprostane with risk of lung cancer: the multiethnic cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(7):1962-70.
274. Barocas DA, Motley S, Cookson MS, Chang SS, Penson DF, Dai Q, et al. Oxidative stress measured by urine F2-isoprostane level is associated with prostate cancer. *J Urol*. 2011;185(6):2102-7.
275. Asombang AW, Kayamba V, Mwanza-Lisulo M, Colditz G, Mudenda V, Yarasheski K, et al. Gastric cancer in Zambian adults: a prospective case-control study that assessed dietary intake and antioxidant status by using urinary isoprostane excretion. *Am J Clin Nutr*. 2013;97(5):1029-35.
276. Kong SY, Bostick RM, Flanders WD, McClellan WM, Thyagarajan B, Gross MD, et al. Oxidative balance score, colorectal adenoma, and markers of oxidative stress and inflammation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;23(3):545-54.
277. Montuschi P, Corradi M, Ciabattini G, Nightingale J, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(1):216-20.

278. Caballero Balanza S, Martorell Aragones A, Cerda Mir JC, Belda Ramirez J, Navarro Ivanez R, Navarro Soriano A, et al. Leukotriene B4 and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of children with episodic and persistent asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2010;20(3):237-43.
279. Carpagnano GE, Kharitonov SA, Resta O, Foschino-Barbaro MP, Gramiccioni E, Barnes PJ. Increased 8-isoprostane and interleukin-6 in breath condensate of obstructive sleep apnea patients. *Chest*. 2002;122(4):1162-7.
280. Cracowski JL, Cracowski C, Bessard G, Pepin JL, Bessard J, Schwebel C, et al. Increased lipid peroxidation in patients with pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(6):1038-42.
281. Klings ES, Christman BW, McClung J, Stucchi AF, McMahon L, Brauer M, et al. Increased F2 isoprostanes in the acute chest syndrome of sickle cell disease as a marker of oxidative stress. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(7):1248-52.
282. Basu S, Whiteman M, Matthey DL, Halliwell B. Raised levels of F(2)-isoprostanes and prostaglandin F(2alpha) in different rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis*. 2001;60(6):627-31.
283. Murai Y, Hishinuma T, Suzuki N, Satoh J, Toyota T, Mizugaki M. Determination of urinary 8-epi-prostaglandin F(2alpha) using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: increased excretion in diabetics. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2000;62(2):173-81.
284. Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes (Lond)*. 2006;30(3):400-18.
285. Kaikkonen JE, Vilppo T, Asikainen J, Voutilainen S, Kurl S, Salonen JT. Fatty acids as determinants of in-vivo lipid peroxidation: the EFFGE study in Eastern Finnish hypertensive and non-hypertensive subjects. *Ann Med*. 2013;45(5-6):455-64.
286. Pou KM, Massaro JM, Hoffmann U, Vasan RS, Maurovich-Horvat P, Larson MG, et al. Visceral and subcutaneous adipose tissue volumes are cross-sectionally related to markers of inflammation and oxidative stress: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2007;116(11):1234-41.
287. Tadros TM, Massaro JM, Rosito GA, Hoffmann U, Vasan RS, Larson MG, et al. Pericardial fat volume correlates with inflammatory markers: the Framingham Heart Study. *Obesity (Silver Spring)*. 2010;18(5):1039-45.

288. Araki S, Dobashi K, Yamamoto Y, Asayama K, Kusuhashi K. Increased plasma isoprostane is associated with visceral fat, high molecular weight adiponectin, and metabolic complications in obese children. *Eur J Pediatr*. 2010;169(8):965-70.
289. Kanaya AM, Wassel CL, Stoddard PJ, Harris TB, Cummings SR, Kritchevsky SB, et al. F2-isoprostanes and adiposity in older adults. *Obesity (Silver Spring)*. 2011;19(4):861-7.
290. Helmersson J, Basu S. F(2)-isoprostane and prostaglandin F(2 alpha)metabolite excretion rate and day to day variation in healthy humans. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2001;65(2):99-102.
291. Ide T, Tsutsui H, Ohashi N, Hayashidani S, Suematsu N, Tsuchihashi M, et al. Greater oxidative stress in healthy young men compared with premenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(3):438-42.
292. Basu S, Michaelsson K, Olofsson H, Johansson S, Melhus H. Association between oxidative stress and bone mineral density. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;288(1):275-9.
293. Walsh SW, Vaughan JE, Wang Y, Roberts LJ, 2nd. Placental isoprostane is significantly increased in preeclampsia. *FASEB J*. 2000;14(10):1289-96.
294. Scholl TO, Leskiw M, Chen X, Sims M, Stein TP. Oxidative stress, diet, and the etiology of preeclampsia. *Am J Clin Nutr*. 2005;81(6):1390-6.
295. Bilodeau JF, Qin Wei S, Larose J, Greffard K, Moisan V, Audibert F, et al. Plasma F2-isoprostane class VI isomers at 12-18 weeks of pregnancy are associated with later occurrence of preeclampsia. *Free Radic Biol Med*. 2015;85:282-7.
296. Kahal H, Aburima A, Ungvari T, Rigby AS, Dawson AJ, Coady AM, et al. Polycystic ovary syndrome has no independent effect on vascular, inflammatory or thrombotic markers when matched for obesity. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013;79(2):252-8.
297. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28(7):412-9.

298. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009;120(16):1640-5.
299. DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics*. 1988;44(3):837-45.
300. Yildiz BO, Knochenhauer ES, Azziz R. Impact of obesity on the risk for polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(1):162-8.
301. Ozdemir S, Ozdemir M, Gorkemli H, Kiyici A, Bodur S. Specific dermatologic features of the polycystic ovary syndrome and its association with biochemical markers of the metabolic syndrome and hyperandrogenism. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2010;89(2):199-204.
302. Lowenstein EJ. Diagnosis and management of the dermatologic manifestations of the polycystic ovary syndrome. *Dermatol Ther*. 2006;19(4):210-23.
303. Karrer-Voegeli S, Rey F, Reymond MJ, Meuwly JY, Gaillard RC, Gomez F. Androgen dependence of hirsutism, acne, and alopecia in women: retrospective analysis of 228 patients investigated for hyperandrogenism. *Medicine (Baltimore)*. 2009;88(1):32-45.
304. Hickey M, Doherty DA, Atkinson H, Sloboda DM, Franks S, Norman RJ, et al. Clinical, ultrasound and biochemical features of polycystic ovary syndrome in adolescents: implications for diagnosis. *Hum Reprod*. 2011;26(6):1469-77.
305. van Hooff MH, Voorhorst FJ, Kaptein MB, Hirasing RA, Koppenaal C, Schoemaker J. Predictive value of menstrual cycle pattern, body mass index, hormone levels and polycystic ovaries at age 15 years for oligo-amenorrhoea at age 18 years. *Hum Reprod*. 2004;19(2):383-92.
306. Elting MW, Korsen TJ, Bezemer PD, Schoemaker J. Prevalence of diabetes mellitus, hypertension and cardiac complaints in a follow-up study of a Dutch PCOS population. *Hum Reprod*. 2001;16(3):556-60.

307. Wild S, Pierpoint T, McKeigue P, Jacobs H. Cardiovascular disease in women with polycystic ovary syndrome at long-term follow-up: a retrospective cohort study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2000;52(5):595-600.
308. Michaliszyn SF, Lee S, Tfayli H, Arslanian S. Polycystic ovary syndrome and nonalcoholic fatty liver in obese adolescents: association with metabolic risk profile. *Fertil Steril*. 2013;100(6):1745-51.
309. Karoli R, Fatima J, Chandra A, Gupta U, Islam FU, Singh G. Prevalence of hepatic steatosis in women with polycystic ovary syndrome. *J Hum Reprod Sci*. 2013;6(1):9-14.
310. Tziomalos K, Athyros VG, Karagiannis A. Non-alcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes: pathogenesis and treatment options. *Curr Vasc Pharmacol*. 2012;10(2):162-72.
311. Lobo RA, Paul WL, Goebelsmann U. Dehydroepiandrosterone sulfate as an indicator of adrenal androgen function. *Obstet Gynecol*. 1981;57(1):69-73.
312. Carmina E, Rosato F, Janni A. Increased DHEAs levels in PCO syndrome: evidence for the existence of two subgroups of patients. *J Endocrinol Invest*. 1986;9(1):5-9.
313. Kumar A. Prevalence of adrenal androgen excess in patients with the polycystic ovary syndrome (PCOS). *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005;62:644-9.
314. Wajchenberg BL, Achando SS, Okada H, Czeresnia CE, Peixoto S, Lima SS, et al. Determination of the source(s) of androgen overproduction in hirsutism associated with polycystic ovary syndrome by simultaneous adrenal and ovarian venous catheterization. Comparison with the dexamethasone suppression test. *J Clin Endocrinol Metab*. 1986;63(5):1204-10.
315. McCartney CR, Eagleson CA, Marshall JC. Regulation of gonadotropin secretion: implications for polycystic ovary syndrome. *Semin Reprod Med*. 2002;20(4):317-26.
316. Taylor AE, McCourt B, Martin KA, Anderson EJ, Adams JM, Schoenfeld D, et al. Determinants of abnormal gonadotropin secretion in clinically defined women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(7):2248-56.
317. Beyazit F, Yilmaz N, Balci O, Adam M, Yaman ST. Evaluation of Oxidative Stress in Women with Polycystic Ovarian Syndrome as Represented

by Serum Ischemia Modified Albumin and Its Correlation with Testosterone and Insulin Resistance. *Intern Med*. 2016;55(17):2359-64.

318. Zhang R, Song Q, Liu H, Bai H, Zhang Y, Liu Q, et al. Effect of the R92H and A379V genotypes of platelet-activating factor acetylhydrolase on its enzyme activity, oxidative stress and metabolic profile in Chinese women with polycystic ovary syndrome. *Lipids Health Dis*. 2017;16(1):57.

319. Zhang R, Liu H, Bai H, Zhang Y, Liu Q, Guan L, et al. Oxidative stress status in Chinese women with different clinical phenotypes of polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2017;86(1):88-96.

320. Jacob SL, Field HP, Calder N, Picton HM, Balen AH, Barth JH. Anti-Mullerian hormone reflects the severity of polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2017;86(3):395-400.

321. Matsuzaki T, Munkhzaya M, Iwasa T, Tungalagsuvd A, Yano K, Mayila Y, et al. Relationship between serum anti-Mullerian hormone and clinical parameters in polycystic ovary syndrome. *Endocr J*. 2017;64(5):531-41.

322. Ovalle F, Azziz R. Insulin resistance, polycystic ovary syndrome, and type 2 diabetes mellitus. *Fertil Steril*. 2002;77(6):1095-105.

323. Legro RS, Kunesman AR, Dunaif A. Prevalence and predictors of dyslipidemia in women with polycystic ovary syndrome. *Am J Med*. 2001;111(8):607-13.

324. Yilmaz M, Biri A, Bukan N, Karakoc A, Sancak B, Toruner F, et al. Levels of lipoprotein and homocysteine in non-obese and obese patients with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol*. 2005;20(5):258-63.

325. Bayram F, Kocer D, Ozsan M, Muhtaroglu S. Evaluation of endothelial dysfunction, lipid metabolism in women with polycystic ovary syndrome: relationship of paraoxonase 1 activity, malondialdehyde levels, low-density lipoprotein subfractions, and endothelial dysfunction. *Gynecol Endocrinol*. 2012;28(7):497-501.

326. Kelly CC, Lyall H, Petrie JR, Gould GW, Connell JM, Sattar N. Low grade chronic inflammation in women with polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(6):2453-5.

327. Vgontzas AN, Trakada G, Bixler EO, Lin HM, Pejovic S, Zoumakis E, et al. Plasma interleukin 6 levels are elevated in polycystic ovary syndrome independently of obesity or sleep apnea. *Metabolism*. 2006;55(8):1076-82.

328. Xia YH, Yao L, Zhang ZX. Correlation between IL-1beta, IL-1Ra gene polymorphism and occurrence of polycystic ovary syndrome infertility. *Asian Pac J Trop Med*. 2013;6(3):232-6.
329. Stephens JM, Butts MD, Pekala PH. Regulation of transcription factor mRNA accumulation during 3T3-L1 preadipocyte differentiation by tumour necrosis factor-alpha. *J Mol Endocrinol*. 1992;9(1):61-72.
330. Boulman N, Levy Y, Leiba R, Shachar S, Linn R, Zinder O, et al. Increased C-reactive protein levels in the polycystic ovary syndrome: a marker of cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(5):2160-5.
331. Ebejer K, Calleja-Agius J. The role of cytokines in polycystic ovarian syndrome. *Gynecol Endocrinol*. 2013;29(6):536-40.
332. Guo R, Zheng Y, Yang J, Zheng N. Association of TNF-alpha, IL-6 and IL-1beta gene polymorphisms with polycystic ovary syndrome: a meta-analysis. *BMC Genet*. 2015;16:5.
333. Badawy A, State O, El Gawad S, El Aziz OA. Plasma homocysteine and polycystic ovary syndrome: the missed link. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2007;131(1):68-72.
334. Sills ES, Genton MG, Perloe M, Schattman GL, Bralley JA, Tucker MJ. Plasma homocysteine, fasting insulin, and androgen patterns among women with polycystic ovaries and infertility. *J Obstet Gynaecol Res*. 2001;27(3):163-8.
335. Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett*. 2008;582(13):1783-7.
336. Guven S, Karahan SC, Bayram C, Ucar U, Ozeren M. Elevated concentrations of serum ischaemia-modified albumin in PCOS, a novel ischaemia marker of coronary artery disease. *Reprod Biomed Online*. 2009;19(4):493-500.
337. Neuzil J, Stocker R. Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-antioxidants for alpha-tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation. *J Biol Chem*. 1994;269(24):16712-9.
338. Morita T. Heme oxygenase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(9):1786-95.
339. Hill-Kapturczak N, Chang SH, Agarwal A. Heme oxygenase and the kidney. *DNA Cell Biol*. 2002;21(4):307-21.

340. Zhang D, Luo WY, Liao H, Wang CF, Sun Y. [The effects of oxidative stress to PCOS]. *Sichuan da xue xue bao Yi xue ban = Journal of Sichuan University Medical science edition*. 2008;39(3):421-3.
341. Kolesnikova LI, Kolesnikov SI, Darenskaya MA, Grebenkina LA, Nikitina OA, Lazareva LM, et al. Activity of LPO Processes in Women with Polycystic Ovarian Syndrome and Infertility. *Bull Exp Biol Med*. 2017;162(3):320-2.
342. Melo AS, Kliemchen J, Junior AA, Ferriani RA, Navarro PA. Oxidative stress and polycystic ovary syndrome: evaluation during ovarian stimulation for ICSI. *Reproduction*. 2016.
343. Sharma A, Kharb S, Chugh SN, Kakkar R, Singh GP. Evaluation of oxidative stress before and after control of glycemia and after vitamin E supplementation in diabetic patients. *Metabolism*. 2000;49(2):160-2.
344. Chatziralli IP, Theodossiadis G, Dimitriadis P, Charalambidis M, Agorastos A, Migkos Z, et al. The Effect of Vitamin E on Oxidative Stress Indicated by Serum Malondialdehyde in Insulin-dependent Type 2 Diabetes Mellitus Patients with Retinopathy. *Open Ophthalmol J*. 2017;11:51-8.
345. Dysken MW, Guarino PD, Vertrees JE, Asthana S, Sano M, Llorente M, et al. Vitamin E and memantine in Alzheimer's disease: clinical trial methods and baseline data. *Alzheimers Dement*. 2014;10(1):36-44.
346. Huang Y, Wu R, Su ZY, Guo Y, Zheng X, Yang CS, et al. A naturally occurring mixture of tocotrienols inhibits the growth of human prostate tumor, associated with epigenetic modifications of cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p27. *J Nutr Biochem*. 2017;40:155-63.
347. de Melo-Diogo D, Pais-Silva C, Costa EC, Louro RO, Correia IJ. D-alpha-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate functionalized nanographene oxide for cancer therapy. *Nanomedicine (Lond)*. 2017;12(5):443-56.
348. Ebrahimi FA, Samimi M, Foroozanfard F, Jamilian M, Akbari H, Rahmani E, et al. The Effects of Omega-3 Fatty Acids and Vitamin E Co-Supplementation on Indices of Insulin Resistance and Hormonal Parameters in Patients with Polycystic Ovary Syndrome: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2017.
349. Shokrpour M, Asemi Z. The Effects of Magnesium and Vitamin E Co-Supplementation on Hormonal Status and Biomarkers of Inflammation and

Oxidative Stress in Women with Polycystic Ovary Syndrome. *Biol Trace Elem Res.* 2018.

350. Moti M, Amini L, Mirhoseini Ardakani SS, Kamalzadeh S, Masoomikarimi M, Jafarisani M. Oxidative stress and anti-oxidant defense system in Iranian women with polycystic ovary syndrome. *Iran J Reprod Med.* 2015;13(6):373-8.

351. Jamilian H, Jamilian M, Samimi M, Afshar Ebrahimi F, Rahimi M, Bahmani F, et al. Oral carnitine supplementation influences mental health parameters and biomarkers of oxidative stress in women with polycystic ovary syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Gynecol Endocrinol.* 2017;33(6):442-7.

352. Lee BJ, Lin JS, Lin YC, Lin PT. Effects of L-carnitine supplementation on oxidative stress and antioxidant enzymes activities in patients with coronary artery disease: a randomized, placebo-controlled trial. *Nutr J.* 2014;13:79.

353. Fernandez-Real JM, Lopez-Bermejo A, Ricart W. Cross-talk between iron metabolism and diabetes. *Diabetes.* 2002;51(8):2348-54.

354. Li M, Tang Y, Lin C, Huang Q, Lei D, Hu Y. Serum Macroelement and Microelement Concentrations in Patients with Polycystic Ovary Syndrome: a Cross-Sectional Study. *Biol Trace Elem Res.* 2017;176(1):73-80.

355. Kim JW, Kang KM, Yoon TK, Shim SH, Lee WS. Study of circulating hepcidin in association with iron excess, metabolic syndrome, and BMP-6 expression in granulosa cells in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2014;102(2):548-54 e2.

356. Yang JH, Chou CH, Yang WS, Ho HN, Yang YS, Chen MJ. Iron stores and obesity are negatively associated with ovarian volume and anti-Mullerian hormone levels in women with polycystic ovary syndrome. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2015;54(6):686-92.

357. Sharif ME, Adam I, Ahmed MA, Rayis DA, Hamdan HZ. Serum Level of Zinc and Copper in Sudanese Women with Polycystic Ovarian Syndrome. *Biol Trace Elem Res.* 2017.

358. Hawk SN, Lanoue L, Keen CL, Kwik-Urbe CL, Rucker RB, Uriu-Adams JY. Copper-deficient rat embryos are characterized by low superoxide dismutase activity and elevated superoxide anions. *Biol Reprod.* 2003;68(3):896-903.

359. Sun Y, Wang W, Guo Y, Zheng B, Li H, Chen J, et al. High copper levels in follicular fluid affect follicle development in polycystic ovary syndrome patients: Population-based and in vitro studies. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2019;365:101-11.
360. Spritzer PM, Lecke SB, Fabris VC, Ziegelmann PK, Amaral L. Blood Trace Element Concentrations in Polycystic Ovary Syndrome: Systematic Review and Meta-analysis. *Biol Trace Elem Res.* 2017;175(2):254-62.
361. Abedini M, Ghaedi E, Hadi A, Mohammadi H, Amani R. Zinc status and polycystic ovarian syndrome: A systematic review and meta-analysis. *J Trace Elem Med Biol.* 2019;52:216-21.
362. Sabuncu T, Vural H, Harma M. Oxidative stress in polycystic ovary syndrome and its contribution to the risk of cardiovascular disease. *Clin Biochem.* 2001;34(5):407-13.
363. Kaya C, Erkan AF, Cengiz SD, Dunder I, Demirel OE, Bilgihan A. Advanced oxidation protein products are increased in women with polycystic ovary syndrome: relationship with traditional and nontraditional cardiovascular risk factors in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2009;92(4):1372-7.
364. Banuls C, Rovira-Llopis S, Martinez de Marañon A, Veses S, Jover A, Gomez M, et al. Metabolic syndrome enhances endoplasmic reticulum, oxidative stress and leukocyte-endothelium interactions in PCOS. *Metabolism.* 2017;71:153-62.
365. Higdon JV, Frei B. Obesity and oxidative stress: a direct link to CVD? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(3):365-7.
366. Fernandez-Sanchez A, Madrigal-Santillan E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-Gonzalez A, Esquivel-Chirino C, et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci.* 2011;12(5):3117-32.
367. Savini I, Catani MV, Evangelista D, Gasperi V, Avigliano L. Obesity-associated oxidative stress: strategies finalized to improve redox state. *Int J Mol Sci.* 2013;14(5):10497-538.
368. Molnar D, Decsi T, Koletzko B. Reduced antioxidant status in obese children with multimetabolic syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2004;28(10):1197-202.

369. Arnaud J, Bertrais S, Roussel AM, Arnault N, Ruffieux D, Favier A, et al. Serum selenium determinants in French adults: the SU.VI.M.AX study. *Br J Nutr*. 2006;95(2):313-20.
370. Bougoulia M, Triantos A, Koliakos G. Plasma interleukin-6 levels, glutathione peroxidase and isoprostane in obese women before and after weight loss. Association with cardiovascular risk factors. *Hormones (Athens)*. 2006;5(3):192-9.
371. Lima SC, Arrais RF, Sales CH, Almeida MG, de Sena KC, Oliveira VT, et al. Assessment of copper and lipid profile in obese children and adolescents. *Biol Trace Elem Res*. 2006;114(1-3):19-29.
372. Bannigida DM, Shivananda Nayak B, Vijayaraghavan R. Insulin resistance and oxidative marker in women with PCOS. *Arch Physiol Biochem*. 2018:1-4.
373. Di Segni C, Silvestrini A, Fato R, Bergamini C, Guidi F, Raimondo S, et al. Plasmatic and Intracellular Markers of Oxidative Stress in Normal Weight and Obese Patients with Polycystic Ovary Syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2017;125(8):506-13.
374. Karamali M, Kashanian M, Alaeinasab S, Asemi Z. The effect of dietary soy intake on weight loss, glycaemic control, lipid profiles and biomarkers of inflammation and oxidative stress in women with polycystic ovary syndrome: a randomised clinical trial. *J Hum Nutr Diet*. 2018.
375. Roberts CK, Vaziri ND, Barnard RJ. Effect of diet and exercise intervention on blood pressure, insulin, oxidative stress, and nitric oxide availability. *Circulation*. 2002;106(20):2530-2.
376. De Tursi Rispoli L, Vazquez Tarragon A, Vazquez Prado A, Saez Tormo G, Mahmoud AI, Bruna Esteban M, et al. [Relationship of oxidative stress and weight loss achieved in morbid obese patients by means of bariatric surgery using the duodenal switch technique]. *Nutr Hosp*. 2013;28(4):1085-92.
377. Cruz KJ, de Oliveira AR, Marreiro Ddo N. Antioxidant role of zinc in diabetes mellitus. *World J Diabetes*. 2015;6(2):333-7.
378. Marreiro DN, Geloneze B, Tambascia MA, Lerario AC, Halpern A, Cozzolino SM. [Role of zinc in insulin resistance]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2004;48(2):234-9.

379. Anderson RA, Roussel AM, Zouari N, Mahjoub S, Matheau JM, Kerkeni A. Potential antioxidant effects of zinc and chromium supplementation in people with type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Nutr.* 2001;20(3):212-8.
380. Mazloomi S, Alizadeh N, Aminzare M, Niroomand S, Mousavi SN. Serum Zinc and Adiponectin Levels in Patients with Polycystic Ovary Syndrome, Adjusted for Anthropometric, Biochemical, Dietary Intake, and Physical Activity Measures. *Biol Trace Elem Res.* 2017.
381. Swaminathan S, Fonseca VA, Alam MG, Shah SV. The role of iron in diabetes and its complications. *Diabetes Care.* 2007;30(7):1926-33.
382. Davi G, Falco A, Patrono C. Lipid peroxidation in diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal.* 2005;7(1-2):256-68.
383. Ingram KH, Hill H, Moellering DR, Hill BG, Lara-Castro C, Newcomer B, et al. Skeletal muscle lipid peroxidation and insulin resistance in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(7):E1182-6.
384. Sampson MJ, Gopaul N, Davies IR, Hughes DA, Carrier MJ. Plasma F2 isoprostanes: direct evidence of increased free radical damage during acute hyperglycemia in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2002;25(3):537-41.
385. Takayanagi R, Inoguchi T, Ohnaka K. Clinical and experimental evidence for oxidative stress as an exacerbating factor of diabetes mellitus. *J Clin Biochem Nutr.* 2011;48(1):72-7.
386. Seow KM, Juan CC, Hsu YP, Hwang JL, Huang LW, Ho LT. Amelioration of insulin resistance in women with PCOS via reduced insulin receptor substrate-1 Ser312 phosphorylation following laparoscopic ovarian electrocautery. *Hum Reprod.* 2007;22(4):1003-10.
387. Rosenbaum D, Haber RS, Dunaif A. Insulin resistance in polycystic ovary syndrome: decreased expression of GLUT-4 glucose transporters in adipocytes. *Am J Physiol.* 1993;264(2 Pt 1):E197-202.
388. Apridonidze T, Essah PA, Iuorno MJ, Nestler JE. Prevalence and characteristics of the metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(4):1929-35.
389. Vrbikova J, Vondra K, Cibula D, Dvorakova K, Stanicka S, Sramkova D, et al. Metabolic syndrome in young Czech women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2005;20(12):3328-32.

390. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement: Executive Summary. *Crit Pathw Cardiol*. 2005;4(4):198-203.
391. Zhang J, Zhang Y, Liu H, Bai H, Wang Y, Jiang C, et al. Antioxidant properties of high-density lipoproteins are impaired in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2015;103(5):1346-54.
392. Fan P, Liu H, Wang Y, Zhang F, Bai H. Apolipoprotein E-containing HDL-associated platelet-activating factor acetylhydrolase activities and malondialdehyde concentrations in patients with PCOS. *Reprod Biomed Online*. 2012;24(2):197-205.
393. Gonzalez F, Nair KS, Daniels JK, Basal E, Schimke JM, Blair HE. Hyperandrogenism sensitizes leukocytes to hyperglycemia to promote oxidative stress in lean reproductive-age women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(8):2836-43.
394. Stamatiadis D, Bulteau-Portois MC, Mowszowicz I. Inhibition of 5 alpha-reductase activity in human skin by zinc and azelaic acid. *Br J Dermatol*. 1988;119(5):627-32.
395. Jamilian M, Foroozanfard F, Bahmani F, Talaee R, Monavari M, Asemi Z. Effects of Zinc Supplementation on Endocrine Outcomes in Women with Polycystic Ovary Syndrome: a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Biol Trace Elem Res*. 2016;170(2):271-8.
396. Verit FF, Erel O. Oxidative stress in nonobese women with polycystic ovary syndrome: correlations with endocrine and screening parameters. *Gynecol Obstet Invest*. 2008;65(4):233-9.
397. Pasquali R, Gambineri A. New perspectives on the definition and management of polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest*. 2018.
398. Condorelli RA, Calogero AE, Di Mauro M, Mongioi LM, Cannarella R, Rosta G, et al. Androgen excess and metabolic disorders in women with PCOS: beyond the body mass index. *J Endocrinol Invest*. 2018;41(4):383-8.
399. Fenkci V, Fenkci S, Yilmazer M, Serteser M. Decreased total antioxidant status and increased oxidative stress in women with polycystic ovary syndrome may contribute to the risk of cardiovascular disease. *Fertil Steril*. 2003;80(1):123-7.

400. Costa EC, Sa JC, Soares EM, Lemos TM, Maranhao TM, Azevedo GD. [Evaluation of cardiovascular risk by the LAP index in non-obese patients with polycystic ovary syndrome]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2010;54(7):630-5.
401. Rosenfield RL. Polycystic ovary syndrome and insulin-resistant hyperinsulinemia. *J Am Acad Dermatol.* 2001;45(3 Suppl):S95-104.
402. Polak K, Czyzyk A, Simoncini T, Meczekalski B. New markers of insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest.* 2017;40(1):1-8.
403. Ozegowska K, Pawelczyk L. Cardiometabolic risk in patients with polycystic ovary syndrome. *Ginekol Pol.* 2015;86(11):840-8.
404. Nascimento JX, Chein MB, de Sousa RM, Ferreira Ados S, Navarro PA, Brito LM. Importance of lipid accumulation product index as a marker of CVD risk in PCOS women. *Lipids Health Dis.* 2015;14:62.
405. Costabile G, Della Pepa G, Bozzetto L, Annuzzi G, Vetrani C, Giacco R, et al. Urine 8-isoprostane in relation to adiposity and insulin resistance in individuals at high cardiometabolic risk. *Metab Syndr Relat Disord.* 2015;13(4):187-91.
406. Ueland PM, Refsum H, Beresford SA, Vollset SE. The controversy over homocysteine and cardiovascular risk. *Am J Clin Nutr.* 2000;72(2):324-32.
407. Knekt P, Alfthan G, Aromaa A, Heliovaara M, Marniemi J, Rissanen H, et al. Homocysteine and major coronary events: a prospective population study amongst women. *J Intern Med.* 2001;249(5):461-5.
408. Makedos A, Goulis DG, Arvanitidou M, Mintziori G, Papanikolaou A, Makedou A, et al. Increased serum C-reactive protein levels in normal weight women with polycystic ovary syndrome. *Hippokratia.* 2011;15(4):323-6.
409. Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, Eda S, Eiriksdottir G, Rumley A, et al. C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med.* 2004;350(14):1387-97.
410. Patrono C, FitzGerald GA. Isoprostanes: potential markers of oxidant stress in atherothrombotic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17(11):2309-15.
411. Singh AK, Singh R. Can anti-Mullerian hormone replace ultrasonographic evaluation in polycystic ovary syndrome? A review of current progress. *Indian J Endocrinol Metab.* 2015;19(6):731-43.

412. Wiweko B, Maidarti M, Priangga MD, Shafira N, Fernando D, Sumapraja K, et al. Anti-mullerian hormone as a diagnostic and prognostic tool for PCOS patients. *J Assist Reprod Genet.* 2014;31(10):1311-6.
413. Bani Mohammad M, Majdi Seghinsara A. Polycystic Ovary Syndrome (PCOS), Diagnostic Criteria, and AMH. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017;18(1):17-21.
414. Chao KC, Ho CH, Shyong WY, Huang CY, Tsai SC, Cheng HY, et al. Anti-Mullerian hormone serum level as a predictive marker of ovarian function in Taiwanese women. *J Chin Med Assoc.* 2012;75(2):70-4.
415. Safier LZ, Grossman LC, Chan CW, Sauer MV, Lobo RA, Douglas NC. Use of anti-Mullerian hormone testing during ovarian reserve screening to identify women at risk of polycystic ovary syndrome. *Int J Gynaecol Obstet.* 2016;135(1):73-6.
416. Woo HY, Kim KH, Rhee EJ, Park H, Lee MK. Differences of the association of anti-Mullerian hormone with clinical or biochemical characteristics between women with and without polycystic ovary syndrome. *Endocr J.* 2012;59(9):781-90.
417. Pigny P, Jonard S, Robert Y, Dewailly D. Serum anti-Mullerian hormone as a surrogate for antral follicle count for definition of the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(3):941-5.
418. Koninger A, Koch L, Edimiris P, Enekwe A, Nagarajah J, Kasimir-Bauer S, et al. Anti-Mullerian Hormone: an indicator for the severity of polycystic ovarian syndrome. *Arch Gynecol Obstet.* 2014;290(5):1023-30.
419. Sahmay S, Atakul N, Aydogan B, Aydin Y, Imamoglu M, Seyisoglu H. Elevated serum levels of anti-Mullerian hormone can be introduced as a new diagnostic marker for polycystic ovary syndrome. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2013;92(12):1369-74.
420. Sahmay S, Aydin Y, Oncul M, Senturk LM. Diagnosis of Polycystic Ovary Syndrome: AMH in combination with clinical symptoms. *J Assist Reprod Genet.* 2014;31(2):213-20.
421. Jamil AS, Alalaf SK, Al-Tawil NG, Al-Shawaf T. Comparison of clinical and hormonal characteristics among four phenotypes of polycystic ovary syndrome based on the Rotterdam criteria. *Arch Gynecol Obstet.* 2016;293(2):447-56.

422. Sova H, Unkila-Kallio L, Tiitinen A, Hippelainen M, Perheentupa A, Tinkanen H, et al. Hormone profiling, including anti-Mullerian hormone (AMH), for the diagnosis of polycystic ovary syndrome (PCOS) and characterization of PCOS phenotypes. *Gynecol Endocrinol*. 2019:1-6.
423. Escobar-Morreale HF, Asuncion M, Calvo RM, Sancho J, San Millan JL. Receiver operating characteristic analysis of the performance of basal serum hormone profiles for the diagnosis of polycystic ovary syndrome in epidemiological studies. *Eur J Endocrinol*. 2001;145(5):619-24.

9 ANEXOS

ANEXO I

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPANTES EN EL PROYECTO

CIENTÍFICO: “Estudio de casos y controles de base poblacional en ovario poliquístico: análisis epidemiológico de los determinantes y consecuencias clínicas en la salud de la mujer”

La Sra. Dña., mayor de edad, con DNI nº, reconoce mediante este documento que ha sido adecuada y ampliamente informada del procedimiento de Donación de orina y sangre para dicho proyecto aprobado previamente por la Comisión de Ética de Investigación de la Universidad de Murcia.

El objetivo de este estudio es valorar el efecto de los estilos de vida y la exposición a compuestos químicos ambientales sobre la salud sexual y reproductiva de mujeres.

Procedimientos a realizar:

- Muestras de sangre y orina
- Exploración ginecológica y ecografía
- Cumplimentación de cuestionarios
- Aspectos genéticos y bioquímicos
- Acceso a historial clínico (hospitalario y centro de salud)

Queda totalmente claro que dicho procedimiento de donación es:

- Anónimo
- Altruista
- Voluntario

Dicho procedimiento se efectúa bajo el amparo de la legislación vigente sobre protección de datos personales.

¿Podríamos contactarte en el futuro para otros estudios? ☐ Sí ☐ No

Comprendo la importancia de este documento y lo firmo dando mi consentimiento, en Murcia, a de de 201_

Firma de la donante

ANEXO II

MEDICIÓN: Desde 1 (vello presente mínimo) a 4 (equivalente a vello masculino).

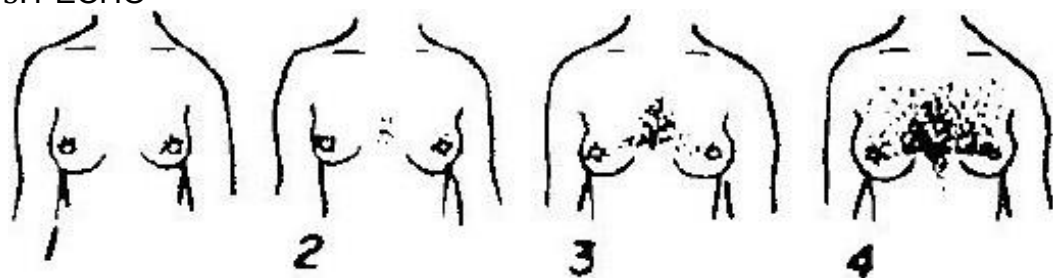
1. LABIO SUPERIOR



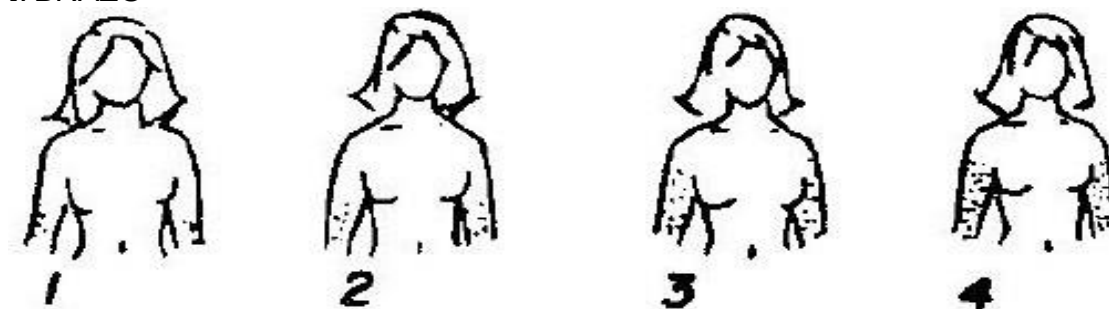
2. BARBILLA



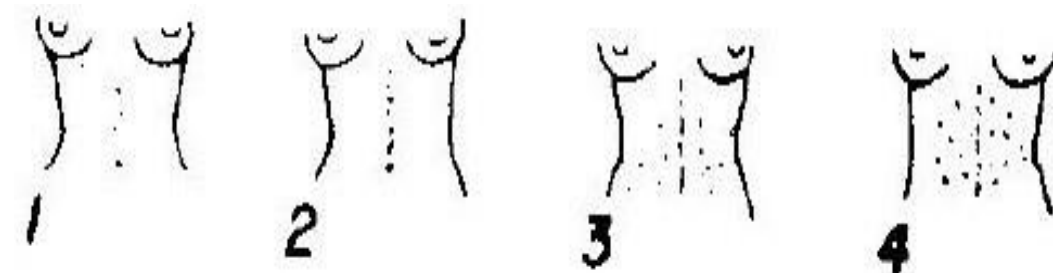
3. PECHO



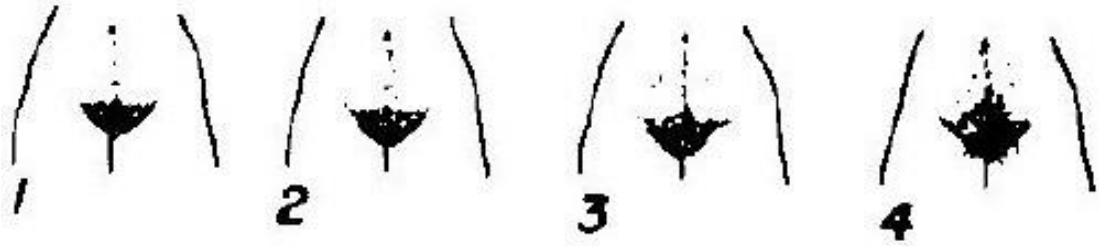
4. BRAZO



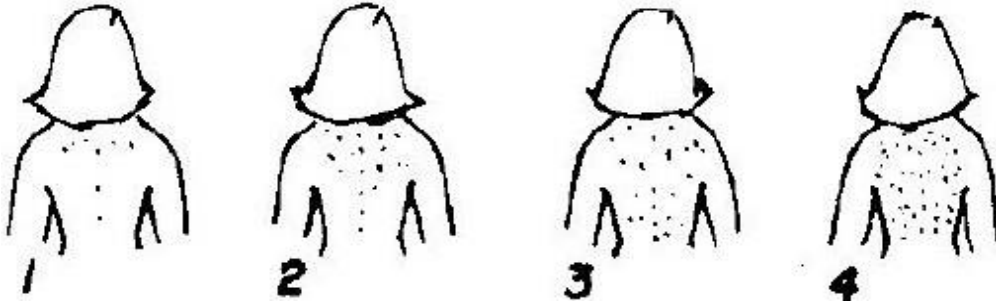
5. ABDOMEN ALTO



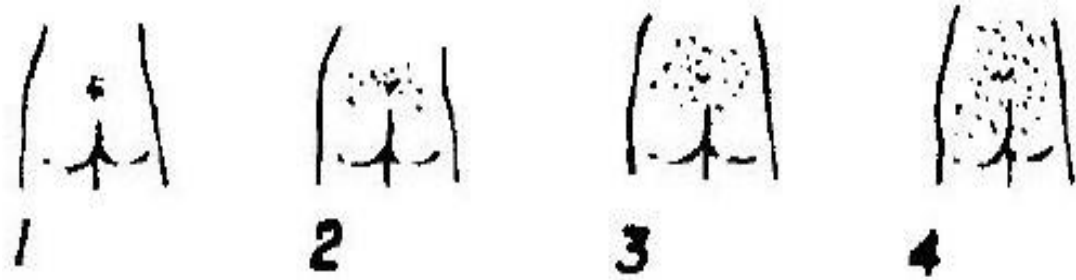
6. ABDOMEN BAJO



7. ESPALDA ALTA



8. ESPALDA BAJA Y TRASERO



9. PARTE BAJA DE LAS PIERNAS (MUSLOS)



REGION	GRADO	DEFINICIÓN
Labio superior	1	Pocos pelos en márgenes externos
	2	Pequeño bigote en márgenes externos
	3	Bigote desde mitad del labio a márgenes externos
	4	Cubierto
Mejilla	1	Pelos aislados
	2	Pequeñas acumulaciones de pelos
	3 y 4	Completamente cubierta
Tórax	1	Pelos periareolares
	2	Además, algunos en línea media
	3	Fusión de áreas anteriores con $\frac{1}{4}$ partes cubiertas
	4	Completamente cubierta
Espalda superior	1	Pelos aislados
	2	Algunos más
	3 y 4	Completamente cubierta
Espalda inferior	1	Mechón de pelos en sacro
	2	Con extensión lateral
	3	$\frac{1}{4}$ partes cubiertas
	4	Completamente cubierta
Abdomen superior	1	Pocos pelos en línea media
	2	Algunos más todavía en línea media
	3 y 4	Cubierto totalmente
Abdomen inferior	1	Pocos pelos en línea media
	2	Banda en línea media
	3	Banda más acentuada en línea media
	4	Crecimiento en V invertida
Brazo	1	Pelo sin afectar más de $\frac{1}{4}$ de la superficie
	2	Cubierto aunque no completo
	3 y 4	Completamente cubierto
Antebrazo	1,2,3,4	Cubierto completamente en superficie dorsal; 1 y 2 pelo aislado, 3 y 4 más abundante
Muslo	1,2,3,4	Como el brazo
Piernas	1,2,3,4	Igual que el antebrazo

ANEXO III

Artículos científicos publicados.

- **Elevation of isoprostanes in polycystic ovary syndrome and its relationship with cardiovascular risk factors. Journal of Endocrinological Investigation. Volumen 42, supplement 1, April 2018, pages 75-83.**

Resumen:

Purpose. To evaluate the plasma level of 8-isoprostanes in women with polycystic ovary syndrome. To also investigate whether there is a relationship between 8-isoprostanes and several cardiovascular risk factors.

Methods. A total of 125 women with polycystic ovary syndrome and 169 healthy women were enrolled in this case–control study. 8-Isoprostanes and different parameters were measured in all subjects. Patients were evaluated for the presence of polycystic ovary syndrome according to the Rotterdam Consensus Conference criteria.

Results. 8-Isoprostanes levels were significantly higher in patients with polycystic ovary syndrome (138.4 ± 104.1 pg/mL) compared with control group (68.6 ± 34.3 pg/mL) ($p < 0.001$). The mean of triglycerides, lipid accumulation product, C-reactive protein, homocysteine, insulin, and homeostatic model assessment for insulin resistance were significantly higher in polycystic ovary syndrome patients with high 8-isoprostanes than those with normal 8-isoprostanes ($p < 0.05$). The Pearson correlation analyses showed that 8-isoprostanes levels in polycystic ovary syndrome group had a positive correlation with waist circumference, triglycerides, low-density lipoprotein cholesterol, apolipoprotein B, homocysteine, insulin, homeostatic model assessment for insulin resistance.

Conclusion. Patients with polycystic ovary syndrome have higher 8-isoprostanes levels and it is associated with several cardiovascular risk factors.

- **AMH in combination with SHBG for the diagnosis of Polycystic Ovary Syndrome. Journal of Obstetrics and Gynaecology. DOI: 10.1080/01443615.2019.1587604.**

Resumen:

Serum Anti-Müllerian hormone (AMH) level could be useful for diagnosis of polycystic ovary syndrome (PCOS). We evaluated the hormonal status in women for the diagnosis of PCOS.

A total of 77 PCOS women and 106 healthy women were enrolled in this study. Serum AMH, gonadotropins (LH and FSH), estradiol, testosterone (total and free), 4-androstenedione (ANDST), dehydroepiandrosterone sulfate, sex hormone binding globulin (SHBG), prolactin, thyroid-stimulating hormone (TSH) and insulin levels were measured in all enrolled women. Our data showed that insulin, LH, testosterone, ANDST and AHM levels were significantly higher in the PCOS group and FSH and SHBG levels were lower in the PCOS group. In ROC analysis, the combination of AMH with SHBG showed higher AUC for PCOS diagnosis with an AUC of 0.843 and a specificity of 81.1% and a sensitivity of 72.7%.

Our results suggest that a combination of serum AMH and SHBG levels could be used as a diagnostic biomarker of PCOS.

