



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS Y ODONTOLÓGICAS Y DE
LA SALUD
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES “DR. BERNARDO SEPÚLVEDA”, CENTRO MÉDICO NACIONAL
SIGLO XXI
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CIENCIAS MÉDICAS

**PERFIL DE CITOCINAS ASOCIADO A SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO EN ADULTOS
CON DIABETES TIPO 1**

GRADUACIÓN POR TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:
MANUEL RAMÓN GARCÍA SÁENZ

TUTOR PRINCIPAL:
DRA. CLAUDIA RAMÍREZ RENTERÍA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES ENDOCRINAS, CENTRO MÉDICO
NACIONAL SIGLO XXI, INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DRA. LESLY AMINTA PORTOCARRERO ORTÍZ
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROLOGÍA

DRA. VICTORIA MENDOZA ZUBIETA
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

[ENERO 2023, CIUDAD DE MÉXICO]



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

HOSPITAL DE ESPECIALIDADES “DR. BERNARDO SEPÚLVEDA”, CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

TÍTULO DEL PROYECTO:

“Perfil de citocinas asociado a síndrome de ovario poliquístico en adultos con diabetes tipo 1.”

1. IDENTIFICACIÓN DE LOS INVESTIGADORES

1.1 Investigador Responsable:

Dra. Claudia Ramírez Rentería.

Investigador asociado B, SNI I, Médico especialista en Endocrinología, Maestro en Ciencias Médicas. Unidad de investigación en Enfermedades Endocrinas. Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda”, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Avenida Cuauhtémoc 330, Colonia Doctores, Delegación Cuauhtémoc, CP 06720, CDMX. Tel. 55 5627 6900, Ext 21551, Correo electrónico: clau.r2000@gmail.com

1.2 Investigadores Asociados:

Dr. Aldo Ferreira Hermosillo.

Investigador asociado C, SNI II, Médico especialista en Endocrinología, Maestro en Ciencias Médicas. Unidad de investigación en Enfermedades Endocrinas. Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda”, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Avenida Cuauhtémoc 330, Colonia Doctores, Delegación Cuauhtémoc, CP 06720, CDMX. Tel. 55 5627 6900, Ext 21551, Correo electrónico: aldo.nagisa@gmail.com

Dra. Nitzia Graciela López Juárez.

Médico especialista en Endocrinología, con Subespecialidad en Biología de la Reproducción Humana. UMAE Hospital de Cardiología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Avenida Cuauhtémoc 330, Colonia Doctores, Delegación Cuauhtémoc, CP 06720, CDMX. Tel. 55 5627 6900, Ext 21551, Correo electrónico: nitglj@gmail.com

Dra. Renata Saucedo García.

Doctora en Ciencias Biológicas. Unidad de investigación en Enfermedades Endocrinas. Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda”, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Avenida Cuauhtémoc 330, Colonia Doctores, Delegación Cuauhtémoc, CP 06720, CDMX. Tel. 55 5627 6900, Ext 21479, Correo electrónico: sgrenata76@gmail.com

Dr. Jorge Valencia Ortega.

Doctor en Ciencias Biomédicas. Unidad de investigación en Enfermedades Endocrinas. Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda”, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Avenida Cuauhtémoc 330, Colonia Doctores, Delegación Cuauhtémoc, CP 06720, CDMX. Tel. 55 5627 6900, Ext 21479.

Dr. Alberto Vielma Valdés.

Médico especialista en Ginecología y obstetricia, con Subespecialidad en Biología de la Reproducción Humana. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, Calle Vasco de Quiroga 15, Belisario Domínguez Secc 16, Tlalpan, CP 14080, CDMX. Tel: 5554870900, Ext. Correo Electrónico: betovielma50@gmail.com

1.3 Tesista:

Manuel Ramón García Sáenz.

Estudiante de Maestría en Ciencias Médicas, Médico especialista en Endocrinología y Subespecialista en Biología de la Reproducción Humana. Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda”, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Avenida Cuauhtémoc 330, Colonia Doctores, Delegación Cuauhtémoc, CP 06720, CDMX. Tel. 55 5627 6900, Ext 21551, Correo electrónico: manuel.gsm@hotmail.com

Num. Registro Institucional del Proyecto: R-2021-3601-129

2. CONTENIDO

1. IDENTIFICACIÓN DE LOS INVESTIGADORES _____	1
2. CONTENIDO _____	3
3. RESUMEN ESTRUCTURADO _____	5
4. MARCO TEÓRICO	
4.1. Introducción _____	6
4.2. Relación entre SOP y DM1 _____	8
4.3. Citocinas y DM1 _____	11
4.3.1 Citocinas con potencial pro-inflamatorio y DM1 _____	12
4.4. Citocinas y SOP _____	13
4.4.1 Citocinas con potencial pro-inflamatorio y SOP _____	13
4.5. Problemas metabólicos posiblemente asociados a SOP y DM1 _____	15
5. JUSTIFICACIÓN _____	17
6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA _____	18
6.1. Pregunta de investigación _____	19
7. HIPÓTESIS _____	20
8. OBJETIVO GENERAL _____	20
9. MATERIAL Y MÉTODOS	
9.1. Universo de Trabajo _____	20
9.2. Criterios de inclusión para la muestra _____	21
9.3. Criterios de no inclusión _____	21
9.4. Criterios de eliminación _____	21
9.5. Lugar donde se desarrollará el estudio _____	21
10. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO	
10.1. Características del estudio _____	22
10.2. Descripción general del estudio _____	22
10.3. Procedimiento para la cuantificación de citocinas _____	24
10.4. Procesamiento de los datos _____	28
11. DESCRIPCIÓN DE VARIABLES	
11.1. Variable independiente _____	29
11.2. Variables que integran la variable independiente _____	30
11.2. Variables dependientes _____	31

11.3. Variables potencialmente confusoras_____	32
12. ASPECTOS ESTADÍSTICOS	
12.1. Análisis descriptivo_____	33
12.2. Análisis inferencial_____	33
13. TAMAÑO DE LA MUESTRA_____	34
14. ASPECTOS ÉTICOS	
14.1. Apego a las normas éticas_____	36
14.2. Riesgo del estudio_____	36
14.3. Consentimiento informado_____	37
14.4. Contribuciones y beneficios del estudio para los participantes_____	37
14.5. Balance riesgo/beneficio_____	37
14.6. Confidencialidad_____	38
14.7. Obtención del consentimiento informado_____	38
14.8. Selección de participantes_____	38
14.9. Beneficios al final del estudio_____	39
15. RECURSOS, FINANCIAMIENTO Y FACTIBILIDAD	
15.1. Recursos humanos_____	39
15.2. Recursos físicos y materiales_____	39
15.3. Recursos financieros_____	40
15.4. Factibilidad_____	40
16. ASPECTOS DE BIOSEGURIDAD_____	40
17. CRONOGRAMA_____	42
18. RESULTADOS_____	43
19. DISCUSIÓN_____	54
20. CONCLUSIONES_____	61
21. BIBLIOGRAFÍA_____	62
22. ANEXO 1_____	71
23. ANEXO 2_____	73
24. ANEXO 3_____	75
22. ANEXO 4_____	76

3. RESUMEN ESTRUCTURADO

Título: Perfil de citocinas asociado a síndrome de ovario poliquístico en adultos con diabetes tipo 1.

Antecedentes: El Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP) parece tener una mayor prevalencia en las mujeres que viven con Diabetes tipo 1 (DM1). Tanto la DM1 como el SOP se consideran enfermedades con un estado inflamatorio crónico leve, el cual no ha sido evaluado en mujeres que tienen SOP y viven con DM1.

Objetivo: Comparar las concentraciones de citocinas y proteínas proinflamatorias (en específico IL-6, TNF- α , PCR) en mujeres con diagnóstico de DM1 y SOP, con aquellas sin criterios de SOP.

Material y Métodos: Estudio observacional descriptivo transversal, donde se incluirán las pacientes que viven con DM1 que se atienden en la Clínica de Diabetes tipo 1 del Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda” de CMN Siglo XXI. Se protocolizarán para diagnóstico de SOP evaluados clínicamente por 2 expertos en el área, bioquímicamente con resultados de andrógenos séricos y citocinas, evaluación imagenológica por experto en el área. El análisis estadístico se realizará analítica descriptiva usando medias o medianas según la distribución de los datos, y se realizará un análisis bivariado entre variables cuantitativas y cualitativas según las agrupaciones con SOP y sin SOP.

Recursos, infraestructura, experiencia del grupo: Se incluirán expertos en el área de diferentes unidades hospitalarias, pero todo el protocolo se realizará en el Hospital de Especialidades CMN SXXI, el cual cuenta con toda la infraestructura y estudios necesarios para realizar el estudio. El equipo de investigación tiene experiencia en tratamiento y evaluación de la mujer en etapa reproductiva.

Tiempo para desarrollarlo: 1 año

4. MARCO TEÓRICO

4.1 INTRODUCCIÓN

La Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1), es una enfermedad generalmente autoinmune caracterizada por la destrucción de la célula beta (β) pancreática, resultando en una deficiencia absoluta de insulina,⁽¹⁾ en la cual existe una necesidad inmediata y permanente de reemplazo con insulina exógena.⁽²⁾

El Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP), es un trastorno heterogéneo que está definido por la combinación de signos y síntomas de exceso de andrógenos (hirsutismo y/o hiperandrogenemia), y disfunción ovárica (oligo-amenorrea y/o morfología de ovarios poliquísticos (MOP)), para su diagnóstico es necesario la exclusión de otras endocrinopatías (como hiperplasia suprarrenal congénita, hiperprolactinemia, hipotiroidismo, etc).^(3, 4, 5)

La apariencia poliquística de los ovarios frecuentemente encontrada en los pacientes con SOP es causada por la acumulación de folículos ováricos en diversos estadios de maduración y/o atresia.⁽⁶⁾ Los folículos ováricos son agregados celulares que contienen un simple ovocito y no son quistes (la cual, según la definición médica, es un saco membranoso o cavidades que contienen un fluido anormal), por lo que el nombre de SOP debe ser considerado un nombre equivocado. Sin embargo, dada la ausencia de una evidencia sólida sobre la etiología y fisiopatología de este trastorno, los diferentes nombres propuestos para esta entidad reflejan las interpretaciones y creencias de aquellos que los proponen. Como resultado, los expertos quienes defienden el principal componente como el exceso de andrógenos, proponen nombres como: Hiperandrogenismo Ovárico Funcional (HOF)⁽⁵⁾, Anovulación Hiperandrogénica-Crónica (AHC)⁽⁷⁾, o Hiperandrogenismo Funcional Femenino (HFF)⁽⁸⁾; aquellos quienes sugieren que la resistencia a la insulina y la disfunción metabólica son los factores más importantes sugieren nombres como: Síndrome Metabólico Reproductivo (SMR)⁽⁹⁾, Síndrome XX⁽¹⁰⁾ o Síndrome Ovárico Cardiometabólico Prevalente.

El SOP es uno de los trastornos endocrinos más frecuentes en la mujer en edad reproductiva, la prevalencia de esta enfermedad es variable dependiendo de los criterios utilizados, se estima que entre un 5-20% son afectadas por esta entidad a nivel mundial.⁽³⁾ La clasificación propuesta por la Sociedad Europea de Reproducción y Embriología y la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva [European Society of Human Reproduction and Embryology/American Society of Reproductive Medicine (ESHRE/ASRM)], mejor conocida como la clasificación de Rotterdam, es la más extensamente utilizada y es actualmente la más apoyada por las sociedades científicas y autoridades sanitarias. Esta definición propone que el SOP puede ser diagnosticado en cualquier mujer que presente al menos dos de las siguientes características: Hiperandrogenismo clínico y/o bioquímico, disfunción ovulatoria y MOP.^(3, 5) En contraste en el 2006, el posicionamiento de la sociedad de exceso de andrógenos y SOP [Androgen Excess and PCOS Society (AE-PCOS)] se basa en la presencia de hiperandrogenismo, el cual debe estar acompañado por evidencia de disfunción ovárica en la forma de disfunción ovulatoria y/o MOP.⁽¹¹⁾ Un panel independiente realizó una revisión de la información hasta 2012, y recomendaron que los criterios de Rotterdam pueden ser adaptados según un fenotipo específico; el Fenotipo 1 el cual es la clásica combinación de los cambios endocrinos reproductivos del síndrome: hiperandrogenismo, oligo-anovulación y MOP; el Fenotipo 2 es la combinación de hiperandrogenismo y oligo-anovulación [Criterios esenciales del National Institutes of Health 1990 (NIH)]; el Fenotipo 3 es la combinación de hiperandrogenismo y MOP en ausencia de oligo-anovulación (SOP ovulatorio); el Fenotipo 4 es la combinación de oligo-anovulación y MOP (SOP no hiperandrogénico). Siendo el Fenotipo 4 el no aceptado por la AE-PCOS debido a la ausencia de una evidencia consistente sobre un posible riesgo metabólico en este grupo. A pesar de que la resistencia a la insulina y obesidad son comunes en el SOP, no son reconocidos como criterios diagnósticos.⁽⁵⁾ (*Ver Tabla 1*)

Tabla 1. Criterios diagnósticos para SOP en Adultos (ESHRE/ASRM)

El diagnóstico se tiene al cumplir dos de los siguientes tres criterios:

1. Hiperandrogenismo Clínico y/o Bioquímico
2. Oligo-anovulación
3. Morfología de Ovario Poliquístico

Además se pueden definir cuatro fenotipos:

1. Fenotipo 1 (SOP Clásico)

- a. Evidencia de Hiperandrogenismo Clínico y/o Bioquímico
- b. Evidencia de Oligo-anovulación
- c. Evidencia de Morfología de Ovario Poliquístico por Ultrasonido

2. Fenotipo 2 (SOP Anovulatorio)

- a. Evidencia de Hiperandrogenismo Clínico y/o Bioquímico
- b. Evidencia de Oligo-anovulación

3. Fenotipo 3 (SOP Ovulatorio)

- a. Evidencia de Hiperandrogenismo Clínico y/o Bioquímico
- b. Evidencia de Morfología de Ovario Poliquístico por Ultrasonido

4. Fenotipo 4 (SOP no hiperandrogénico)

- a. Evidencia de Oligo-anovulación
- b. Evidencia de Morfología de Ovario Poliquístico por Ultrasonido

Criterios diagnósticos de Rotterdam (ESHRE/ASRM) para SOP en adultos, así como los fenotipos propuestos en el último consenso en 2012.

4.2 RELACIÓN ENTRE SOP Y DM1

El razonamiento que puede ligar la DM1 con el SOP, es que los pacientes que viven con DM1 suelen requerir dosis altas de insulina exógena para lograr el control de su enfermedad, debido a que necesitan alcanzar las concentraciones de insulina a nivel de sistema porta hepático necesarias para suprimir la gluconeogénesis y glucogenólisis que se presenta como consecuencia de la deficiencia de insulina endógena, de tal manera que se ha considerado que los pacientes con DM1 presentan un hiperinsulinismo sistémico exógeno.^(1, 12) Aunque el SOP es reconocido como un trastorno de exceso de andrógenos, también está caracterizado por presentar obesidad visceral, intolerancia a los carbohidratos, resistencia

a insulina y dislipidemia, y puede ser considerado un desorden metabólico,⁽¹³⁾ en donde existe evidencia de que la hiperinsulinemia endógena compensatoria que aparece en este trastorno, incrementa la producción y secreción de andrógenos por los ovarios al actuar como cogonadotropina, mejorando la señalización de la Hormona Luteinizante (LH).⁽¹⁴⁾
¹⁵⁾(Ver Imagen 1)

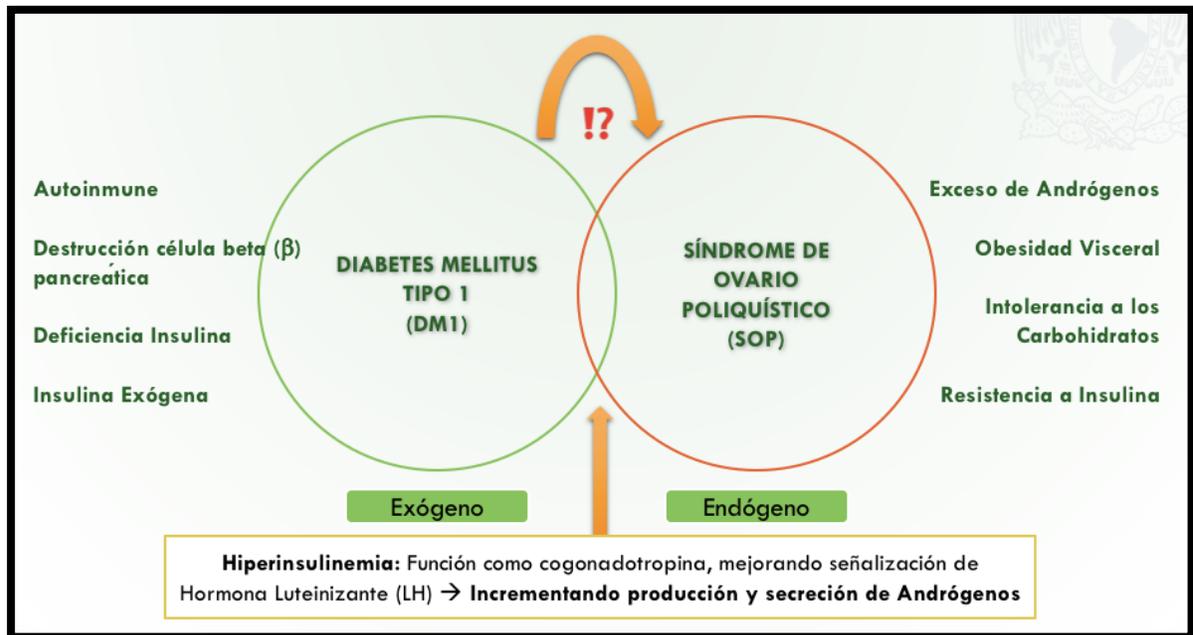


Imagen 1. Esquemización sobre la posible relación entre la DM1 y el SOP, dos enfermedades que son fenotípicamente diferentes, pero que presentan una posible conexión en el hiperinsulinismo, donde en la DM1 es exógeno como parte del tratamiento, y en el SOP endógeno.

En las últimas décadas, las mejoras en la terapia para la DM1 han llevado a una perspectiva cada vez más positiva para las personas que viven con esta afección. La mayor esperanza de vida, un tiempo prolongado sin complicaciones microvasculares y la mejora de la fertilidad son algunos de los factores que han experimentado una mejora significativa. Sin embargo, en algunas poblaciones las mujeres jóvenes y adolescentes que viven con DM1 experimentan un aumento de peso anormal, irregularidad menstrual y SOP, pero la relación entre estas anomalías no se ha aclarado del todo en mujeres que viven con DM1.⁽¹⁶⁾

Algunos autores como Thong y colaboradores,⁽¹⁷⁾ reportan una prevalencia de SOP en DM1 de 16.5%, con un riesgo aumentado de 2 veces de tener SOP por el simple hecho de vivir con DM1, independiente del índice de masa corporal (IMC), sin embargo, la obesidad confiere un riesgo de casi 4 veces mayor de padecer SOP en estos pacientes, lo cual es consistente con la asociación que existe entre la Obesidad y el SOP. La ganancia de peso, un potencial efecto secundario del tratamiento intensivo con insulina, puede contribuir a la irregularidad menstrual y el desarrollo de SOP en estos pacientes, especialmente durante la transición a la pubertad, cuando la resistencia a la insulina se incrementa de forma fisiológica.⁽¹⁸⁾

Escobar-Morreale y colaboradores documentaron en una revisión sistemática y meta-análisis en 2016⁽¹²⁾ una prevalencia de SOP en pacientes con DM1 de 24% de forma general (con una prevalencia muy variable según la población, desde un 7% a un 41%), utilizando los criterios de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE)/ Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM). *(Ver tabla 1)*

Algunas situaciones que deben considerarse, son conclusiones obtenidas de algunos estudios sobre algunos componentes del SOP, por ejemplo, Morariu y colaboradores,⁽¹⁹⁾ soportan la teoría de que el descontrol glucémico tiene relación con la presencia de irregularidades menstruales, esto porque reportaron diferencias no significativas en la regularidad menstrual (en cuanto a irregularidad menstrual y pubertad retrasada) entre las pacientes que viven con DM1 y controles, los cuales se reportaban con mayor frecuencia en estudios de mujeres que viven con DM1 previos a la publicación del Diabetes Control and Complications Trial (DCCT), en el cual como sabemos, se promueven las estrategias para mantener hemoglobina glucosilada (HbA_{1c}) <7% para la mayoría de los pacientes que viven con DM1.⁽²⁰⁾ Este mismo grupo demostró que en las mujeres que viven con DM1 y que tienen mayores dificultades para mantener su control, era donde se observaban con mayor frecuencia irregularidades menstruales, lo que concuerda con un estudio de 245 mujeres de 18-49 años donde mayores concentraciones de HbA_{1c} (10.5% vs 9.2%) se presentaron

en mujeres que referían oligomenorrea.⁽²¹⁾ Otro punto que no queda claro si puede afectarse en estos pacientes es la fertilidad, ya que si bien algunas series han encontrado pocos embarazos y recién nacidos vivos en mujeres con DM1,^(22, 23, 24) algunos estudios prospectivos han encontrado fracciones de ciclos ovulatorios similares en los pacientes con DM1 respecto a los controles.⁽²⁵⁾ Una gran desventaja con estos estudios que evaluaron ciclos ovulatorios y regularidad menstrual, es que se descartaron las mujeres con hiperandrogenismo o no se realizaba la cuantificación de andrógenos,⁽²⁶⁾ situación que pudiera explicar que el mayor índice de SOP en esta población puede interferir en la fertilidad de estas mujeres. Del mismo modo, Codner y colaboradores⁽²⁷⁾ reportaron que 75% de las mujeres con tratamiento intensivo con insulina (Más de 2 aplicaciones de insulina al día) tenían SOP o MOP, comparado con 33% de los pacientes con una terapia convencional (solo 2 inyecciones de insulina al día); por otra parte, no se ha demostrado un mayor requerimiento de insulina en mujeres con SOP y DM1.⁽²⁸⁾ Sin embargo, debido a los datos expuestos, es importante tomar en cuenta el control de la diabetes y la dosis de insulina, ya que podrían estar en relación con la presencia de algunos componentes que integran el diagnóstico de SOP.

Las citocinas son algunos de los biomarcadores que se han estudiado activamente en los últimos años, algunos patrones de incremento o disminución de las mismas correlacionan con estados inflamatorios específicos y algunas comorbilidades. La obesidad, enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2, DM1 y SOP parecen generar diferentes patrones en el perfil de citocinas, los cuales pueden ayudar a explicar la fisiopatología de estas enfermedades y funcionar como un factor pronóstico o control para intervenciones terapéuticas en un futuro.^(29, 30, 31)

4.3 CITOCINAS Y DM1.

En la mayoría de los casos, la DM1 representa una alteración inmunológica. Si bien no todos los pacientes presentan un cuadro francamente autoinmune, a menudo muestran características de una contribución inmunológica a la patogénesis de la enfermedad (ya sea,

autoanticuerpos o asociaciones genéticas con genes que controlan la respuesta inmunológica).^(32, 33)

Estudios genéticos e inmunopatológicos han implicado directamente las citocinas en la patogénesis y posiblemente con el desarrollo de las complicaciones en pacientes con DM1, al ser el mayor modulador de inflamación y jugar un papel crucial en controlar la velocidad de destrucción de la célula β pancreática.⁽³⁴⁾ Inicialmente, en estudios experimentales con modelos de Diabetes insulino dependiente, se demostró que la interleucina (IL) 1 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) juegan un rol principal en el inicio de este tipo de diabetes.⁽³⁵⁾ Posteriormente se ha puesto interés sobre todo en la investigación del perfil proinflamatorio desde el punto de vista de la diabetes *per se*, la autoinmunidad y los otros factores de riesgo, ya que una proporción importante de enfermedades cardiovasculares se asocian con inflamación y modulación de citocinas, algunos reportes refieren incremento de fibrinógeno, IL-6, proteína C reactiva (PCR), TNF- α comparado con personas que no viven con diabetes;^(36, 37) y en la población mexicana que vive con DM1 analizada por Ferrerira y colaboradores,⁽²⁹⁾ se observaron concentraciones de IL-8 y resistina mayores en pacientes con DM1 que cumplían con criterios para síndrome metabólico.

4.3.1 Citocinas con potencial pro-inflamatorio y DM1:

Las citocinas clásicas que promueven la respuesta inflamatoria incluyen la IL-1, IL-6, TNF- α y la familia de Interferones (IFN).⁽³⁴⁾ La IL-1 es el mediador prototipo de inmunidad innata, es conocido que la célula β de los islotes pancreáticos son más susceptibles a la apoptosis inducida por IL-1 que otros tipos celulares,^(38, 39, 40) sin embargo, los posibles efectos potenciales del bloqueo de esta citocina no han sido confirmados, solo se ha visto disminución de la inflamación sistémica y una mejoría de la sensibilidad a la insulina en pacientes sin función residual de la célula β pancreática.

La IL-6 es conocida por mediar el desarrollo y progresión de enfermedades autoinmunes, esta IL puede regular la migración y respuesta inflamatoria de los linfocitos T en los

pacientes con DM1, y mientras que diversos reportes han descrito una correlación entre producción local de IL-6 y la destrucción de la célula β pancreática en modelos de ratones diabéticos no obesos, los datos encontrados en IL-6 sérica han sido inconsistentes en pacientes con DM1.^(41, 42, 43) El TNF- α se asocia a una regulación positiva de moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) tipo 1 y de esta manera podría relacionarse con una apoptosis acelerada de las células β pancreáticas.⁽⁴⁴⁾ Se han encontrado efectos protectores con el bloqueo del TNF- α , sin embargo algunos resultados son inconsistentes debido a que en algunos reportes a pesar del bloqueo de esta citocina, no fue posible detener el desarrollo de DM1.⁽⁴⁵⁾

Qiao y colaboradores,⁽⁴⁶⁾ en un metanálisis para valorar cambios en el TNF- α en pacientes con diabetes tipo 1, donde incluyeron 23 artículos con 1631 casos de DM1 y 1429 controles, observaron incremento significativo del TNF- α en pacientes con DM1 comparado con los controles, además en el análisis por subgrupos debido a la gran heterogeneidad no observaron diferencias significativas por edad, duración de la enfermedad y etnia, demostrando que el TNF- α se encuentra significativamente elevado en los pacientes con DM1.

Además, se ha propuesto que las concentraciones de citocinas puede ser dinámico en el curso de enfermedad en la DM1, ya que las citocinas que tienen un rol etiológico han sido mayormente descritas, las citocinas en estadios más avanzados de la enfermedad son menos entendidas. Danielson y colaboradores,⁽⁴⁷⁾ demostraron una asociación entre las concentraciones de TNF- α mas altas en pacientes con 13-18 años de duración de la diabetes ($p=0.0004$) y con un mayor deterioro renal ($p=0.02$). (*Ver Imagen 2*)

4.4 CITOCINAS Y SOP.

Se ha documentado que los pacientes con SOP se encuentran bajo un estado inflamatorio crónico leve, incluyendo altas concentraciones de leucocitos y una alteración en las

citocinas proinflamatorias. Este estado inflamatorio crónico de bajo grado parece estar ligado con el desarrollo de disfunción ovárica y anormalidades metabólicas.⁽⁴⁸⁾

4.4.1 Citocinas con potencial proinflamatorio y SOP:

Evidencia reciente, sugiere que los efectos metabólicos crónicos asociados y complicaciones cardiovasculares en los pacientes con SOP pueden estar ligados a la presencia de un estado inflamatorio crónico leve. Las mujeres con SOP tienen concentraciones elevadas de Proteína C Reactiva (PCR) cuando se comparan con controles. Esto sugiere que la PCR, puede servir como marcador de un grado inflamatorio leve, el cual puede predecir un riesgo incrementado de enfermedad coronaria y cardiovascular en mujeres con SOP.⁽⁴⁹⁾ Algunas citocinas proinflamatorias se encuentran elevadas en pacientes con SOP, como IL-1, IL-6, IL-17, TNF- α , independientemente de factores agregados como obesidad y resistencia a la insulina, y algunas otras como TGF- β se incrementan en relación a la asociación con resistencia a la insulina o no.^(48, 50, 51)

En la relación entre SOP y las citocinas proinflamatorias, el TNF- α es de particular interés, ya que esta citocina ha mostrado impactar en diversos aspectos de la función ovárica, incluyendo crecimiento folicular, ovulación y regresión del cuerpo lúteo. Sin embargo, de igual manera los resultados son inconsistentes, en algunos estudios no se ha encontrado relación entre la citocina y las características morfológicas del ovario por ultrasonido.^(48, 52) Debido a evidencia previa, el TNF- α puede ser un mediador clave ligado a enfermedades cardiovasculares y diabetes en mujeres con SOP. Esta molécula ha sido propuesta para utilizarse como biomarcador de riesgo cardiovascular en las pacientes con SOP.⁽⁵³⁾ Existen 3 meta-análisis que buscaron la relación de esta citocina en las pacientes con SOP y pacientes control. El primero realizado por Escobar-Morreale y colaboradores en 2011,⁽⁵⁴⁾ que incluyó 9 estudios sin encontrar diferencia significativa ($p=0.561$) de las concentraciones de TNF- α , con solo una diferencia relativa de 5% en las medias de ambos grupos, sin embargo este estudio excluyó 11 estudios que incluían menos de 25 pacientes con SOP en cada estudio; el realizado por Toulis y colaboradores en 2011,⁽⁵⁵⁾ donde se

analizaron 13 estudios si mostro esta diferencia significativa de las concentraciones más elevadas de TNF- α en las mujeres con SOP respecto a los controles, similar a lo encontrado por Gao y colaboradores en 2016,⁽⁵³⁾ donde incluyeron 29 estudios y encontraron concentraciones de TNF- α más elevadas en mujeres con SOP respecto a controles ($p=0.004$), relacionandose sobre todo en los subgrupos con un indice HOMA-IR y concentración de Testosterona mayor.

La IL-6 es una citocina que del mismo modo ha sido estudiada en los pacientes con SOP, sin tener un papel claro de su relación en las anormalidades endocrinas como la hiperandrogenemia o alteraciones metabólicas observadas en estas mujeres.⁽⁵⁶⁾ Alissa y colaboradores⁽⁵⁶⁾ encontraron que la IL-6 se encuentra elevada de forma significativa tanto en mujeres con Obesidad y SOP, así como en mujeres con Obesidad sin SOP, correlacionando con concentraciones de PCR, sugiriendo la relación de esta citocina con la grasa visceral en las mujeres con SOP. Del mismo modo en el metanálisis de Escobar-Morreale y colaboradores en 2011,⁽⁵⁴⁾ se estudio del mismo modo la IL-6 incluyendo 10 estudios para su análisis y no encontrando de la misma manera diferencias significativas ($p=0.331$) de estas mujeres con SOP comparadas con controles. *(Ver Imagen 2)*

4.5 PROBLEMAS METABÓLICOS POSIBLEMENTE ASOCIADOS A SOP Y DM1.

Hasta un tercio de los pacientes adolescentes con SOP presenta SM, y cerca de la mitad de los pacientes adultos con SOP. Se ha reportado que entre uno y dos tercios de los pacientes con diagnóstico de SOP tienen un grado anormal de resistencia a la insulina; la prevalencia de obesidad es similar, con una variabilidad importante entre la población estudiada.^(57, 58, 59)

Del mismo modo, algunos factores que complican el diagnóstico de DM1, incluyen el creciente problema de obesidad (tanto en niños y adultos), así como la presencia de otras enfermedades como hipertensión, dislipidemia, o SM.⁽⁶⁰⁾ Esta condición llamada “doble diabetes” parece estar relacionada con el incremento en el desarrollo de complicaciones crónicas y enfermedades cardiovasculares en pacientes con DM1.⁽²⁹⁾

El hiperinsulinismo endógeno resultante de la resistencia a la insulina en los pacientes con SOP, es un factor extraovárico que participa en la disregulación de la esteroidogénesis y las comorbilidades que están más relacionadas a diabetes.⁽³⁾ En los pacientes con DM1 la dosis suprafisiológica de insulina requerida para el control glucémico, es considerada un hiperinsulinismo exógeno, sin tener una relación directa con resistencia a insulina, sin embargo en algunos casos es importante evaluar si también presenta resistencia a la insulina exógena mediante métodos precisos. El estándar de oro para cuantificar la resistencia a la insulina en los pacientes con DM1 es la tasa de eliminación de glucosa (TEG) derivado de una pinza euglucémica hiperinsulinémica (clamp euglucémico (CE)).⁽⁶¹⁾ La primera herramienta validada y más utilizada es la tasa de disposición de glucosa estimada (eDGE), la cual en valores menores correlaciona con mayor resistencia a insulina (RI). En la población Mexicana, un estudio por Ferreira y colaboradores encontraron que una eDGE <7.32mg/kg/min tiene un 80% de sensibilidad para el diagnóstico de SM en pacientes que viven con DM1.⁽¹⁸⁾

La fisiopatología del incremento del riesgo cardiovascular asociado con SM y DM1 es compleja y no completamente entendida. Un amplio rango de patologías cardíacas ha sido asociado con modulación de la inflamación y citocinas.^(29, 30, 31) (Ver Imagen 2)

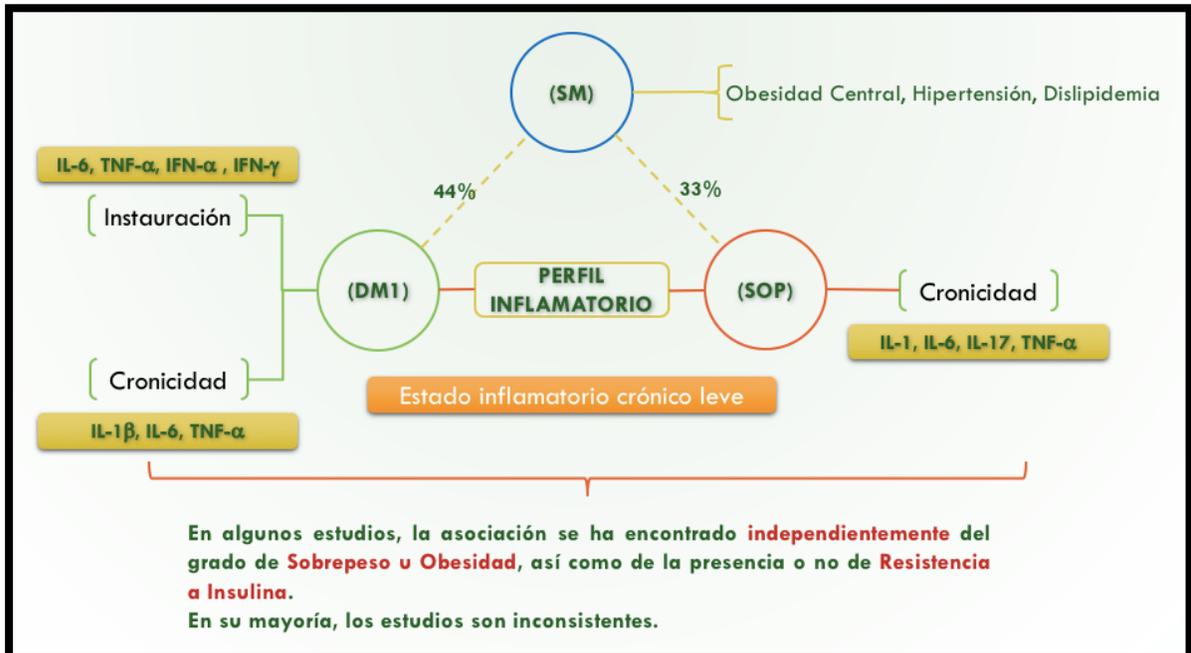


Imagen 2. Esquema que resume las principales citocinas descritas en los diferentes estudios ligadas tanto a DM1 y SOP, enfermedades que cursan con un estado inflamatorio crónico leve, así como la prevalencia descrita de componentes de síndrome metabólico en ambas patologías.

5. JUSTIFICACIÓN:

En México, no tenemos datos exactos sobre la prevalencia de DM1, en 2021 se publicaron los datos del registro nacional de pacientes con diabetes tipo 1 (RENACED), donde se reportaron los datos de 965 pacientes con DM1 en todo el país, con una media de edad de 21 años y un promedio de edad de diagnóstico a los 11 años.⁽⁶²⁾ En cuanto a SOP, solo existe un estudio de la prevalencia en población mexicana, refiriendo un 6% de prevalencia.⁽⁶³⁾

No existen estudios de prevalencia de SOP en pacientes con DM1 en la población Mexicana, y dada la alta prevalencia en nuestro país de comorbilidades asociadas al síndrome metabólico como sobrepeso y obesidad, hipertensión y dislipidemia, es importante valorar esta relación en nuestra población ya que podrían estar subdiagnosticados.

Existen diversos estudios que comparan algunas citocinas en pacientes con SOP y DM1 de forma independiente^(29, 30, 31, 36, 37, 45, 49, 51, 52, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70), sin embargo, no existen

estudios que valoren el perfil de citocinas en las pacientes con ambos diagnósticos, es importante la evaluación en este grupo de pacientes, en primer lugar por la mayor prevalencia reportada previamente en otras poblaciones de SOP en las mujeres con DM1, siendo hasta de un 41%, con un promedio de 24% según los criterios utilizados,⁽¹²⁾ del mismo modo y como se ha mencionado previamente se considera en ambas enfermedades que presentan un estado inflamatorio crónico leve, por lo que la asociación puede representar un estado inflamatorio aún mayor, lo que puede condicionar un mayor riesgo de complicaciones.

El generar un mayor conocimiento en estos pacientes ya susceptibles, puede favorecer la posibilidad de utilizar y desarrollar nuevos tratamientos en contra de moléculas (en este caso citocinas) como objetivos terapéuticos para prevención o evitar la progresión de complicaciones asociadas a estas enfermedades.

6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México, la incidencia de DM1 en menores de 19 años es 6.2/100,000 derechohabientes del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), la mayor institución de seguridad social en el país.⁽⁷¹⁾ Estos pacientes en su desarrollo pueden padecer enfermedades propias de la etapa reproductiva, entre ellas el SOP, la cual en algunas poblaciones parece tener una prevalencia mayor en este grupo de pacientes que viven con DM1,⁽¹²⁾ sin conocer datos de la prevalencia de esta enfermedad en nuestra población.

En general se considera, que una de cada 10 personas que viven con diabetes pertenece al diagnóstico de DM1, de entre los cuales más del 50% tendrán alguna complicación cardiovascular.⁽⁷²⁾ Probablemente asociada al desarrollo de otras enfermedades metabólicas concomitantes. En nuestra población según la ENSANUT 2018,⁽⁷³⁾ más del 40% de la población mexicana tiene por lo menos uno de los componentes clínicos y/o bioquímicos asociados a resistencia a la insulina, tales como sobrepeso, obesidad, hipertensión arterial sistémica, dislipidemia, etc. Específicamente en esta población la

prevalencia de SM en pacientes que viven con DM1 parece ser de un 44%.⁽⁷⁴⁾ Además de los factores de riesgo tradicionales para estas complicaciones, se ha considerado al SOP como un contribuyente de este riesgo, y debido a que tanto el SOP como la DM1 son estados inflamatorios crónicos con perfiles más o menos descritos, el estudio de asociación de algunas citocinas representa un punto clave para la posibilidad de incidir en la evolución de la enfermedad, ya que algunas citocinas (sobre todo TNF- α , IL-6 e IL-1) se han relacionado con el desarrollo de problemas asociados como resistencia a insulina,⁽⁷⁵⁾ sobrepeso y obesidad, y a la regulación de producción de factores de riesgo cardiovascular,^(76, 77) y se han relacionado directamente con el descontrol de la enfermedad (basado en HbA1C y colesterol HDL),⁽⁷⁸⁾ sería de gran utilidad el conocimiento del estado inflamatorio en la población que vive con DM1 y que cumple con criterios para SOP, una enfermedad que de igual forma cursa con un estado inflamatorio crónico leve.

En la Clínica de Diabetes tipo 1 del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, se atiende a aproximadamente 110 mujeres con diagnóstico de DM1, de las cuales aproximadamente 50-60% se encuentran en edad reproductiva, sin tener datos sobre la asociación con SOP ya que hasta el momento no han sido evaluadas por este diagnóstico, el cual sería de utilidad para el pronóstico reproductivo, metabólico y funcional.

Evaluar la producción de citocinas en las mujeres en las que se detecte la asociación de las enfermedades, puede ser una oportunidad de generar nueva información que permita incidir oportunamente y mejorar la prevención de complicaciones a largo plazo, así como en la posibilidad de mejorar los desenlaces reproductivos.

6.1 Pregunta de investigación:

En mujeres con diagnóstico de diabetes tipo 1 ¿Cuál es la diferencia entre las concentraciones séricas de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, TNF- α) cuando cumplen criterios para Síndrome de Ovario Poliquístico, comparándolas con las que no cumplen con estos criterios?

7. HIPÓTESIS:

Las mujeres con diagnóstico de Diabetes tipo 1 y cumplen con criterios para Síndrome de Ovario Poliquístico tienen mayores concentraciones de citocinas proinflamatorias (específicamente IL-1, IL-6, TNF- α) comparadas con las mujeres con diagnóstico de diabetes tipo 1 y no cumplen criterios para esta enfermedad.

8. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar las concentraciones de citocinas proinflamatorias (en específico IL-1, IL-6, TNF- α) en mujeres con diagnóstico de DM1 y que cumplieron criterios de SOP, y compararlas con las pacientes que no cumplieron criterios de SOP.

Objetivos Secundarios:

- - Determinar la frecuencia de SOP y sus diversos componentes en nuestra población evaluada de pacientes con DM1.
- - Determinar si existen diferencias significativas en cuanto a la concentración de citocinas proinflamatorias y la dosis de insulina utilizada, IMC, concentraciones de hemoglobina glucosilada (HbA1C) y/o tiempo de evolución de la DM1.

9. MATERIAL Y MÉTODOS:

9.1 Universo de trabajo:

- **Población diana:** Mujeres con diagnóstico de DM1.
- **Población accesible:** Mujeres derechohabientes, que acuden a control a la clínica de Diabetes tipo 1 en el Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda”, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.
- **Muestra:** Mujeres con diagnóstico de DM1 en edad reproductiva.
- **Tipo de muestreo:** No probabilístico por conveniencia de casos consecutivos.
- **Periodo de reclutamiento:** Del 01 de Julio de 2021 hasta el 30 de Mayo de 2022.

9.2 Criterios de Inclusión para la muestra:

Se incluyeron mujeres en edad reproductiva (entre 15-44 años)⁽⁷⁹⁾, mayores de 18 años, con diagnóstico de DM1, que aceptaron la invitación colaborar en el estudio y que estaban siendo atendidas en el Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda”, CMN Siglo XXI, IMSS.

9.3 Criterios de no inclusión:

No se incluyeron a mujeres con DM1 que presentaban condiciones inflamatorias agudas o crónicas, tratamientos que modifican el estado inflamatorio, y/o un estado de función reproductiva alterado por intervención quirúrgica [por ejemplo: infecciones agudas (urinarias, pulmonares, gastrointestinales, etc), embarazo, enfermedad renal crónica (ERC) estadio mayor a 3b, antecedente de complicaciones macrovasculares asociadas a DM1 (pie diabético, enfermedades coronarias, eventos vasculares cerebrales, etc.), uso de fármacos inmunosupresores, tabaquismo activo, enfermedades autoinmunes sistémicas con actividad (Lupus eritematoso generalizado, Artritis Reumatoide, Vasculitis, etc.), con antecedente de Histerectomía u Ooforectomía uni o bilateral], o que aquellas que fueron incapaces de entender el consentimiento informado.

9.4 Criterios de eliminación:

Se eliminaron aquellas mujeres con DM1 que al momento de la valoración eran usuarias de anticonceptivos hormonales, tenían diagnóstico de hipotiroidismo mal sustituido, alguna condición que descartará el diagnóstico de SOP como abordaje de amenorrea (como son la hiperplasia suprarrenal congénita, hipotiroidismo, hiperprolactinemia, falla ovárica, tumores productores de andrógenos).

9.5 Lugar donde se desarrollará el estudio:

La investigación se realizó en la Unidad de Investigación en Enfermedades Endocrinas del Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda”, Centro Médico Nacional Siglo XXI,

Instituto Mexicano del Seguro Social. Ubicada en: Calle Doctores 330, Colonia Doctores, Delegación Cuauhtémoc, CP 06720, CDMX. Tel. 55 5627 6900, Ext 21551.

10. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

10.1 Características del estudio:

- Tipo de Diseño: Transversal Analítico.
- Por el tipo de maniobra experimental por el investigador: Observacional.
- Por el número de mediciones: Transversal.
- Por la direccionalidad de la captura de información: Prolectivo.
- Por el número de centros: Monocéntrico.
- Por el número de grupos: Analítico.
- Por la naturaleza del estudio: Cuantitativo, descriptivo.

10.2 Descripción general del estudio:

Se solicitó la aprobación del estudio por el Comité Local de Investigación por parte de los investigadores del IMSS, debido a que incluye el apoyo de investigadores de otros centros hospitalarios, pero no con aporte de insumos, muestras o pacientes.

Una vez aprobado el estudio, se procedió a la identificación de la población de estudio, la cual esta integrada por mujeres mayores de edad y en etapa reproductiva (18-44 años) con diagnóstico de DM1 y que tienen su seguimiento en la clínica de Diabetes tipo 1 en el Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda”, CMN Siglo XXI, IMSS.

Durante la atención médica de seguimiento, en la cual se valora el control metabólico y el escrutinio de complicaciones crónicas, una atención habitual proporcionada por el personal médico adscrito a la clínica de diabetes tipo 1 (Dr. Mario Antonio Molina Ayala y Dr. Manuel Ramón García Sáenz), así como por los médicos residentes en formación, se identificaron las candidatas que cumplieran con los criterios de inclusión y no inclusión, y se les invitó a participar en el estudio. El consentimiento informado (Ver Anexo 1) se solicitó por el médico

que se encontraba brindando la atención médica habitual en ese momento, y todas las dudas fueron resueltas por el investigador principal que se encontraba en la misma unidad en ese momento.

Una vez que se firmó el consentimiento informado, se procedió a llenar la hoja de recolección de datos con los antecedentes médicos descritos, así como el llenado del menograma de por lo menos 3 ciclos menstruales previos. Posteriormente se realizó una exploración física que se realiza habitualmente en las mujeres con sospecha de SOP, la cual esta basada en una exploración física para valorar la presencia clínica de hirsutismo mediante la escala Ferriman-Gallwey, la cual se realizó con el consentimiento de la paciente, y fue realizada por 2 especialistas en el diagnóstico y tratamiento en enfermedades de la esfera endocrino-reproductiva (Dra. Nitzia López Juárez y Dr. Manuel Ramón García Sáenz).

La cuantificación de andrógenos (Testosterona total, 17-Hidroxiprogesterona, Dehidroepiandrosterona Sulfatada) se realizó en fase folicular temprana (idealmente entre el día 5-9 del ciclo menstrual), el resto de laboratorios solicitados habitualmente para el seguimiento se realizaron en la misma toma. Mediante el menograma se determinó el patrón de ciclicidad menstrual para realizar el cálculo de la próxima fecha esperada de menstruación e inicio del ciclo menstrual, explicando a la paciente la necesidad de que acudiera a la toma de laboratorios en dicha fase del ciclo menstrual. En el caso de que la paciente contara con ciclos irregulares con duración >45 días, se realizó una prueba de deprivación con progestina, administrando Medroxiprogesterona 10mg cada 24 horas por 10 días (una práctica habitual para inducir los ciclos menstruales en mujeres con amenorrea y comprobar estímulo estrogénico), y se les proporcionó la misma indicación tras iniciar con su sangrado menstrual. En caso de la paciente con Amenorrea (Ausencia de menstruación por >3 meses) se tomo una muestra al momento (para cuantificar prolactina y perfil tiroideo) y posteriormente se realizo el mismo procedimiento que para las pacientes con ausencia de ciclo menstrual por >45 días. La muestra se obtuvo en el laboratorio de la unidad, como se realiza de forma habitual, sin embargo se almaceno una alícuota de suero

para la cuantificación de las citocinas en la misma muestra (la cual no forma parte de la valoración habitual y no se realiza por parte del laboratorio de la unidad), dicha alícuota se trasladó en una hielera a la Unidad de Investigación en Enfermedades Endocrinas (la cual se encuentra dentro del mismo hospital) por el investigador principal (Dr. Manuel Ramón García Sáenz) y se colocó en un congelador de la unidad con la capacidad de mantener muestras a una temperatura de -70°C . Una vez que se juntaron todas las muestras, se procedió al procesamiento de la muestra para la cuantificación de citocinas, la cual se describe con detalle en la siguiente sección y se llevo a cabo por personal con experiencia en el procesamiento de estas muestras (Dra. Renata Saucedo y Dr. Jorge Valencia), mediante un inmunoensayo Milliplex Magpix que se encuentra disponible en la Unidad de Investigación en Enfermedades Endocrinas.

El ultrasonido pélvico se solicitó como se realiza de forma rutinaria al servicio de imagenología de la unidad hospitalaria, en fase folicular temprana, con el propósito de valorar la presencia de folículos antrales y preantrales, evitando la posibilidad de observar presencia de folículos dominantes que se puedan confundir con lesiones quísticas y dar una medición de volumen mayor de los ovarios. Debido a que el hospital no esta enfocado a valorar imagenológicamente padecimientos de la esfera reproductiva, ya que no somos un hospital que cuente con la especialidad de Ginecología, se solicitó la interpretación de las imágenes por un médico especialista en el área con experiencia en la realización e interpretación de estudios de imagen en esta población (Dr. Alberto Vielma Valdés).

Una vez que contamos con todos los datos bioquímicos y de imagen, se procedió a llenar el resto de la hoja de recolección de datos, y se clasificaron los grupos según si cumplían o no criterios del diagnóstico de SOP.

10.3 Procedimiento para la cuantificación de Citocinas.

La evaluación de las citocinas se realizó mediante un ensayo de detección multianálisis, utilizando el sistema Magpix, el cual es un método novedoso que funciona mediante el uso

de microesferas magnéticas que están recubiertas con un reactivo propio de un bioanálisis determinado, que permite la captura y detección de analitos específicos de una muestra. El siguiente procedimiento es el que se describe en la Tesis de Licenciatura, de la cual la Dra Renata Saucedo y el Dr Jorge Valencia fueron asesores.⁽⁸⁰⁾ La sonda de muestreo aspira la muestra y la transporta mediante el fluido de transmisión a la cámara fotográfica, donde un imán saca las microesferas a un portaobjetos, las inmoviliza y se toman imágenes. Dentro de la cámara, las microesferas se ven expuestas a un LED rojo y a uno verde, que excita tanto los tintes internos que identifica el color de cada microesfera y la fluorescencia informante de la superficie de las mismas (Figura 1). El LED rojo es responsable de clasificar las microesferas. El LED verde con el filtro R-Ficoeritrina produce la fluorescencia informante que identifica los analitos capturados durante el análisis. Después, las microesferas son transportadas al contenedor de desechos, con lo que se deja espacio para la siguiente muestra.

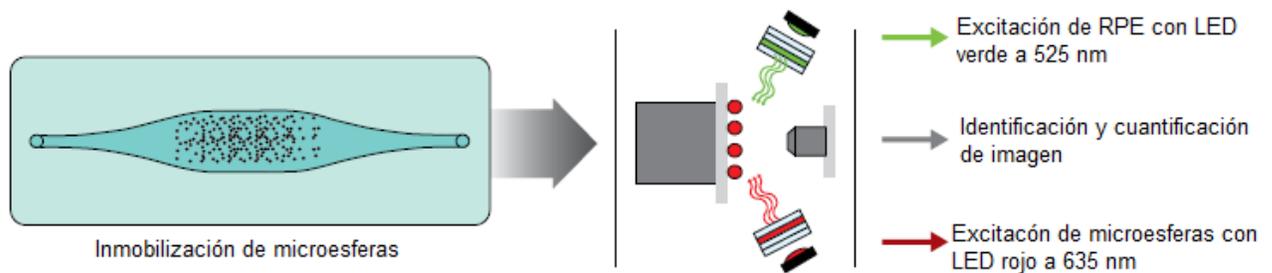


Figura 1. Mecanismo de identificación y cuantificación del analito de interés en el sistema MAGPIX.

El ensayo contiene microesferas de poliestireno las cuales se encuentran impregnadas de un anticuerpo específico que al estar presente el analito se unen de manera covalente formando el complejo Anticuerpo (Ac)-Antígeno (Ag). Después se adiciona un segundo Ac que se encuentra biotinilado al cual se une la estreptavidina con una proteína fluorescente formando un complejo Ac-Ag-Ac. La fluorescencia se lee a dos longitudes de onda, la primera a 633 nm para detectar el tipo de Ac y la segunda a 532 nm para determinar la cantidad de fluorescencia emitida por el complejo, el cual se interpola en una curva estándar para determinar la concentración del analito de interés (Figura 2).

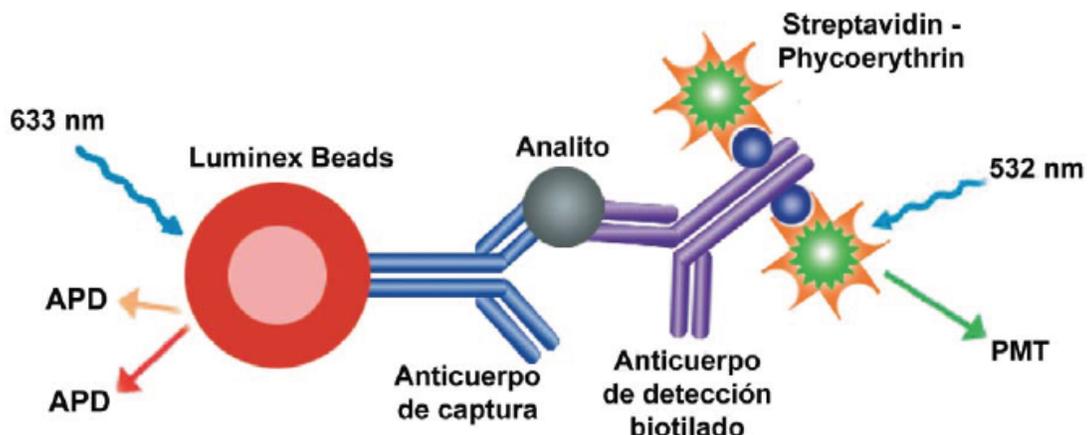


Figura 1. Complejo formado en el sistema MAGPIX.

Algunas aplicaciones que tiene la técnica de detección multianalito son: cuantificación de citocinas, análisis hormonal, factores de crecimiento, caracterización de reporteros, polimorfismo de nucleótido simples, caracterización de las interacciones moleculares de los receptores nucleares.

El kit que se utilizó para el equipo MAGPIX es un Human Inflammatory 5-Plex Panel (Life Technology, CA USA). La metodología utilizada en el ensayo de detección multianalito se realizó por expertos en el área con experiencia en el procesamiento de muestras mediante este sistema (Dra. Renata Saucedo y Dr. Jorge Valencia), realizando el procedimiento en una placa de 96 pozos (Figura 3), en donde:

1. Se adicionó a cada pozo 25 μL de microesferas recubiertas con el anticuerpo.
2. Para la preparación de los estándares se adicionaron 50 μL de buffer de incubación y 100 μL de los estándares a los primeros 8 pozos por duplicado. Para la preparación del suero se adicionaron 50 μL de buffer de incubación, 50 μL de ensayo diluyente y 50 μL de muestra, todas las muestras por duplicado.
3. Se incubó en agitación durante dos horas, posterior a está agitación se colocó sobre un magneto para decantar y se procedió a realizar dos lavados de 200 μL con solución de lavado.

4. Se preparó el detector del cuerpo biotilnado utilizando un tubo cónico donde se adicionó 100 μL de diluyente de biotina y 10 μL de anticuerpo biotilnado.
5. Se adicionaron a cada pozo 100 μL del detector del cuerpo biotilnado y se incubó con agitación durante una hora, posterior a está agitación se colocó sobre un magneto para decantar y se procedió a realizar dos lavados de 200 μL con solución de lavado.
6. Se prepararon la estreptavidina-RPE en un tubo cónico donde se adicionaron 100 μL de diluyente de RPE y 10 μL de estreptavidina-RPE.
7. Se adicionaron a cada pozo 100 μL de estreptavidina-RPE. Se incubaron en agitación durante treinta minutos, posterior a está agitación se colocaron sobre un magneto para decantar y se procedió a realizar tres lavados de 200 μL con solución de lavado.
8. Se adicionaron 125 μL de solución de lavo y se mantuvo en agitación durante un periodo de 2-3 minutos.
9. Por último se colocaron la placa dentro del equipo MAGPIX para obtener las concentraciones en la base de datos.

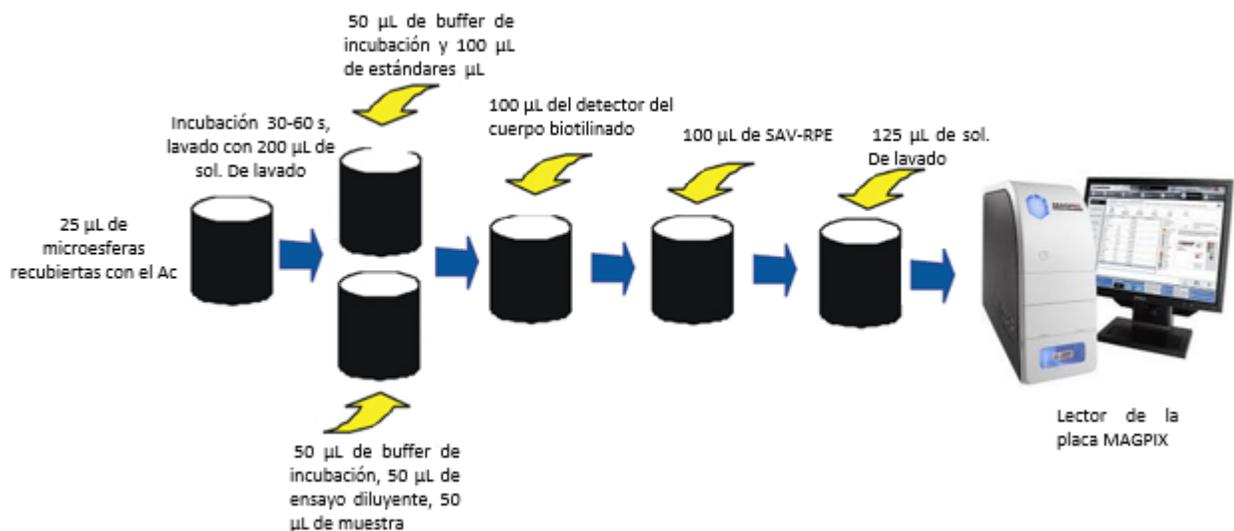


Figura 3. Procedimiento para la determinación de las interleucinas mediante el ensayo de detección multianálito.

10.4 Procesamiento de los datos.

La captura de datos se llevo a cabo mediante la Hoja de Captura de Datos (Anexo 2), y se realizaron en tres fases:

1. Durante la primer fase, en la cual se recolectó la información de los antecedentes basados en la historia clínica y el interrogatorio directo de la paciente, así como el llenado del menograma y la exploración física para valorar la presencia o no de hirsutismo clínico, esto se realizó durante la atención médica habitual de seguimiento. Donde además se le otorgaron indicaciones para la toma de laboratorios y estudios de imagen.
2. La segunda fase se realizó una vez que la paciente contaba con resultados de laboratorio y a imagenología, se llenaron lo correspondiente a los rubros bioquímicos (estudios metabólicos y hormonales) e imagenológicos (ultrasonido pélvico), en esta fase el clínico era capaz de concluir en si cumple criterios o no para SOP, pero se mantuvo el cegamiento a los investigadores asociados hasta que procesaron las citocinas.
3. En la tercera fase se realizó la recolección de las concentraciones de citocinas, una vez procesados por los investigadores expertos en el área, y se llevo a cabo la captura en una base de datos en SPSS para el posterior análisis estadístico.

11. DESCRIPCIÓN DE VARIABLES

11.1 Variables independientes:

<i>Variable</i>	Definición conceptual	Definición operacional	Unidad de medida	Tipo de Variable	Unidad categórica
<i>Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP)</i>	Síndrome producido por un trastorno de la función ovárica caracterizado por anovulación y ovarios grandes con numerosos folículos pequeños en la periferia. Clínicamente se asocia a oligomenorrea, hirsutismo y obesidad en grados variables. Endocrinológicamente se puede presentar con una elevación de la LH y de los andrógenos, y resistencia a insulina. ⁽⁸¹⁾	Se realizó basados en los criterios diagnósticos de Rotterdam, cumpliendo 2 de 3 criterios: Hiperandrogenemia Clínica o Bioquímica, Oligoanovulación y Morfología de Ovarios Poliquísticos.	Cumple con Criterios: Si No	Cualitativa Dicotómica	1: Si 2: No

11.2 Variables que integran la variable independiente:

<i>Variable</i>	Definición conceptual	Definición operacional	Unidad de medida	Tipo de Variable	Unidad categórica
-----------------	-----------------------	------------------------	------------------	------------------	-------------------

Morfología Ovario Poliquístico (MOP)	Presencia de 12 o más folículos en cada ovario que miden entre 2-9mm de diámetro y/o volumen ovárico aumentado (>10cm ³) evidenciado por ultrasonido. ⁽⁸²⁾	Se indicó de la revisión de imágenes del ultrasonido (pélvico), como la presencia de >12 folículos <10mm en un ovario, o el volumen de 1 ovario >10cm ³	MOP: Si No	Cualitativa dicotómica	1: Si 2: No
Hiperandrogenemia Bioquímica	La cuantificación de Testosterona libre es la medición que tiene mayor seguridad para detectar hiperandrogenismo bioquímico, sin embargo en un orden no específico se puede detectar por Testosterona Total (TT), dehidroepiandrosterona sulfatada (DHEA-S) y androstendiona (A4). ⁽⁸²⁾	No contamos con cuantificación de Testosterona libre ni A4, por lo que se tomó según el resultado de laboratorio de la cuantificación de TT por método de Quimioluminiscencia	ng/dL	Cuantitativa Continua	Hiperandrogenemia Bioquímica: 1: Si (TT > 45ng/mL) 2: No (TT < 45ng/mL)
Disfunción Ovulatoria (DO)	Ciclos menstruales irregulares (>35 o <21 días) que continúan por más de 2 años posterior a la menarca, o de <21 o >45 días entre el año 1-3 posterior a la menarca. ⁽⁸²⁾	Se tomó del menograma que se llenó en la consulta, de por lo menos 3 ciclos menstruales previos con una duración de >35 días.	OA: Si No	Cualitativa dicotómica	1: Si 2: No
Hirsutismo	Crecimiento excesivo de pelo terminal con un patrón androgénico en una mujer. Habitualmente se diagnostica por el puntaje de Ferriman-Gallwey, el cual se define en mujeres hispanas con un puntaje ≥ 9 . ⁽⁸³⁾	Puntaje adquirido tras la evaluación clínica de distribución del vello terminal con el puntaje Ferriman-Gallwey.	Puntaje del 9-44 puntos	Cualitativa ordinal	Ferriman-Gallwey: 1: <8 (No) 2: >9 (Si)

11.3 Variables dependientes:

<i>Variable</i>	Definición conceptual	Definición operacional	Unidad de medida	Tipo de Variable	Unidad categórica
-----------------	-----------------------	------------------------	------------------	------------------	-------------------

<i>Proteína C Reactiva (PCR)</i>	Reactante de fase aguda así denominado por su capacidad de precipitar el polisacárido C de los neumococos. ⁽⁸¹⁾	Resultado de laboratorio medido por Inmunoensayo.	mg/dL	Cuantitativa continua	Valor de Referencia: 0-0.5mg/dL.
<i>Interleucina 1</i>	Citocina producida por múltiples tipos celulares, entre los que se encuentran monocitos y macrófagos, y las células endoteliales. Se presenta en dos formas, denominadas IL-1 α e IL-1 β . La acción principal de la IL-1 es proinflamatoria y muy similar a la del TNF- α . ⁽⁸¹⁾	Resultado de laboratorio medido por Inmunoensayo ProcartaPlex.	pg/mL	Cuantitativa continua	--
<i>Interleucina 6</i>	Citocina producida por múltiples tipos celulares, entre los que se encuentran células mononucleares fagocíticas y células endoteliales. Efecto proinflamatorio. ⁽⁸¹⁾	Resultado de laboratorio medido por Inmunoensayo ProcartaPlex.	pg/mL	Cuantitativa continua	--
<i>Factor de Necrosis Tumoral Alfa</i>	Polipéptido de 157 aminoácidos producido, entre otros, por macrófagos y monocitos estimulados por endotoxina bacteriana. También conocida como caquectina, actúa como monoquina que participa en la inflamación. ⁽⁸¹⁾	Resultado de laboratorio medido por Inmunoensayo ProcartaPlex.	pg/mL	Cuantitativa continua	--

11.1 Variables potencialmente confusoras:

<i>Variable</i>	<i>Definición conceptual</i>	<i>Definición operacional</i>	<i>Unidad de medida</i>	<i>Tipo de Variable</i>	<i>Unidad categórica</i>
Resistencia a insulina	Estado caracterizado por una respuesta disminuida a la insulina endógena o exógena, que se manifiesta fundamentalmente con un descenso del transporte y metabolismo de la glucosa, estimulados por la insulina, en los adipocitos y la musculatura esquelética, por una supresión inadecuada de la lipólisis en los adipocitos, y con una supresión insuficiente de la producción hepática de glucosa. ⁽⁸¹⁾	Se utilizó el método de la tasa estimada de disposición de glucosa (eDGE), obtenida mediante la siguiente Fórmula: $24.31 - (12.2 * \text{Índice cintura/cadera}) - (3.29 * \text{Hipertensión (0=no 1=si)}) - (0.57 * \text{HbA1C})$.	mg/kg/min	Cuantitativa continua	Basados en un estudio previo de nuestra población se dicotomizo: Si (eDGE <7.2) No (eDGE >7.2)
Tiempo evolución Diabetes 1	Sucesión de etapas por las que atraviesa una enfermedad. ⁽⁸¹⁾	Se tomó del interrogatorio directo en la consulta a la paciente	Años	Cuantitativa discreta	Años de evolución de diabetes: 1: <5 años 2: >5 años
Índice de Masa Corporal (IMC)	Índice que valora el estado nutricional y que resulta de dividir el peso corporal, expresado en kilogramos, entre el cuadrado de la talla, expresada en metros. El intervalo normal oscila entre 18.5 y 25. ⁽⁸¹⁾	Resultado obtenido del Cociente entre el peso en kilogramos y la talla en metros al cuadrado.	Kg/m ²	Cuantitativa ordinal	Índice de masa corporal: 1: 18-24.9 Kg/m ² 2: 25-29.9 Kg/m ² 3: 30-34.9 Kg/m ² 4: 35-39.9 Kg/m ² 5: > 40 Kg/m ²
Hemoglobina Glucosilada	Fracción de la hemoglobina sujeta a glucosilación por vía no enzimática que, en condiciones normales representa menos del 6%. ⁽⁸¹⁾	Resultado de muestra de laboratorio procesado mediante inmunoensayo.	%	Cuantitativa continua	--
Unidades de Insulina	Preparación farmacéutica de insulina humana	Dosis total de insulina diaria exógena	UI/Kg/día	Cuantitativa ordinal	--

recombinante, bovina o porcina o de sus análogos. De efecto regulador del metabolismo de los hidratos de carbono, proteínas y lípidos, está indicada para el tratamiento de la diabetes mellitus dependiente de insulina y de la cetoacidosis diabética. ⁽⁸¹⁾	administrada en forma de insulinas humanas o análogos de insulina, dividida entre el peso corporal expresado en kilogramos.			
--	---	--	--	--

12. ASPECTOS ESTADÍSTICOS

12.1 Análisis descriptivo.

Inicialmente se realizó una revisión general de los datos obtenidos de la base de datos creada con el software SPSS versión 25. La base de datos se ordenó y se buscaron intencionadamente errores de captura (como errores no plausibles, perdidos o no ingresados), realizando limpieza de la base de datos por el investigador principal y el tutor. Posteriormente se analizó la distribución de las variables descriptivas capturadas en la base de datos, de primera instancia de la población total estudiada y posteriormente se dividida en dos grupos según la presencia de la variable de interés (con criterio de SOP y sin criterios de SOP) y se realizó una descripción de las mismas variables en cada grupo, utilizando frecuencias, medias y desviaciones estándar o medianas y rangos intercuartílicos, de acuerdo con el tipo de distribución y al tipo de variable.

12.2 Análisis inferencial.

Se realizó un análisis bivariado en donde se determinó si existe una diferencia de medias o medianas de las variables aleatorias continuas entre los dos grupos con prueba t student para muestras no relacionadas o con la prueba U de Mann-Whitney (según el tipo de distribución de los datos), y con la prueba de Chi cuadrada o prueba de Fischer se realizó la comparación de las diferentes proporciones entre los dos grupos. Se intentó determinar la fuerza de asociación entre los valores de la determinación de las citocinas proinflamatorias

en las mujeres con diagnóstico de SOP, con las concentraciones de andrógenos (testosterona total y DHEA-S), fenotipo de SOP, sin embargo ya que no tuvo diferencias significativas entre los grupos integrados, los resultados no fueron plasmados. Se realizó una regresión logística para valorar la correlación de las variables en relación a los componentes del diagnóstico de SOP con un ajuste por modelo multivariado ingresando las variables confusoras como son HbA1C, IMC, Dosis diaria de insulina y tiempo de diagnóstico de Diabetes tipo 1. Del mismo modo se repitió el proceso para las citocinas proinflamatorias pero dividiendo los grupos en relación ahora a variables metabólicas como RI según eGDR, Obesidad y SM.

13. TAMAÑO DE LA MUESTRA

Debido a que básicamente el propósito del estudio es la descripción de la muestra de pacientes que cumplen criterios de SOP en mujeres con DM1, y al no tener datos de concentraciones de citocinas en pacientes con ambos diagnósticos, decidimos realizar el cálculo de muestra basados en la fórmula de una sola proporción, tomando como referencia el porcentaje de SOP en DM1 representado por el meta-análisis de Escobar-Morreale con una prevalencia de 24%,⁽¹²⁾ utilizando la fórmula de cálculo de la muestra para una proporción:

$$n = \frac{Z_{\alpha} \times p_0 \times q_0}{d^2}$$

$Z_{\alpha} = 3.8416, |\alpha=5\%$
 $p_0 = 0.24, |p=24\%$
 $q_0 = 0.76,$
 $\delta^2 = (0.08)^2, |\delta=8\%$

Número de muestra: 109 pacientes.

De igual manera, al no tener información de la concentración de citocinas en un grupo de pacientes con diagnóstico de Diabetes tipo 1 que cumplen o no criterios para SOP, se realizó mediante la herramienta epitools (<https://epitools.ausvet.com.au/twomeanstwo>), un

cálculo de diferencia de medias de concentraciones de citocinas (IL-1 β , IL-6 y TNF) tomando como referencia lo reportado Alexandraki, et al, realizado en DM1 respecto a controles⁽⁸⁴⁾:

IL-1 β (Diabetes 1 Vs Sanos):

Media población 1: 0.326pg/mL, Media población 2: 0.320pg/mL, Varianza 1: 0.000169, Varianza 2: 0.000121, Nivel confianza 0.95, Potencia 0.8, Relación muestra: 1, Prueba de cola: 1 cola.

Total Muestra: 100

TNF- α (Diabetes 1 Vs Sanos):

Media población 1: 0.526pg/mL, Media población 2: 0.665pg/mL, Varianza 1: 0.002809, Varianza 2: 0.003721, Nivel confianza 0.95, Potencia 0.8, Relación muestra: 1, Prueba de cola: 1 cola.

Total Muestra: 6

IL-6 (Diabetes 1 Vs Sanos):

Media población 1: 0.326pg/mL, Media población 2: 0.320pg/mL, Varianza 1: 0.000169, Varianza 2: 0.000121, Nivel confianza 0.95, Potencia 0.8, Relación muestra: 1, Prueba de cola: 1 cola.

Total Muestra: 14

Ante los cálculos, el mayor número de muestra lo representa el valor para una sola proporción, por lo que se realizó una corrección para población finita, debido a que de nuestra población total de pacientes con DM1 en seguimiento en nuestro hospital, solo alrededor del 60% se encuentra en edad reproductiva.

De tal forma que sustituyendo en la fórmula, obtenemos un cálculo de tamaño de muestra de 109 pacientes, asumiendo un 60% de mujeres con DM1 en edad reproductiva, se realiza la corrección por población finita:

$$n_a = \frac{n}{1 + n/N}$$

n_a = número ajustado
 n = 65
 N = 109

El número ajustado por población finita, estimando un total de 65 pacientes aproximadamente en edad reproductiva, es de 40 pacientes.

14. Aspectos éticos

14.1 Apego a las normas éticas:

El presente protocolo se realizó en estricto apego a las normas éticas nacionales e internaciones de investigación en salud como son el Código de Nuremberg, la Declaración de Helsinki de 1975 y sus enmiendas, al informe Belmont, a la Ley General de Salud (LGS), al Reglamento de la LGS en materia de investigación para la salud, y a la Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012, que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos así como a los códigos y normas internacionales vigentes para las buenas prácticas en la investigación clínica.

El desarrollo del presente protocolo se realizó siempre salvaguardando el respeto a las personas, la justicia, la beneficencia, la no maleficencia, la autonomía de cada uno de los sujetos que decidan participar en el estudio. Asimismo, los investigadores involucrados en la realización del presente trabajo declaramos que no existe conflicto de intereses que ponga en riesgo a los sujetos que participaron en el desarrollo del proyecto de investigación. El presente estudio utilizó muestras biológicas (sangre) provenientes de mujeres con diagnóstico de DM1. Todas las pacientes tenían seguimiento en el Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda”, CMN Siglo XXI, IMSS. En todos los casos las muestras fueron reclutadas con estricto apego a las normas éticas vigentes y con la aceptación de los sujetos a participar en el estudio manifestada mediante un consentimiento informado.

14.2 Riesgo del estudio:

De acuerdo con el artículo 17 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación, el riesgo de este proyecto se catalogó como mínimo. Se trata de un estudio que emplea procedimientos comunes en exámenes de diagnóstico rutinarios y exploración clínica, que, en este caso particular, son la toma de muestra de sangre y realización de ultrasonido pélvico.

14.3 Consentimiento informado:

Todas las mujeres incluidas en el protocolo manifestaron su voluntad de participar en el estudio mediante la firma de aceptación plasmada en una carta de consentimiento informado (Anexo 1), el cual representa exactamente el documento que fue entregado y solicitado a cada una de las participantes por el personal médico que en ese momento se encontraba proporcionando su atención médica habitual (Médicos de base adscritos a la clínica o médicos residentes en formación). En dicha carta, se empleo un lenguaje sencillo y accesible para las participantes, poniendo de manifiesto su libre decisión de participar o permanecer en el estudio sin que esto afecte o demerite la atención que reciben en el IMSS.

14.4 Contribuciones y beneficios del estudio para los participantes:

La participación de las mujeres en este estudio no generó ningún beneficio económico para las participantes y como la intención del protocolo es conocer si existen diferencias entre las concentraciones de citocinas proinflamatorias en las pacientes con diagnóstico de DM1 y SOP con respecto a las pacientes con DM1 solamente, no tuvo una utilidad inmediata para el diagnóstico o manejo médico de la paciente. Sin embargo, se manifestó que la participación en el estudio será de gran utilidad en el avance del conocimiento científico y contribuir de esta manera a que en mediano o largo plazo se puedan utilizar como métodos de predicción para establecer mejores planes en el manejo médico y sobre todo posibles posturas para la prevención de riesgos cardiovasculares en este tipo de pacientes.

14.5 Balance riesgo/beneficio.

Es importante señalar que la obtención de las muestras para este estudio no representa riesgo alguno a su salud, ya que las tomas de muestra de sangre son procedimientos que se hacen rutinariamente para apoyar el diagnóstico o la toma de decisiones en el manejo de los pacientes con diagnóstico de DM1. El beneficio de participar en este estudio no será individual ni de inmediato, sino que será importante ya que podrá contribuir al conocimiento sobre el estado proinflamatorio en las pacientes con DM1 que cumplen con criterios de SOP, conocer la frecuencia de este problema en nuestra población de pacientes, y de esta manera posteriormente poder establecer posibles blancos terapéuticos o propuestas de manejos preventivos en esta población.

14.6 Confidencialidad.

Los datos de las mujeres que acepten participar en el estudio serán mantenidos en total confidencialidad. A cada participante se le asignó un folio único y específico con el cual fue identificada cada muestra. Los datos completos sólo fueron accesibles al investigador responsable del protocolo, quien tiene la obligación de no revelar la identidad de los participantes.

14.7 Obtención del consentimiento informado.

La carta de consentimiento informado de todas las mujeres con diagnóstico de DM1 como ya se mencionó fue entregado por el personal médico que en ese momento se encontraba proporcionando su atención médica habitual (Médicos de base adscritos a la clínica o médicos residentes en formación). El documento se obtuvo antes de la toma de muestra de sangre y exploración clínica en la que los médicos explicaron los objetivos del protocolo a cada uno de los posibles participantes.

14.8 Selección de participantes.

Las participantes fueron identificadas en Consulta Externa de la clínica de Diabetes tipo 1 en el Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda”, CMN Siglo XXI, IMSS. Las

potenciales participantes en el estudio fueron identificadas por el personal médico que proporcionaba su atención médica habitual (Médicos de base adscritos a la clínica o médicos residentes en formación). Las pacientes se reclutaron por los médicos tratantes y los miembros del grupo de investigación, previa aceptación y firma del consentimiento informado. En todos los casos la selección de las pacientes fue imparcial, sin sesgo social, racial, preferencia sexual y cultural, respetando en todo momento la libertad y confidencialidad de las participantes.

14.9 Beneficios al final del estudio.

Los beneficios de este estudio tienen un carácter estrictamente científico y en ningún momento se persiguen beneficios lucrativos para ninguno de los participantes.

15. RECURSOS, FINANCIAMIENTO Y FACTIBILIDAD:

15.1 Recursos humanos.

El alumno de Maestría (Manuel Ramón García Sáenz), la Tutora Dra. Claudia Ramírez Rentería quien es el Investigador Titular, y el investigador asociado Dr. Aldo Ferreira Hermosillo trabajaron en la realización del protocolo para lo cual se utilizaron los instrumentos disponibles en la unidad de investigación.

La Dra. Nitzia Juárez quien tiene experiencia en tratamiento de padecimientos en endocrinología reproductiva apoyó con la exploración clínica de tal manera que la evaluación de la presencia de Hirsutismo o no fuera más confiable.

El Dr. Alberto Vielma, especialista en ginecología, con experiencia en el área de biología reproductiva, apoyó en la interpretación de las imágenes de ultrasonido pélvico, para de esta manera limitar el posible sesgo ante la posible falta de experiencia del personal adscrito a la unidad por el bajo volumen de este tipo de estudios solicitado al no contar con la especialidad de Ginecología en el hospital.

Los Dres Renata Saucedo y Jorge Valencia, con capacitación y experiencia sobre el uso del sistema multianalito fueron los encargados del procesamiento de las muestras para la cuantificación de las citocinas proinflamatorias.

15.2 Recursos físicos y materiales.

La Unidad de Investigación en Enfermedades Endocrinas está ubicada en el 1er piso del Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda”, CMN Siglo XXI, IMSS, cuenta con el sistema Magpix para la cuantificación multianalito, así como personal capacitado para el uso del mismo. Se cuenta con el congelador apropiado para la conservación de las muestras.

15.3 Recursos financieros.

Se participó en la Convocatoria para apoyo financiero a proyectos de investigación de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología (SMNE), obteniendo una respuesta favorable, por lo que el financiamiento completo del proyecto se cubrió por parte de la SMNE.

15.4 Factibilidad.

El grupo cuenta con la experiencia en todos los aspectos de esta propuesta y en la unidad participante se completó la población para realizar el estudio, siendo apenas suficiente para llevarse a cabo el proyecto en el tiempo estipulado.

16. ASPECTOS DE BIOSEGURIDAD.

Este estudio implica la manipulación de muestras biológicas (sangre) las cuales fueron transportadas para su almacenaje al Laboratorio de UIEE del Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda”, CMN Siglo XXI, IMSS, el cual se encuentra en el mismo edificio donde se brinda la atención médica y acuden los pacientes a su seguimiento, con solo un piso de diferencia, en este lugar fueron etiquetados y almacenados en congeladores especializados. El equipo de investigación tiene conocimiento y cumplieron con el reglamento de la Ley General de Salud en el Título Cuarto Capítulo 1, Artículos 78,79 y 83, así como La Ley General de Salud en Materia de la Investigación para la Salud en el Título Segundo “De los aspectos éticos de la investigación en seres humanos” y Capitulo Primero, Artículos 13, 14.

El laboratorio involucrado en el proyecto cuenta con manuales de procedimientos para el manejo y control de los residuos peligrosos biológicos infecciosos. En el Instituto Mexicano del Seguro Social, el personal del Laboratorio de la UIEE tiene conocimiento de las actividades que se desarrollaron para la identificación, clasificación, recolección tratamiento en sitio y transporte interno hasta el área de almacén temporal de residuos peligrosos biológico-infecciosos de acuerdo con la NOM-087-ECOL-SSA1-2002, la NOM-052-SEMARNAT-2005 y a la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002.

La toma de muestra de sangre no se realizaron por los investigadores sino que fueron tomadas en laboratorio como parte del procedimiento habitual, y solamente se transportó una alícuota de suero recuperada posterior a la centrifugación en el laboratorio de la unidad, hacia la UIEE, que se encuentra a menos de 50 metros de distancia.

El investigador responsable manifestó que las instalaciones y equipo de los laboratorios se encuentran en un estado adecuado de operación de las actividades involucradas en el proyecto y que las instalaciones y equipos reciben mantenimiento preventivo y correctivo para garantizar su adecuado funcionamiento.

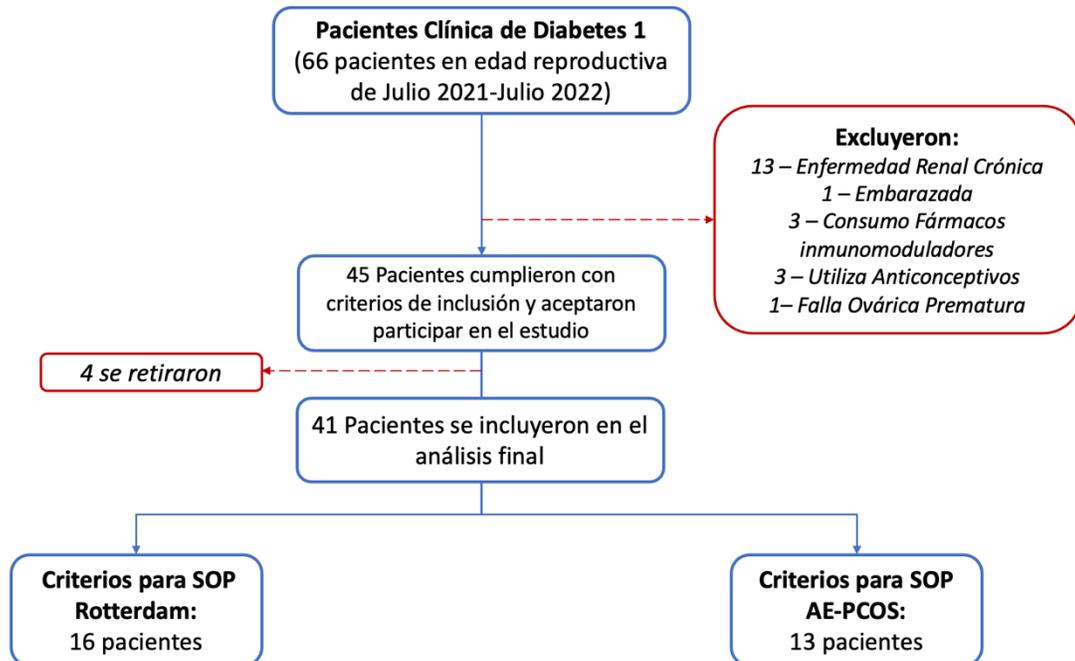
17. CRONOGRAMA TENTATIVO DE ACTIVIDADES.

2021	FEB 2021	MAR 2021	ABR 2021	MAY 2021	JUN 2021	JUL 2021	AGO 2021	SEP 2021	OCT 2021	NOV 2021	DIC 2021	ENE 2022
Elaboración de Protocolo de Tesis	X	X	X	X								
Envío y autorización por CNIC				X	X							
Reclutamiento de pacientes					X	X	X	X	X	X	X	X

2022	FEB 2022	MAR 2022	ABR 2022	MAY 2022	JUN 2022	JUL 2022	AGO 2022	SEP 2022	OCT 2022	NOV 2022	DIC 2022	ENE 2023
Reclutamiento de pacientes	X	X	X									
Procesamiento de muestras				X	X							
Estructuración de resultados						X	X	X	X			
Publicación de resultados										X	X	X

18. RESULTADOS

Se invitaron un total de 66 mujeres en edad reproductiva que acudieron a la consulta de la clínica de Diabetes tipo 1 del Hospital de Especialidades “Dr. Bernardo Sepúlveda” CMN Siglo XXI, de las cuales 45 cumplieron con criterios de inclusión y decidieron participar en el estudio, sin embargo posterior al inicio 4 pacientes se retiraron del estudio y no se incluyeron en el análisis final. El resto de las pacientes se excluyeron por presentar enfermedad renal crónica en estadio 4 o 5, consumo de fármacos inmunomoduladores, embarazo, falla ovárica prematura, o eran usuarias de algún método anticonceptivo que interfiere con la evaluación hormonal.



Tres de las pacientes tuvieron una 17-OHP >2ng/mL en fase folicular, por lo que se les realizó una prueba de estimulación con Cosintropina 250µg para descartar Hiperplasia Suprarrenal Congénita.

Un total de 41 pacientes concluyeron las evaluaciones y se incluyeron en el análisis final.

Las características generales de la población se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Características basales de la población

	<i>Población total (n=41)</i>
Edad	30 (RIC 25.5-39) años
Edad de diagnóstico de Diabetes	13 (RIC 10-19) años
Dosis de insulina	0.84 (\pm 0.34) UI/Kg/día
Hemoglobina glucosilada	8.66 (\pm 1.91) %
Glucosa basal	143.7 (\pm 65.42) mg/dL
Colesterol Total	175.65 (\pm 33.96) mg/dL
Colesterol LDL	96.80 (\pm 26.90) mg/dL
Colesterol HDL	52.68 (\pm 12.26) mg/dL
Triglicéridos	121 (RIC 73.5-159.5) mg/dL
Índice de Masa Corporal	25.98 (\pm 3.99) kg/m ²
Circunferencia de Cintura	82.98 (\pm 9.25) cm
Circunferencia de Cadera	97.96 (\pm 7.03) cm
Ferriman Gallwey	7.88 (\pm 2.90) pts
Hormona Folículo Estimulante	4.98 (RIC 4.35-6.59) mUI/mL
Hormona Luteinizante	7.37 (\pm 4.29) mUI/mL
Estradiol	50.61 (RIC 38.05-99.37) pg/mL
Prolactina	18.1 (\pm 7.95) ng/mL
Testosterona Total	31.48 (\pm 14.76) ng/dL
17-Alfa Hidroxiprogesterona	0.51 (RIC 0.26-1.26) ng/mL
Dehidroepiandrosterona Sulfatada	184.49 (\pm 107.03) μ g/dL
Volumen Ovario Izquierdo	8.9 (RIC 6.89-11.2) cm ³
Volumen Ovario Derecho	8.36 (RIC 5.65-11.76) cm ³

18.1 Frecuencia de los componentes de Síndrome de Ovario Poliquístico en pacientes que viven con Diabetes tipo 1.

Según la definición de los componentes de SOP, se analizaron los datos de las 41 mujeres con diagnóstico de Diabetes tipo 1 y que completaron la evaluación, los principales componentes presentes fueron la MOP con un 87.5%, seguido del hirsutismo (por un Ferriman-Gallwey > 9 puntos adaptado para población latina)⁽⁸³⁾ con un 62.5%, con una

menor frecuencia de OA e Hiperandrogenemia con un 56.3% y 37.5% respectivamente. Se utilizaron los criterios de Rotterdam para definir el diagnóstico de SOP y posteriormente formar los dos grupos, el cual cumplieron el 39% de la población, siendo el Fenotipo 3 (Ovulatorio) el más frecuente con un 17.1%, seguido del Fenotipo 1 (Clásico) con un 9.8%. El Fenotipo 4 (no hiperandrogenico) se presento en una frecuencia de 7.3%. Utilizando otros criterios más estrictos como el AE-PCOS se observo una frecuencia de 31.7%, y según los criterios de NIH un 14.6%.

Utilizamos los criterios de Rotterdam para definir el diagnóstico de SOP y dividir los grupos, el cual se basa en la presencia de dos de los tres componentes, en la tabla 1 se resumen los componentes presentes en cada grupo.

Tabla 2. Criterios diagnósticos

	<i>DM1 sin SOP</i> (n=25)	<i>DM1 con SOP</i> (n=16)	<i>p</i>
Oligomenorrea	3 (12%)	9 (56.3%)	0.004**
Hiperandrogenismo Clínico	7 (28%)	10 (62.5%)	0.029*
Hiperandrogenemia	2 (8.0%)	6 (37.5%)	0.040**
Morfología de Poliquistosis ovárica	10 (40%)	14 (87.5%)	0.003*

Pruebas estadísticas utilizadas: * χ^2 , **Exacta de Fisher.

18.2 Comparación de las variables clínicas y control metabólico entre las mujeres con DM1 con y sin SOP.

Dentro del análisis de las variables clínicas una vez que se formaron los grupos, estrictamente una variable tuvo diferencia significativa entre ambos grupos, que fue la dosis de insulina diaria [1.04 (\pm 0.33) UI/kg/día Vs 0.71 (\pm 0.29) UI/kg/día, $p = 0.011$, en el grupo de las mujeres con DM1 que cumplieron criterios para SOP y que no cumplieron respectivamente]. La glucosa basal mostró una diferencia significativa entre los grupos ($p = 0.029$), siendo mayor en el grupo sin SOP, sin embargo la HbA1C que nos habla de un control crónico, no tuvo diferencias significativas.

El resto de las variables clínicas, como fueron medidas antropométricas, no tuvieron diferencias significativas entre ambos grupos, así como las variables bioquímicas referidas al control de la DM1. (Ver tabla 3)

La presencia de síndrome metabólico en esta población fue de 31.7%, y un bajo porcentaje de estas pacientes presentó Obesidad con 12.2%. Dentro del grupo de pacientes con SOP y DM1 solo el 18.8% cumplió criterios para SM, comparado con el grupo DM1 donde el 40% cumplió con criterios ($p = 0.187$), en el caso de Obesidad se presentó solo en el 12.5% del grupo de SOP y DM1, sobrepeso en el 37.5%, pero sin diferencia significativa respecto al otro grupo sin SOP ($p = 0.992$).

Tabla 3. Características clínicas y bioquímicas generales en ambos grupos

	DM1 sin SOP (n=25)	DM1 con SOP (n=16)	p
Edad	30 (RIC 28-40) años	27 (RIC 24-38.5) años	0.372
Edad de diagnóstico de Diabetes	13.5 (RIC 9-18.5) años	12 (RIC 10-20) años	0.824
Dosis de insulina	0.71 (\pm 0.29) UI/Kg/día	1.04 (\pm 0.33) UI/Kg/día	0.003*
Hemoglobina glucosilada	8.49 (\pm 1.4) %	8.92 (\pm 2.54) %	0.487
Glucosa basal	161.16 (\pm 63.9) mg/dL	116.4 (\pm 59.79) mg/dL	0.029*
Colesterol Total	177.8 (\pm 34.39) mg/dL	172.29 (\pm 34.1) mg/dL	0.618
Colesterol LDL	95.52 (\pm 26.79) mg/dL	96.38 (\pm 28.83) mg/dL	0.922
Colesterol HDL	53.95 (\pm 12.74) mg/dL	50.69 (\pm 11.58) mg/dL	0.413
Triglicéridos	105 (RIC 71.5-177.5) mg/dL	122 (RIC 77.25-159) mg/dL	0.824
Índice de Masa Corporal	26.06 (\pm 4.29) kg/m ²	25.87 (\pm 3.6) kg/m ²	0.890
Circunferencia de Cintura	82.17 (\pm 8.6) cm	84.24 (\pm 10.34) cm	0.492
Circunferencia de Cadera	97.18 (\pm 6.41) cm	99.18 (\pm 7.97) cm	0.380

Pruebas estadísticas utilizadas: *T-Student.

18.3 Comparación del puntaje Ferriman-Gallwey y las concentraciones hormonales entre las mujeres con DM1 con y sin SOP.

Como era esperado, las variables que tuvieron diferencia significativa fueron las relacionadas a los criterios con una mayor frecuencia para realizar el diagnóstico de SOP, siendo el puntaje Ferriman-Gallwey [7.12 (\pm 3.15) puntos en el grupo sin SOP, 9.06 (\pm 2.05) puntos en el grupo con SOP, $p = 0.040$] y el Volumen del Ovario Derecho [6.9 (RIC 5.55-8.77) cm^3 Vs 11.36 (RIC 8.64-15.89) cm^3 , $p = 0.005$, en los grupos sin SOP y con SOP respectivamente].

La concentración de Prolactina mostró tendencia a ser diferente en ambos grupos, con menores concentraciones en el grupo con SOP [15.3 (\pm 8.55) ng/mL] respecto al grupo sin SOP [19.88 (\pm 7.14) ng/mL], pero no significativo, $p = 0.071$.

El resto de las hormonas cuantificadas no mostró diferencias entre ambos grupos, especialmente las concentraciones de andrógenos no fueron diferentes entre ambos grupos. (Ver tabla 4)

Tabla 4. Características de evaluación hormonal, clínica e imagenológica en ambos grupos

	<i>DM1 sin SOP (n=25)</i>	<i>DM1 con SOP (n=16)</i>	<i>p</i>
Ferriman Gallwey	7.12 (\pm 3.15)	9.06 (\pm 2.05)	0.035*
Hormona Folículo Estimulante	5.52 (RIC 4.6-6.95) mUI/mL	4.67 (RIC 4.27-5.5) mUI/mL	0.215
Hormona Luteinizante	7.85 (\pm 4.44) mUI/mL	6.63 (\pm 4.08) mUI/mL	0.378
Estradiol	54.23 (RIC 41.7-105.3) pg/mL	44.62 (RIC 34.8-83.3) pg/mL	0.763
Prolactina	19.88 (\pm 7.14) ng/mL	15.3 (\pm 8.55) ng/mL	0.071
Testosterona Total	28.93 (\pm 12.87) ng/dL	35.46 (\pm 16.99) ng/dL	0.171
17-Alfa Hidroxiprogesterona	0.59 (RIC 0.32-1.42) ng/mL	0.45 (RIC 0.24-0.79) ng/mL	0.275
Dehidroepiandrosterona Sulfatada	173.98 (\pm 84.23) $\mu\text{g/dL}$	200.28 (\pm 135.87) $\mu\text{g/dL}$	0.454
Volumen Ovario Izquierdo	7.9 (RIC 7.04-10.3) cm^3	10.26 (RIC 5.73-14.83) cm^3	0.127
Volumen Ovario Derecho	6.9 (RIC 5.55-8.77) cm^3	11.36 (RIC 8.64-15.89) cm^3	0.005**

Pruebas estadísticas utilizadas: *T-Student, **U Mann Whitney.

18.4 Diferencia entre las concentraciones de citocinas en las mujeres que viven con DM1 con y sin SOP.

La IL-1 β fue descartada del análisis, debido a que solo se obtuvieron 3 valores al momento del procesamiento de la muestra, el resto tenía concentraciones aparentemente indetectables. Se incluyeron solo 36 pacientes, debido a que al momento de explorar las variables se identificaron 3 valores extremos, por lo que fueron excluidos del análisis y 2 no obtuvieron valores detectables de IL-6 o TNF- α .

El resto de las citocinas y proteínas inflamatorias no mostraron una diferencia estadísticamente significativa, como se puede observar en la Tabla 5, inclusive llama la atención que las concentraciones fueron ligeramente menores en el grupo de DM1 + SOP, respecto a los que no tienen el diagnóstico de SOP.

Tabla 5. Comparación de proteínas proinflamatorias cuantificadas según los grupos

	<i>DM1 sin SOP</i> (n=24)	<i>DM1 con SOP</i> (n=13)	<i>p</i>
Factor de Necrosis Tumoral α	10 (RIC 6.34-12.87) pg/mL	8.83 (RIC 7.53-12.25) pg/mL	0.949
Interleucina 6	1.55 (RIC 0.86-2.1) pg/mL	1.46 (RIC 1.16-1.92) pg/mL	0.786
Proteína C Reactiva	0.295 (RIC 0.15-0.58) mg/dL	0.26 (RIC 0.13-0.66) mg/dL	0.972

Pruebas estadísticas utilizadas: *U Mann Whitney*.

Se realizó el análisis del mismo modo el análisis sin excluir a los valores extremos, y tampoco se obtuvo diferencia significativa entre los grupos, así como tampoco presentaron cambios importantes en los valores de las medias y medianas.

18.5 Análisis exploratorio de las citocinas respecto a otras variables metabólicas.

Debido a que previamente se había documentado una diferencia entre las concentraciones de citocinas entre pacientes con diagnóstico de DM1 con criterios o no para SM, se realizó un análisis exploratorio tomando en cuenta algunas variables metabólicas y la presencia o no de síndrome metabólico.

Primero se realizó el cálculo de la tasa de depuración de glucosa estimada (eGDR), como se había obtenido en un estudio previo en la misma población,⁽⁸⁵⁾ encontrando una diferencia

significativa entre los grupos ($p = 0.040$), probablemente esperado por la diferencia significativa en la dosis de insulina.

Se realizó un análisis sobre todo el grupo, para valorar diferencias entre citocinas si presentaba o no RI, sin encontrar diferencias significativas (Ver tabla 6).

Tabla 6. Comparación de proteínas proinflamatorias del grupo dividido si tenían sugerencia de RI.

Pacientes con DM1	Sin resistencia a insulina (n=31)	Con resistencia a insulina (n=6)	p
Factor de Necrosis Tumoral α	9.93 (RIC 7.58-11.44) pg/mL	10.8 (RIC 6.42-13.44) pg/mL	0.509
Interleucina 6	1.36 (RIC 0.91-1.92) pg/mL	1.41 (RIC 1.16-1.65) pg/mL	0.710
Proteína C Reactiva	0.28 (RIC 0.13-0.46) mg/dL	0.64 (RIC 0.15-0.96) mg/dL	0.231

Pruebas estadísticas utilizadas: *U Mann Whitney*.

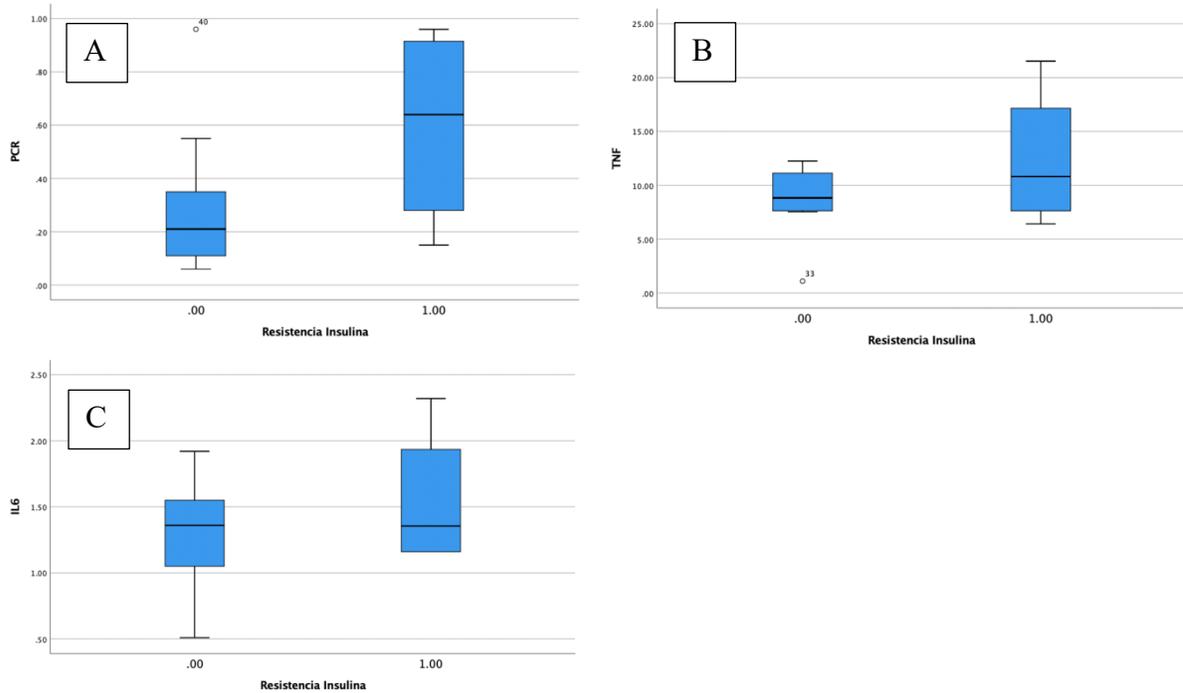
Posteriormente, se estratificó al grupo de DM1 + SOP solamente en si presentaba o no una eGDR sugerente de resistencia a insulina, sin obtener diferencia significativa entre los grupos. (Ver tabla 7 y Gráficos 1)

Tabla 7. Comparación de proteínas proinflamatorias del grupo de DM1+SOP con RI o sin RI.

Grupo DM1 + SOP	DM1 + SOP, sin resistencia a insulina (n=9)	DM1 + SOP, con resistencia a insulina (n=4)	p
Factor de Necrosis Tumoral α	8.83 (RIC 7.63-11.13) pg/mL	10.8 (RIC 7.63-17.16) pg/mL	0.395
Interleucina 6	1.36 (RIC 1.05-1.55) pg/mL	1.36 (RIC 1.16-1.93) pg/mL	0.587
Proteína C Reactiva	0.21 (RIC 0.11-0.35) mg/dL	0.64 (RIC 0.28-0.92) mg/dL	0.142

Pruebas estadísticas utilizadas: *U Mann Whitney*.

Gráficos 1. Distribución de las citocinas y proteínas proinflamatorias, agrupadas por presencia o no de resistencia a insulina, en el grupo de mujeres con DM1 + SOP.



Gráficos de barras y bigotes, que muestran el grupo de pacientes con DM1+SOP, divididos si presentaban o no una eGDR sugerente de Resistencia a Insulina, en el gráfico A se observa la PCR donde se ve una tendencia a ser mayor en el grupo con probable RI, en el gráfico B para TNF α donde las medianas son muy similares, así como en el gráfico 6 de la IL-6.

Posteriormente se estratificó el grupo según el IMC categorizando según la OMS en IMC normal, sobrepeso u obesidad, observando diferencias significativas en la IL-6 utilizando kruskal-wallis, como se observa en la tabla 8.

Tabla 8. Comparación de proteínas proinflamatorias en el total de pacientes agrupados según su IMC.

	IMC Normal (n=20)	Sobrepeso (n=15)	Obesidad (n=5)	p
FNT-α	8.81 (RIC 6.42-12.25) pg/mL	9.38 (RIC 7.63-11.73) pg/mL	11.05 (RIC 10-15.67) pg/mL	0.321
Interleucina 6	0.99 (RIC 0.74-1.36) pg/mL	1.55 (RIC 1.36-1.92) pg/mL	2.1 (RIC 2.01-2.32) pg/mL	0.000*
Proteína C Reactiva	0.21 (RIC 0.15-0.36) mg/dL	0.34 (RIC 0.12-0.48) mg/dL	0.55 (RIC 0.37-0.87) mg/dL	0.440

Pruebas estadísticas utilizadas: *U Mann Whitney*.

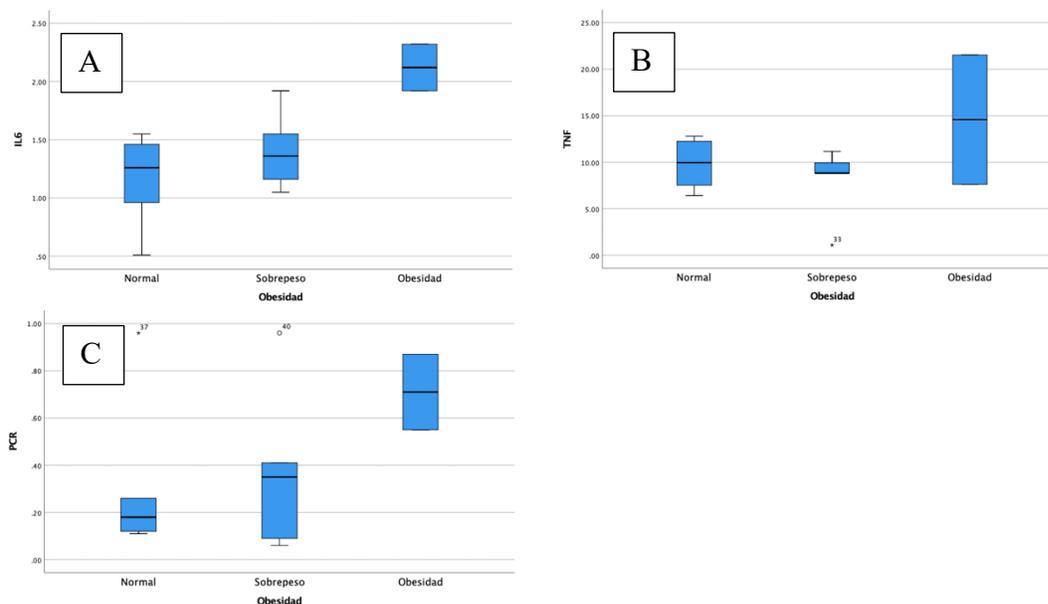
Del mismo modo, se estratificó el grupo de DM1+SOP de igual manera en las categorías del IMC, observando el mismo patrón con diferencias significativas en IL-6 solamente. (Ver tabla 9 y Gráfico 2).

Tabla 9. Comparación de proteínas proinflamatorias en el grupo de DM1+SOP agrupados según su IMC

	<i>IMC Normal (n=6)</i>	<i>Sobrepeso (n=5)</i>	<i>Obesidad (n=2)</i>	<i>p</i>
FNT-α	9.96 (RIC 7.53-12.25) pg/mL	8.83 (RIC 8.83-9.93) pg/mL	14.57 (RIC 7.63-21.5) pg/mL	0.812
Interleucina 6	1.26 (RIC 0.96-1.46) pg/mL	1.36 (RIC 1.16-1.55) pg/mL	2.12 (RIC 1.92-2.32) pg/mL	0.086
Proteína C Reactiva	0.18 (RIC 0.12-0.26) mg/dL	0.35 (RIC 0.09-0.41) mg/dL	0.71 (RIC 0.55-0.87) mg/dL	0.382

Pruebas estadísticas utilizadas: *U Mann Whitney*.

Gráficos 2. Distribución de las proteínas proinflamatorias, agrupados por su IMC, en el grupo de pacientes con DM1+SOP.



Gráficos de barras y bigotes, que muestran el grupo de pacientes con DM1+SOP, divididos según su IMC en normal, sobrepeso u obesidad, en el gráfico A se observa la PCR, en el gráfico B para TNF α y en el gráfico 6 de la IL-6. Donde observamos la tendencia en todas las citocinas pero de manera especial iL-6, del grupo de Obesidad respecto al resto.

Debido a los hallazgos encontrados y al reporte previo en esta misma población de las citocinas proinflamatorias cuando cumplían criterios de SM, se realizó un análisis diferencial entre los pacientes agrupándolos con presencia o no de síndrome metabólico, teniendo diferencia significativa de igual manera en la IL-6 (Ver tabla 10).

Tabla 10. Comparación de proteínas proinflamatorias de la población agrupados en presencia de SM

	<i>DM1 sin SM</i> (n=24)	<i>DM1 con SM</i> (n=13)	<i>p</i>
Factor de Necrosis Tumoral α	9.96 (RIC 7.53-12.3) pg/mL	8.83 (RIC 7.63-11.13) pg/mL	0.726
Interleucina 6	1.21 (RIC 0.91-1.55) pg/mL	1.92 (RIC 1.55-2.32) pg/mL	0.008*
Proteína C Reactiva	0.3 (RIC 0.15-0.39) mg/dL	0.21 (RIC 0.12-0.81) mg/dL	0.956

Pruebas estadísticas utilizadas: *U Mann Whitney*.

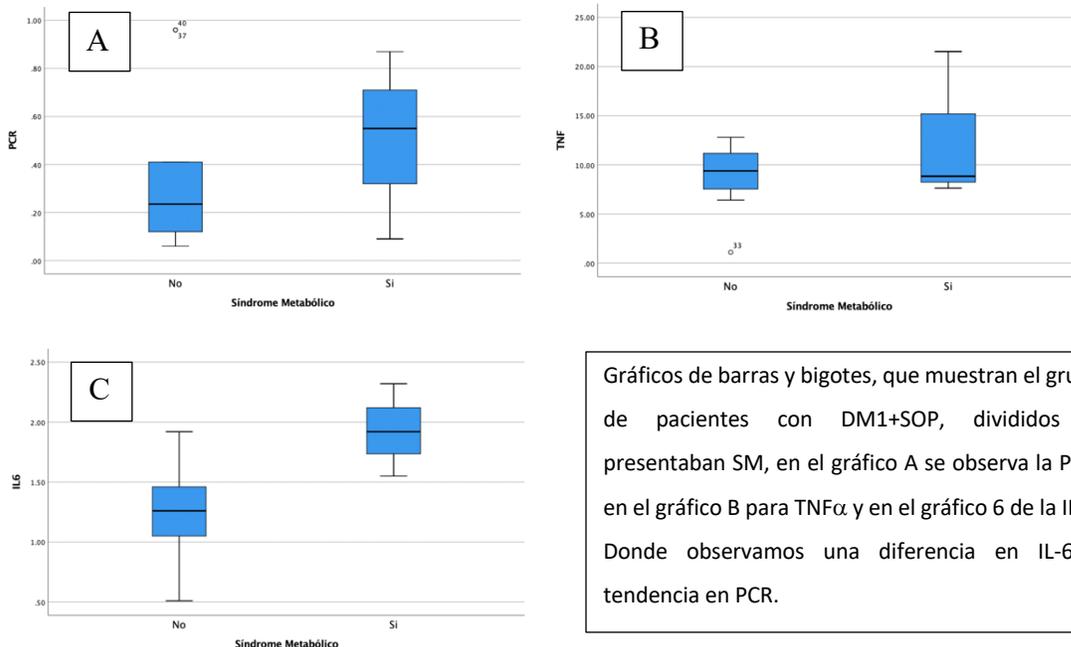
A su vez, se catalogo el grupo de DM1+SOP si cumplian estos criterios, encontrando de igual manera diferencia significativa en la IL-6 (Ver tabla 11 y Gráficos 3).

Tabla 11. Comparación de proteínas proinflamatorias en el grupo DM1+SOP agrupado por SM

	<i>DM1 + SOP, sin SM</i> (n=10)	<i>DM1 + SOP, con SM</i> (n=3)	<i>p</i>
Factor de Necrosis Tumoral α	9.38 (RIC 7.53-11.16) pg/mL	8.83 (RIC 8.23-15.17) pg/mL	0.672
Interleucina 6	1.26 (RIC 1.05-1.46) pg/mL	1.92 (RIC 1.74-2.12) pg/mL	0.027*
Proteína C Reactiva	0.24 (RIC 0.12-0.41) mg/dL	0.55 (RIC 0.32-0.71) mg/dL	0.735

Pruebas estadísticas utilizadas: *U Mann Whitney*.

Gráficos 3. Distribución de las proteínas proinflamatorias, agrupados por la presencia de SM en el grupo de DM1 + SOP.



Gráficos de barras y bigotes, que muestran el grupo de pacientes con DM1+SOP, divididos si presentaban SM, en el gráfico A se observa la PCR, en el gráfico B para TNF α y en el gráfico 6 de la IL-6. Donde observamos una diferencia en IL-6 y tendencia en PCR.

Se realizó una regresión logística solamente para valorar el peso de cada variable en el diagnóstico de SOP, tomando factores de confusión la dosis de insulina y el IMC, ya que para las citocinas no se obtuvo ninguna diferencia respecto a los grupos utilizados. Ingresando en el bloque 1 la Edad, en el bloque 2 las variables independientes del diagnóstico de SOP, y finalmente en el bloque 3 la dosis de insulina e IMC. Al final del modelo, no se obtuvo ninguna diferencia significativa, lo cual sugiere que las variables confusoras tienen un posible efecto sobre el diagnóstico de SOP, ya que las variables que tenían significancia (Ferriman y Volumen Ovárico) pierden significancia al ingresar las variables confusoras. Se repitió el procedimiento realizando el modelo tanto con los criterios de Rotterdam, AE-PCOS y NIH, obteniendo resultados similares.

19. DISCUSIÓN

Nuestra población de pacientes con DM1, se observó una frecuencia elevada de diagnóstico de SOP utilizando los criterios de Rotterdam, principalmente de los componentes de MOP e hiperandrogenismo clínico, sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los marcadores inflamatorios utilizados, pero tras realizar la agrupación por síndrome metabólico si obtuvimos diferencias significativas, lo que sugiere que el estado inflamatorio puede estar determinado principalmente por la presencia o no de síndrome metabólico.

En cuanto a la frecuencia del SOP en las mujeres que viven con DM1, en el meta-análisis de Escobar-Morreale et al,⁽¹²⁾ donde se refiere una prevalencia general de 24%, nuestra población tuvo una frecuencia elevada del diagnóstico de SOP, siendo de 39% utilizando los criterios de Rotterdam, 31.7% según los criterios de AE-PCOS y 14.6% con los más estrictos de NIH. Esto muy probablemente debido a lo que se discute en el artículo, ya que la frecuencia de SOP es variable en los diferentes estudios, probablemente relacionado a las características de cada población, ya que nuestros resultados son más similares a los reportados por Codner et al en población chilena⁽²⁷⁾ y por Amato et al en población Italiana,⁽²⁸⁾ donde se refiere una frecuencia de 41%-36%-12% y de 37%-37%-32% respectivamente según los criterios de Rotterdam, AE-PCOS y NIH, respectivamente.

En cuanto a los componentes principales de SOP, el de mayor frecuencia en nuestra muestra corresponde a la MOP en un 58.5% e Hirsutismo con un 41.5%, los cuales son porcentajes muy elevados respecto a lo reportado en el meta-análisis de Escobar-Morreale et al,⁽¹²⁾ ya que ellos reportan la MOP como la característica más importante pero con un 33% de prevalencia, y en los estudios individuales los porcentajes más altos se reportaron por Codner en población chilena⁽²⁷⁾ y Miyoshi en población japonesa,⁽⁸⁶⁾ con un 55% y un 52% respectivamente. El resto de los componentes en el meta-análisis tuvieron una prevalencia de 25% para Hiperandrogenemia e Hirsutismo, los cuales en nuestro estudio tuvimos porcentajes mayores, siendo de 41.5% para hirsutismo y 29.5% para Hiperandrogenemia, similares a lo reportado por Escobar-Morreale et al en población

española⁽⁸⁷⁾ y menores a lo que reporta Miulescu et al en Rumania,⁽⁸⁸⁾ en el caso de hirsutismo, siendo de 38% y 58% respectivamente; y en el caso de hiperandrogenemia tenemos menor frecuencia a lo reportado por Zachurzok et al en población en Polonia⁽⁸⁹⁾ y Kvasnicková et al en población de República Checa⁽⁹⁰⁾, siendo de 45% y 38%, respectivamente. En el caso de OA tuvimos una frecuencia de 29.3%, similar a lo reportado por Escobar-Morreale et al en población español,⁽⁸⁷⁾ Kvasnicková et al en población de República Checa⁽⁹⁰⁾ y Codner et al en población Chilena,⁽²⁷⁾ siendo de 19%, 19% y 17% respectivamente.

Una vez que se realizó el diagnóstico y se realizó la división de los grupos en la población de pacientes que viven con DM1, no tuvimos diferencia en el control glucémico, las concentraciones de los diferentes metabolitos asociados al control y el IMC. Observamos una diferencia significativa solamente en la dosis de insulina utilizada, la cual fue mayor en el grupo de DM1 + SOP respecto al otro grupo, lo cual puede apoyar la posibilidad de que esta sea una causa de la mayor frecuencia de SOP en esta población, ya que como se comentó previamente al ser necesaria dosis más altas de insulina exógena para el control por la fisiopatología de la enfermedad, y teniendo en cuenta los efectos de co-gonadotropina atribuidas a la insulina en la producción de andrógenos, reclutamiento folicular y vías de crecimiento, además de que al realizar la regresión logística se observa una pérdida del efecto de las variables que componen el SOP al ingresar las variables confusoras, se puede asumir que la dosis de insulina es un factor de suma importancia para la aparición de cambios que favorecen algunos de los componentes del SOP y por lo tanto su diagnóstico. La edad no tuvo significancia estadística, pero se encontró en valores muy limitrofes, lo cual puede ser un factor que también influya en la presencia de MOP, ya que el volumen ovárico depende de la reserva folicular, y entre más joven sea la paciente es esperado pueda tener un mayor volumen ovárico.

En cuanto a las características clínicas, se observó diferencia como era esperado en los factores que definen los componentes de SOP tuvieron mayor prevalencia, como lo es el

puntaje Ferriman-Gallwey y el Volumen Ovárico, sin obtener diferencia significativa en las concentraciones de andrógenos. En este caso, una de nuestras limitantes es que no se tuvo la cuantificación de globulina de unión a hormonas sexuales (SHBG) para poder realizar los cálculos del índice de androgenos libre (FAI), testosterona libre calculada (cFT) y testosterona biodisponible (bT) los cuales son cálculos que han demostrado pueden ser utilizados como un equivalente de hiperandrogenismo cuando se tiene una SHBG menor, y en este caso al utilizar la TT como andrógeno principal podrían ser de utilidad, y además sería algo a considerar ya que como la dosis de la insulina fue un factor que tuvo diferencia significativa, y se ha considerado en otros estudios que la resistencia a insulina se asocia con la disminución de SHBG, es posible que la presencia de elevación de estos valores calculados sea mayor y la frecuencia de hiperandrogenemia sea mayor a lo reportado.

En cuanto a las concentraciones de las citocinas, la IL-1 β se descartó del análisis, ya que solo se obtuvieron valores en 3 de las muestras, el resto se marcaron como indetectables, en general desconocemos el porque esta cuantificación ya que la caducidad del kit era adecuada, además de que el resto de las cuantificaciones que se realizaron mediante el mismo sistema si nos otorgaron valores detectables, por lo que esto podría descartar que sea consecuencia del manejo y/o almacenamiento de la muestra. El resto de las citocinas nos proporcionó un total de 37 valores para el análisis de los datos después de eliminar los valores extremos, sin poder observar diferencias significativas entre los grupos, inclusive llamo la atención que las medianas eran ligeramente menores en el grupo de DM1 + SOP respecto al otro grupo.

Escobar-Morreale et al,⁽⁵⁴⁾ realizó un meta-análisis dirigido a la evaluación de las citocinas proinflamatorias en mujeres con SOP, donde analizo la IL-6 de 852 mujeres (522 mujeres con SOP y 330 controles) sin encontrar diferencias significativas, con una diferencia del 15% del valor entre la media de los grupos, algo similar a lo que encontramos ya que la diferencia entre medianas de nuestros grupos fue de 12.2%, sin embargo nuestra población no incluyo un comparativo con individuos sanos. En el mismo meta-análisis analizó el TNF- α , donde

incluyo 726 mujeres (398 con SOP y 328 controles), de igual manera sin encontrar diferencia significativa entre los grupos con una diferencia del 5% entre los grupos, en nuestro caso encontramos un valor mayor de diferencia entre medianas de 11.7%, sin embargo llamo de nuestra atención que característicamente las medianas de los grupos eran menores en el grupo de DM1 + SOP, respecto a los pacientes con DM1 sin SOP. Del mismo modo la PCR fue evaluada en este meta-análisis, incluyendo 3648 mujeres (2359 con SOP y 1289 controles) donde si se observo una diferencia significativa ($p = <0.0001$) con una media de 96% mayor en el grupo de mujeres con SOP respecto a los controles, ligada aparentemente a obesidad ya que cuando se controlaba por IMC se perdía esta diferencia estadística, algo que no se observo en nuestro grupo de pacientes. Algunos puntos a tomar en cuenta en lo referido a este meta-análisis es que la heterogeneidad entre los estudios era importante, que los criterios diagnóstico para SOP no eran uniformes, así como que no todos los pacientes incluidos fueron evaluados en ayuno, sobre todo debido a que la PCR que adquirió importancia es conocida por ser producida a nivel hepático por el estímulo de IL-6 y TNF- α principalmente en personas con obesidad, donde en nuestro estudio ninguna de las citocinas adquirió esta diferencia significativa cuando se evaluó por en los grupos de SOP y sin SOP. Por lo que ante este hallazgo, y conforme a resultados reportados previamente en esta misma población de pacientes con Diabetes tipo 1, publicados por Ferreira-Hermosillo et al⁽²⁹⁾, donde se apreció una diferencia de las concentraciones de citocinas según la presencia de síndrome metabólico, se realizo un subanálisis de la muestra tomando en cuenta si existía resistencia a insulina, sobrepeso y obesidad, o síndrome metabólico. Donde se observo que la IL-6 adquirió significancia cuando se analizo el grupo por las categorías de sobrepeso y obesidad, así como por la presencia o no de síndrome metabólico. Otro subanálisis realizado basado en la posibilidad de resistencia a insulina, utilizando la eGDR, tomando un punto de corte sugerido en un estudio previo en esta población,⁽⁸⁵⁾ se obtuvieron valores limitrofes para considerar diferencias en las concentraciones de la PCR y el FNT- α .

La frecuencia de síndrome metabólico en nuestra población, utilizando los criterios de ATPIII fue de 31.7%, un poco menor a la reportada en esta misma población (44%), sin embargo nuestra población fue muy específica de mujeres en edad reproductiva, excluyendo mujeres de >45 años y hombres, donde la posibilidad de una frecuencia de síndrome metabólico es mayor. También se pudo observar una diferencia estadísticamente significativa para la IL-6, siendo mayor en los pacientes que cumplían con SM, independientemente si tenían criterios o componentes de SOP, lo cual sugiere que esta citocina tiene un mayor peso en cuestiones y componentes metabólicos. Así mismo, se observó que la Resistina tiene una tendencia a una diferencia significativa, la cual ya se había reportado con una diferencia en esta misma población, en nuestro caso no resultó significativa pero con una tendencia, probablemente si se incrementará el número de muestra, se observaría una diferencia significativa como fue documentado previamente.

Por los datos evaluados anteriormente, y de acuerdo a lo comentado en el meta-análisis, los componentes del SOP parecen diferir entre las poblaciones, en nuestro caso de población latina, tenemos porcentaje de diagnóstico según los criterios utilizados y frecuencia de los diferentes componentes, similares a la población de Chile, sin embargo la población mexicana evaluada cuenta con una notable mayor frecuencia de MOP e Hirsutismo respecto a esta población chilena. Lo que contribuye y aporta nuevos datos a las diferencias entre los componentes del SOP, según su etnia.

Algo que tenemos que resaltar es que el comportamiento de los componentes del SOP es sin duda diferente en nuestra población, ya que el porcentaje de MOP e Hirsutismo es muy alto comparado con el resto de las poblaciones referidas en el meta-análisis. Una de las propuestas que explicaría este hallazgo, es la dosis de insulina utilizada, ya que estos cambios pudieran ser provocados por las dosis elevadas de insulina y su función como gonadotropina, representando tal vez cambios inducidos por el tratamiento exógeno y no como tal representar una disfunción ovárica, como se ha propuesto en el SOP independiente de la presencia de Obesidad y RI, sugiriendo que estas pacientes con

diagnóstico de SOP pudiera tratarse de cambios inducidos por el tratamiento y tener implicaciones distintas sobre todo para el desarrollo de complicaciones o alteraciones asociadas a un estado proinflamatorio. Sin embargo, debido a que la información respecto al estado inflamatorio, la producción de citocinas y el posible riesgo que estos cambios impliquen en un futuro a estas pacientes es contradictorio en algunos de los estudios descritos previamente, debe ampliarse la investigación en estos puntos sobre todo enfocado a la posibilidad de que estos cambios puedan o no traducirse en un riesgo posterior a estas pacientes, y en caso de documentarse valorar si el tratamiento genera algún cambio benéfico en estas pacientes.

Nuestro estudio tiene algunas limitantes que pueden ser las causantes de que no hayamos encontrado una diferencia significativa en los objetivos propuestos, los cuales discutimos a continuación:

1. El tamaño de la muestra, ya que es una muestra pequeña, sin embargo se invitaron prácticamente a toda la población de mujeres con diagnóstico de Diabetes tipo 1 en edad reproductiva, que asisten a seguimiento en la clínica de DM1, y fue toda la muestra disponible, por lo que una posible propuesta para mejorar esta limitante es al realizar la contribución con otros centros hospitalarios que cuenten con una clínica de atención al paciente con DM1. Sin embargo a pesar de que el número de muestra que se obtuvo por completar las evaluaciones del protocolo fue pequeño, correspondiendo a 41 pacientes solamente, las características basales de nuestra muestra son muy similares en control glucémico de los datos proporcionados por el Registro Nacional de Diabetes tipo 1 (RENACED),⁽⁶²⁾ donde se refiere una media de Hemoglobina Glucosilada de 8.9% ($\pm 2.22\%$), en nuestra muestra fue de 8.66% ($\pm 1.91\%$). Existe una pequeña diferencia en la Edad y Edad de diagnóstico, refiriéndose en el RENACED una media de Edad de 21 años y una edad de diagnóstico de 11 años, siendo mayor en nuestra población con una media de 30 años y una edad de diagnóstico de 13 años, esto probablemente debido a que nuestra muestra fue tomada de un centro que brinda atención exclusivamente a mujeres mayores de edad (>18 años) y solo incluyó una subpoblación de

mujeres en edad reproductiva (18-44 años), además que se excluyeron condiciones específicas.

2. La falta de inclusión de pacientes sanos, o solo con el diagnóstico de SOP, para valorar las diferencias en las concentraciones en estas poblaciones, sin embargo no era el propósito del estudio, pero sería interesante valorar si es que estas diferencias son mayores, e inclusive incluir a pacientes con Diabetes tipo 2.
3. La falta de cuantificación de SHBG, debido a que la dosis de insulina fue uno de los parámetros que tuvo diferencia significativa, y la eGDR del mismo modo fue significativa en el grupo de SOP, y como es conocido en otras poblaciones (en DM2 y Obesidad), esta proteína se encuentra en relación inversa a el hiperinsulinismo endógeno, por lo que pudiera estar afectando las concentraciones reales de los andrógenos cuantificados en nuestro estudio.
4. Falta de Clamp Euglucémico como estándar de oro para definir la RI, ya que utilizamos la eGDR como un marcador de posible RI, debido a que en nuestra unidad no contamos con la posibilidad de realizar este procedimiento y al ser un procedimiento invasivo, cambiaría completamente el riesgo del estudio.

Algunas observaciones relevantes que se obtuvieron, pero que no formaban parte de los objetivos del estudio, pero que vale la pena mencionar son que del total de mujeres en edad reproductiva con diagnóstico de Diabetes tipo 1 y fueron invitadas a participar en el protocolo, llama la atención que solo 3 mujeres (que representa el 4.5% de los pacientes que se invitaron al protocolo) eran usuarias de algún método anticonceptivo, esta observación es importante ya que las mujeres con este diagnóstico cursarán con un embarazo de alto riesgo (en caso de quedar embarazadas) y deben de obtener ciertas metas de tratamiento previo al embarazo para disminuir la progresión de complicaciones,⁽⁹¹⁾ lo que habla de la falta de concientización sobre planificación familiar en esta población. En general, estas pacientes pueden utilizar cualquier método anticonceptivo, ya que la categoría de los anticonceptivos en esta población en general corresponde a la categoría 2 (excepto para el dispositivo intrauterino T de cobre, el cual es categoría 1), sobre todo por

falta de evidencia del efecto en el control a largo plazo de estos pacientes, así como por los cambios en perfil de lípidos sobre todo con el uso de anticonceptivos combinados.⁽⁹²⁾

20. CONCLUSIONES

El SOP es una entidad muy heterogénea, la cual se diagnostica al integrar componentes (hiperandrogenismo clínico o bioquímico, OA o MOP), que sugieren una disfunción del ovario, una vez que se han descartado otras enfermedades que pueden provocar algunos de estos componentes o criterios diagnósticos de la enfermedad. Ante esta situación, los componentes del SOP tienen una presentación muy variable entre poblaciones e inclusive entre pacientes con enfermedades distintas que pueden favorecer la aparición de estos cambios en la estructura y función del ovario, en este caso particular las mujeres con diagnóstico de DM1 parecen tener una mayor frecuencia de estos componentes del SOP, que pudiera estar relacionado con la necesidad del uso de dosis mayores de insulina para mejorar su control glucémico, con una probable contribución por su función como gonadotropina en las alteraciones estructurales y funcionales del ovario. Sin embargo, a pesar de que el SOP es conocido por asociarse a un estado proinflamatorio leve y crónico, independientemente de su asociación con marcadores metabólicos o no, en este caso parece que el estado proinflamatorio de estos pacientes a pesar de tener una frecuencia elevada de SOP esta en relación con variables metabólicas y no directamente con los diferentes componentes del SOP.

Por los hallazgos descritos, sería de utilidad valorar la posibilidad de métodos útiles para diferenciar la posibilidad de SOP inducido por el tratamiento farmacológico en estos pacientes, de aquellos con una disfunción en la función y estructura del ovario, equivalente a las mujeres con SOP sin RI u Obesidad observados en la población sin diabetes. Debido a que en los pacientes con SOP es conocido el riesgo cardiovascular en estas pacientes, y este diagnóstico parece ser más frecuente en la población con diagnóstico de DM1, se requieren más estudios para evaluar esta asociación y poder identificar con mayor precisión los casos de SOP que puedan representar una condición de riesgo de complicaciones a largo plazo.

21. Bibliografía

1. DiMiglio LA, Evans-Molina C, Oram RA. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2018;391(10138):2449-62.
2. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2014;383(9911):69-82.
3. Azziz R, Carmina E, Chen Z, Dunaif A, Laven JS, Legro RS, et al. Polycystic ovary syndrome. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16057.
4. McCartney Ch R, Marshall JC. Polycystic Ovary Syndrome. *N Engl J Med*. 2016;375(14):1398-9.
5. Rosenfield RL, Ehrmann DA. The Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): The Hypothesis of PCOS as Functional Ovarian Hyperandrogenism Revisited. *Endocr Rev*. 2016;37(5):467-520.
6. Dewailly D, Lujan ME, Carmina E, Cedars MI, Laven J, Norman RJ, et al. Definition and significance of polycystic ovarian morphology: a task force report from the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society. *Hum Reprod Update*. 2014;20(3):334-52.
7. Lobo RA. A disorder without identity: "HCA," "PCO," "PCOD," "PCOS," "SLS". what are we to call it?! *Fertil Steril*. 1995;63(6):1158-60.
8. Behera M, Price T, Walmer D. Estrogenic ovulatory dysfunction or functional female hyperandrogenism: an argument to discard the term polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2006;86(5):1292-5.
9. Dunaif A, Fauser BC. Renaming PCOS--a two-state solution. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(11):4325-8.
10. Sam S, Dunaif A. Polycystic ovary syndrome: syndrome XX? *Trends Endocrinol Metab*. 2003;14(8):365-70.
11. 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.

12. Escobar-Morreale HF, Roldan-Martin MB. Type 1 Diabetes and Polycystic Ovary Syndrome: Systematic Review and Meta-analysis. *Diabetes Care*. 2016;39(4):639-48.
13. Dhesi A MS. Metabolic Aspects of Polycystic Ovary Syndrome. *Postgraduate Obstetrics & Gynecology*. 2015;35:1-8.
14. 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.
15. Escobar-Morreale HF, San Millan JL. Abdominal adiposity and the polycystic ovary syndrome. *Trends Endocrinol Metab*. 2007;18(7):266-72.
16. Codner E. Type 1 diabetes, obesity and PCOS: Is type 1 stepping into the shoes of type 2 diabetes? *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2020.
17. Thong EP, Milat F, Joham AE, Mishra GD, Teede H. Obesity, menstrual irregularity and polycystic ovary syndrome in young women with type 1 diabetes: A population-based study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2020;93(5):564-71.
18. Influence of intensive diabetes treatment on body weight and composition of adults with type 1 diabetes in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes Care*. 2001;24(10):1711-21.
19. Morariu EM, Szuszkiewicz-Garcia M, Krug EI, Lemos BD, DeRiso L, Tedesco MB, et al. Menstrual and Reproductive Function in Women with Type 1 Diabetes. *Endocr Pract*. 2015;21(7):750-60.
20. Diabetes control and complications trial. *Henry Ford Hosp Med J*. 1983;31(2):115-6.
21. Kjaer K, Hagen C, Sando SH, Eshoj O. Epidemiology of menarche and menstrual disturbances in an unselected group of women with insulin-dependent diabetes mellitus compared to controls. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992;75(2):524-9.
22. Kjaer K, Hagen C, Sando SH, Eshoj O. Infertility and pregnancy outcome in an unselected group of women with insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol*. 1992;166(5):1412-8.

23. Pedersen KK, Hagen C, Sando-Pedersen SH, Eshoj O. [Infertility and pregnancy outcome in women with insulin-dependent diabetes. An epidemiological study]. *Ugeskr Laeger*. 1994;156(42):6196-200.
24. Jonasson JM, Brismar K, Sparen P, Lambe M, Nyren O, Ostenson CG, et al. Fertility in women with type 1 diabetes: a population-based cohort study in Sweden. *Diabetes Care*. 2007;30(9):2271-6.
25. Codner E, Eyzaguirre FC, Iniguez G, Lopez P, Perez-Bravo F, Torrealba IM, et al. Ovulation rate in adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Fertil Steril*. 2011;95(1):197-202, e1.
26. Codner E, Merino PM, Tena-Sempere M. Female reproduction and type 1 diabetes: from mechanisms to clinical findings. *Hum Reprod Update*. 2012;18(5):568-85.
27. Codner E, Soto N, Lopez P, Trejo L, Avila A, Eyzaguirre FC, et al. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome and ovarian morphology in women with type 1 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(6):2250-6.
28. Amato MC, Guarnotta V, Cirese A, Modica R, Panto F, Giordano C. No phenotypic differences for polycystic ovary syndrome (PCOS) between women with and without type 1 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(1):203-11.
29. Ferreira-Hermosillo A, Molina-Ayala M, Ramirez-Renteria C, Vargas G, Gonzalez B, Isibasi A, et al. Inflammatory Cytokine Profile Associated with Metabolic Syndrome in Adult Patients with Type 1 Diabetes. *J Diabetes Res*. 2015;2015:972073.
30. Jager A, van Hinsbergh VW, Kostense PJ, Emeis JJ, Yudkin JS, Nijpels G, et al. von Willebrand factor, C-reactive protein, and 5-year mortality in diabetic and nondiabetic subjects: the Hoorn Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19(12):3071-8.
31. Schulze MB, Shai I, Rimm EB, Li T, Rifai N, Hu FB. Adiponectin and future coronary heart disease events among men with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2005;54(2):534-9.
32. Eisenbarth GS. Update in type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(7):2403-7.

33. Gianani R, Campbell-Thompson M, Sarkar SA, Wasserfall C, Pugliese A, Solis JM, et al. Dimorphic histopathology of long-standing childhood-onset diabetes. *Diabetologia*. 2010;53(4):690-8.
34. Lu J, Liu J, Li L, Lan Y, Liang Y. Cytokines in type 1 diabetes: mechanisms of action and immunotherapeutic targets. *Clin Transl Immunology*. 2020;9(3):e1122.
35. Ohno Y, Aoki N, Nishimura A. In vitro production of interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993;77(4):1072-7.
36. Schram MT, Chaturvedi N, Schalkwijk CG, Fuller JH, Stehouwer CD, Group EPCS. Markers of inflammation are cross-sectionally associated with microvascular complications and cardiovascular disease in type 1 diabetes--the EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetologia*. 2005;48(2):370-8.
37. Snell-Bergeon JK, West NA, Mayer-Davis EJ, Liese AD, Marcovina SM, D'Agostino RB, Jr., et al. Inflammatory markers are increased in youth with type 1 diabetes: the SEARCH Case-Control study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(6):2868-76.
38. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:519-50.
39. Maedler K, Schumann DM, Sauter N, Ellingsgaard H, Bosco D, Baertschiger R, et al. Expression of Concern. Low Concentration of Interleukin-1beta Induces FLICE-Inhibitory Protein-Mediated beta-Cell Proliferation in Human Pancreatic Islets. *Diabetes* 2006;55:2713-2722; DOI: 10.2337/db05-1430. *Diabetes*. 2016;65(8):2462.
40. Boni-Schnetzler M, Boller S, Debray S, Bouzakri K, Meier DT, Prazak R, et al. Free fatty acids induce a proinflammatory response in islets via the abundantly expressed interleukin-1 receptor I. *Endocrinology*. 2009;150(12):5218-29.
41. Teros T, Hakala R, Ylinen L, Liukas A, Arvilommi P, Sainio-Pollanen S, et al. Cytokine balance and lipid antigen presentation in the NOD mouse pancreas during development of insulinitis. *Pancreas*. 2000;20(2):191-6.

42. Campbell IL, Hobbs MV, Dockter J, Oldstone MB, Allison J. Islet inflammation and hyperplasia induced by the pancreatic islet-specific overexpression of interleukin-6 in transgenic mice. *Am J Pathol.* 1994;145(1):157-66.
43. Chen YL, Qiao YC, Pan YH, Xu Y, Huang YC, Wang YH, et al. Correlation between serum interleukin-6 level and type 1 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Cytokine.* 2017;94:14-20.
44. Green EA, Eynon EE, Flavell RA. Local expression of TNFalpha in neonatal NOD mice promotes diabetes by enhancing presentation of islet antigens. *Immunity.* 1998;9(5):733-43.
45. Yang XD, Tisch R, Singer SM, Cao ZA, Liblau RS, Schreiber RD, et al. Effect of tumor necrosis factor alpha on insulin-dependent diabetes mellitus in NOD mice. I. The early development of autoimmunity and the diabetogenic process. *J Exp Med.* 1994;180(3):995-1004.
46. Qiao YC, Chen YL, Pan YH, Tian F, Xu Y, Zhang XX, et al. The change of serum tumor necrosis factor alpha in patients with type 1 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2017;12(4):e0176157.
47. Danielson KK, Monson RS, LeCaire TJ. Factors Associated with Higher Pro-Inflammatory Tumor Necrosis Factor-alpha Levels in Young Women with Type 1 Diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2016;124(3):140-7.
48. Ebejer K, Calleja-Agius J. The role of cytokines in polycystic ovarian syndrome. *Gynecol Endocrinol.* 2013;29(6):536-40.
49. 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.
50. Duleba AJ, Dokras A. Is PCOS an inflammatory process? *Fertil Steril.* 2012;97(1):7-12.
51. Fulghesu AM, Sanna F, Uda S, Magnini R, Portoghese E, Batetta B. IL-6 serum levels and production is related to an altered immune response in polycystic ovary syndrome girls with insulin resistance. *Mediators Inflamm.* 2011;2011:389317.

52. Pawelczak M, Rosenthal J, Milla S, Liu YH, Shah B. Evaluation of the pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha in adolescents with polycystic ovary syndrome. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 2014;27(6):356-9.
53. Gao L, Gu Y, Yin X. High Serum Tumor Necrosis Factor-Alpha Levels in Women with Polycystic Ovary Syndrome: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016;11(10):e0164021.
54. Escobar-Morreale HF, Luque-Ramirez M, Gonzalez F. Circulating inflammatory markers in polycystic ovary syndrome: a systematic review and metaanalysis. *Fertil Steril*. 2011;95(3):1048-58 e1-2.
55. Toulis KA, Goulis DG, Mintziori G, Kintiraki E, Eukarpidis E, Mouratoglou SA, et al. Meta-analysis of cardiovascular disease risk markers in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update*. 2011;17(6):741-60.
56. Alissa EM, Algarni SA, Khaffji AJ, Al Mansouri NM. Impact of interleukin-6 on central obesity measures in women with polycystic ovarian syndrome. *J Obstet Gynaecol*. 2020;40(8):1133-7.
57. Apridonidze T, Essah PA, Luorno 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.
58. Coviello AD, Legro RS, Dunaif A. Adolescent girls with polycystic ovary syndrome have an increased risk of the metabolic syndrome associated with increasing androgen levels independent of obesity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(2):492-7.
59. Rossi B, Sukalich S, Droz J, Griffin A, Cook S, Blumkin A, et al. Prevalence of metabolic syndrome and related characteristics in obese adolescents with and without polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(12):4780-6.
60. Castro-Correia C, Santos-Silva R, Pinheiro M, Costa C, Fontoura M. Metabolic risk factors in adolescent girls with type 1 diabetes. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2018;31(6):631-5.

61. Donga E, Dekkers OM, Corssmit EP, Romijn JA. Insulin resistance in patients with type 1 diabetes assessed by glucose clamp studies: systematic review and meta-analysis. *Eur J Endocrinol.* 2015;173(1):101-9.
62. Faradji-Hazan RN, Valenzuela-Lara M, Diaz-Barriga Menchaca AP, Almeda-Valdes P, Antonio-Villa NE, Vidrio-Velazquez M, et al. Type 1 Diabetes Care in Mexico: An Analysis of the RENACED-DT1 National Registry. *Rev Invest Clin.* 2021.
63. Moran C, Tena G, Moran S, Ruiz P, Reyna R, Duque X. Prevalence of polycystic ovary syndrome and related disorders in mexican women. *Gynecol Obstet Invest.* 2010;69(4):274-80.
64. Shruthi S, Mohan V, Amutha A, Aravindhan V. Increased serum levels of novel T cell cytokines IL-33, IL-9 and IL-17 in subjects with type-1 diabetes. *Cytokine.* 2016;86:6-9.
65. Ryba-Stanislawowska M, Werner P, Brandt A, Mysliwiec M, Mysliwska J. Th9 and Th22 immune response in young patients with type 1 diabetes. *Immunol Res.* 2016;64(3):730-5.
66. Cameron MJ, Arreaza GA, Zucker P, Chensue SW, Strieter RM, Chakrabarti S, et al. IL-4 prevents insulinitis and insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic mice by potentiation of regulatory T helper-2 cell function. *J Immunol.* 1997;159(10):4686-92.
67. Ryden A, Faresjo M. Altered immune profile from pre-diabetes to manifestation of type 1 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2013;100(1):74-84.
68. Ishigame H, Zenewicz LA, Sanjabi S, Licona-Limon P, Nakayama M, Leonard WJ, et al. Excessive Th1 responses due to the absence of TGF-beta signaling cause autoimmune diabetes and dysregulated Treg cell homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(17):6961-6.
69. Marro BS, Ware BC, Zak J, de la Torre JC, Rosen H, Oldstone MB. Progression of type 1 diabetes from the prediabetic stage is controlled by interferon-alpha signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(14):3708-13.
70. Stewart TA, Hultgren B, Huang X, Pitts-Meek S, Hully J, MacLachlan NJ. Induction of type I diabetes by interferon-alpha in transgenic mice. *Science.* 1993;260(5116):1942-6.

71. Gomez-Diaz RA, Perez-Perez G, Hernandez-Cuesta IT, Rodriguez-Garcia Jdel C, Guerrero-Lopez R, Aguilar-Salinas CA, et al. Incidence of type 1 diabetes in Mexico: data from an institutional register 2000-2010. *Diabetes Care*. 2012;35(11):e77.
72. (IDF) IDF. Diabetes Atlas: <https://diabetesatlas.org/en/InternationalDiabetesFederation>; 2015 [updated 2019. 9th edition:]
73. Salud Sd. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT): <https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/index.php>; 2018 [updated 2018].
74. Ferreira Hermosillo A, Vargas Ortega G, Gonzalez Virla B, Mercado Atri M, Molina Ayala M. [Prevalence of metabolic syndrome (MS) in patients with type 1 diabetes (DM1)]. *Gac Med Mex*. 2012;148(2):137-43.
75. Foss-Freitas MC, Foss NT, Donadi EA, Foss MC. Effect of the glycemic control on intracellular cytokine production from peripheral blood mononuclear cells of type 1 and type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract*. 2008;82(3):329-34.
76. Bevilacqua MP. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:767-804.
77. Mohamed-Ali V, Pinkney JH, Coppack SW. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1998;22(12):1145-58.
78. Lechleitner M, Koch T, Herold M, Dzien A, Hoppichler F. Tumour necrosis factor-alpha plasma level in patients with type 1 diabetes mellitus and its association with glycaemic control and cardiovascular risk factors. *J Intern Med*. 2000;248(1):67-76.
79. Salud OMDI. Salud de la Mujer 2018 [Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/women-s-health>].
80. García-Perfecto V SR, Jiménez-Sierra C, Valencia-Ortega J. Medición de marcadores inflamatorios en preeclampsia, diabetes mellitus gestacional y embarazo normal mediante ensayo inmunoenzimático y ensayo de detección multianalito. México: Instituto Politécnico Nacional; 2017.
81. España RANdMd. Diccionario de Términos Médicos 2012 [Available from: <https://dtme.ranm.es/presentacion.aspx>].

82. Teede HJ, Misso ML, Costello MF, Dokras A, Laven J, Moran L, et al. Recommendations from the international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2018;33(9):1602-18.
83. Martin KA, Anderson RR, Chang RJ, Ehrmann DA, Lobo RA, Murad MH, et al. Evaluation and Treatment of Hirsutism in Premenopausal Women: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018;103(4):1233-57.
84. Alexandraki KI, Piperi C, Ziakas PD, Apostolopoulos NV, Makrilakis K, Syriou V, et al. Cytokine secretion in long-standing diabetes mellitus type 1 and 2: associations with low-grade systemic inflammation. *J Clin Immunol.* 2008;28(4):314-21.
85. Ferreira-Hermosillo A, Ibarra-Salce R, Rodriguez-Malacara J, Molina-Ayala MA. Comparison of indirect markers of insulin resistance in adult patients with Double Diabetes. *BMC Endocr Disord.* 2020;20(1):87.
86. Miyoshi A, Nagai S, Takeda M, Kondo T, Nomoto H, Kameda H, et al. Ovarian morphology and prevalence of polycystic ovary syndrome in Japanese women with type 1 diabetes mellitus. *J Diabetes Investig.* 2013;4(3):326-9.
87. 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.
88. Miulescu RD MM, Margina D, Poiana C, Danoiu S. The prevalence of hirsutism and polycystic ovary syndrome in women with type 1 diabetes mellitus. *Ginecoro.* 2009;5:178-82.
89. Zachurzok A, Deja G, Gawlik A, Drosdzol-Cop A, Malecka-Tendera E. Hyperandrogenism in adolescent girls with type 1 diabetes mellitus treated with intensive and continuous subcutaneous insulin therapy. *Endokrynol Pol.* 2013;64(2):121-8.
90. Kvasnicková H VJ, Hanáček J, et al. Occurrence of polycystic ovary syndrome and hyperandrogenemia in women with type 1 diabetes mellitus. *Prakt Lek.* 2010;90:224-8.
91. American Diabetes Association Professional Practice C, American Diabetes Association Professional Practice C, Draznin B, Aroda VR, Bakris G, Benson G, et al. 15.

Management of Diabetes in Pregnancy: Standards of Medical Care in Diabetes-2022. Diabetes Care. 2022;45(Suppl 1):S232-S43.

92. Curtis KM, Tepper NK, Jatlaoui TC, Berry-Bibee E, Horton LG, Zapata LB, et al. U.S. Medical Eligibility Criteria for Contraceptive Use, 2016. MMWR Recomm Rep. 2016;65(3):1-103.

22. ANEXO 1

 INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL	
 INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN Y POLÍTICAS DE SALUD COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD Carta de consentimiento informado para participación en protocolos de investigación (adultos)	
Nombre del estudio:	Perfil de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-1) asociado a Síndrome de Ovario Poliquístico en adultos que viven con Diabetes tipo 1
Patrocinador externo (si aplica):	No aplica.
Lugar y fecha:	
Número de registro institucional:	
Justificación y objetivo del estudio:	Usted esta siendo invitada a participar en este estudio porque tiene el diagnóstico de Diabetes tipo 1. El propósito del estudio esta basado en reportes de otros estudios donde refieren que el síndrome de ovario poliquístico se diagnostica más en las mujeres que viven con Diabetes tipo 1 respecto a la población general, debido a que las mujeres con síndrome de ovario poliquístico pueden tener mayores sustancias inflamatorias, el objetivo del estudio es diagnosticar o descartar en usted síndrome de ovario poliquístico y medir estas sustancias inflamatorias para ver si existe diferencias, el generar este conocimiento, probablemente se podrá obtener implicaciones en tratamiento, pronóstico y escrutinios posteriormente en las mujeres que viven con Diabetes tipo 1.
Procedimientos:	Se realizarán los procedimientos de rutina para realizar o descartar el diagnóstico de síndrome de ovario poliquístico, que consiste en una exploración física, la toma de muestras de sangre (para medir hormonas) en los primeros 3-5 días del ciclo menstrual (en caso de no tener menstruación por más de 3 meses se inducirá la misma administrando Medroxiprogesterona 10mg cada 24 horas por 10 días), el llenado de un menograma para valorar irregularidad menstrual, así como un ultrasonido pélvico para valorar los ovarios.
Posibles riesgos y molestias:	Riesgo mínimo, debido a que se realizará una punción con aguja para obtener las muestras de sangre, el cual es un procedimiento habitual para valorar el control de su Diabetes tipo 1. El ultrasonido implica tener la vejiga llena, por lo que deberá de tomar 1.5L de agua antes de realizar el mismo.
Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:	Se diagnosticará o descartará oportunamente síndrome de ovario poliquístico. En caso de tener cumplir con criterios para el diagnóstico se le otorgará orientación sobre las consecuencias cardiometabólicas y reproductivas que implica, ofertando tratamiento individualizado según los proyectos de cada paciente.
Información sobre resultados y alternativas de tratamiento:	Los resultados se le informarán a la paciente en caso de deseárselo en sus visitas posteriores.
Participación o retiro:	La participación es voluntaria, puede retirar su consentimiento en cualquier momento sin que esto le provoque alguna sanción o discriminación por parte del personal participante.
Privacidad y confidencialidad:	Sus datos personales solo los conocerán los investigadores principales, los cuales serán protegidos en caso de publicación de los resultados, para lo cual se otorgará un Folio que la identificará para no utilizar sus datos personales. Solamente los investigadores principales podrán contactarla por la vía que usted indique, y estrictamente en caso necesario. Del mismo modo, usted puede contactar a los investigadores en caso de cualquier duda sobre el protocolo.
Declaración de consentimiento: Después de haber leído y habiéndose explicado todas mis dudas acerca de este estudio:	
<input type="checkbox"/>	No acepto participar en el estudio.
<input type="checkbox"/>	Si acepto participar y que se tome la muestra solo para este estudio.
<input type="checkbox"/>	Si acepto participar y que se tome la muestra para este estudios y estudios futuros, conservando su sangre hasta por ____ años tras lo cual se destruirá la misma.



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:

Investigadora o Investigador Responsable:

Dra. Claudia Ramírez Rentería

Colaboradores:

Dr. Manuel Ramón García Sáenz / Dr. Aldo Ferreira Hermosillo

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comité Local de Ética de Investigación en Salud del CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores. México, D.F., CP 06720. Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, correo electrónico: comité.eticainv@imss.gob.mx

Nombre y firma del participante

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

Testigo 1

Testigo 2

Nombre, dirección, relación y firma

Nombre, dirección, relación y firma

Este formato constituye una guía que deberá completarse de acuerdo con las características propias de cada protocolo de investigación, sin omitir información relevante del estudio.

Clave: 2810-009-013

23. ANEXO 2

Hospital de Especialidades "Dr. Bernardo Sepúlveda" CMN Siglo XXI, IMSS
Prestaciones médicas CMN Siglo XXI, IMSS
Hoja de Captura de datos

1. Datos Generales:

Nombre _____ NSS _____
Folio _____ Teléfono _____ Edad _____

2. Información de Diabetes tipo 1:

Diagnóstico de Diabetes tipo 1: < 5 años 5-10 años > 15 años

Tratamiento Actual:

Insulina, tipo y dosis total al día (Especificar esquema basal-bolo)

 iDPP4 Biguanida aGLP-1
 iSGLT2

(En caso de ser usuaria de bomba de insulina especificar dosis)

3. Control de Diabetes:

HbA_{1C} _____ Glucosa Ayuno _____ HDL _____ Col Total _____ LDL _____
Trigl _____ Hipertensión: Si No

4. Comorbilidades:

Si No Falla Ovárica Addison
 Hipertensión Hipotiroidismo
 Obesidad Otra: _____

5. Antecedentes Gineco-Obstétrica:

G: ___ A: ___ P: ___ C: ___ E: ___ Ciclos Menstruales: Regulares Amenorrea
FUP: _____ Oligo-amenorrea

6. Exploración Física: Evaluador 1

Peso: _____ Talla _____ IMC _____ C-cin _____ C-cad _____ TA _____
Labios: _____ Barbilla: _____ Tórax: _____ Ab. Sup: _____
Ferriman-Gallwey : Ab. Inf: _____ Brazos: _____ Pierna: _____ Esp Alta: _____
Total: _____ Esp Inf: _____

7. Laboratorios:

Requirio uso de Medroxiprogesterona para inducción de la menstruación Si No
FSH: _____ LH: _____ E2: _____
TT: _____ TSH: _____ T4L: _____ PRL: _____ 17-HOP: _____
TNF- α : _____ IL-6: _____ IL-1: _____

8. Ultrasonido Pélvico: Evaluador 1

Folículos Ovario Izquierdo _____ Dimensiones Ovario Izquierdo: _____ Vol _____
Folículos Ovario Derecho: _____ Dimensiones Ovario Derecho: _____ Vol _____

Perfil de citocinas PROINFLAMATORIAS (TNF- α , il-6, il-1) ASOCIADO A SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO EN ADULTOS
que viven CON DIABETES TIPO 1

Hospital de Especialidades "Dr. Bernardo Sepúlveda" CMN Siglo XXI, IMSS
Prestaciones médicas CMN Siglo XXI, IMSS
Hoja de Captura de datos

9. Conclusión Evaluador 1:

Síndrome de Ovario Poliquístico: Si
 No

Fenotipos: 1
 2
 3
 4

Componentes:

- Hiperandrogenemia Clínica o Bioquímica
- Hirsutismo (Ferriman-Gallwey >8pts)
- Oligo-amenorrea
- Morfología Poliquistosis Ovárica

10. Exploración Física: 2do Evaluador

Peso: _____ Talla _____ IMC _____ C-cin _____ C-cad _____ TA _____
 Labios: _____ Barbilla: _____ Tórax: _____ Ab. Sup: _____
 Ferriman-Gallwey : _____ Ab. Inf: _____ Brazos: _____ Pierna: _____ Esp Alta: _____
 Total: _____ Esp Inf: _____

11. Ultrasonido Pélvico: 2da evaluación

Folículos Ovario Izquierdo _____ Dimensiones Ovario Izquierdo: _____ Vol _____
 Folículos Ovario Derecho: _____ Dimensiones Ovario Derecho: _____ Vol _____

12. De acuerdo a los datos del segundo evaluador:

Síndrome de Ovario Poliquístico: Si
 No

Fenotipos: 1
 2
 3
 4

Componentes:

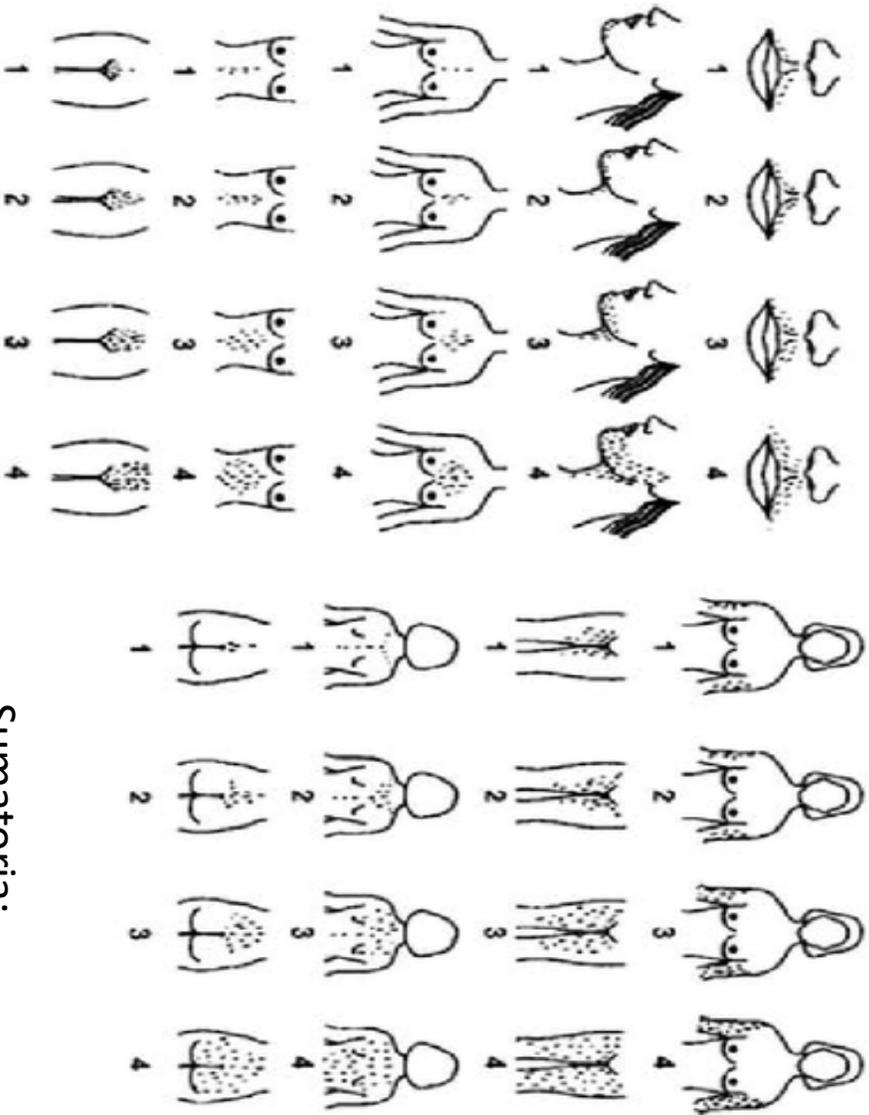
- Hiperandrogenemia
- Hirsutismo (Ferriman-Gallwey >8pts)
- Oligo-amenorrea
- Morfología Poliquistosis Ovárica

Perfil de citocinas PROINFLAMATORIAS (TNF- α , il-6, il-1) ASOCIADO A SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO EN ADULTOS
que viven CON DIABETES TIPO 1

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
 PRESTACIONES MÉDICAS, CMN SIGLO XXI
 HOSPITAL ESPECIALIDADES "Dr. Bernardo Sepúlveda"
 Anexo 2. Puntaje Hirsutismo "Ferriman-Gallwey"

Folio:

Evaluador:



Marque con una X el
 puntaje acorde a la
 exploración física

Sumatoria:

