

## Protocolo del Ensayo Clínico

Título: “ Ensayo clínico prospectivo, abierto, aleatorizado, con dos grupos de pacientes para evaluar la eficacia y la seguridad de la combinación de Etinil-estradiol y levonorgestrel versus la combinación de pioglitazona, espironolactona y metformina a dosis bajas en adolescentes con hiperandrogenismo ovárico e hiperinsulinismo: efectos sobre la función ovulatoria, parámetros de inflamación crónica, marcadores de evolución y efectividad del tratamiento, y de desarrollo de diabetes tipo 2.”

Código del Protocolo: FSJD-PIOSPIMET-2015

Nº EudraCT: 2015-005092-24

Fase del Estudio: IV

Versión 2.0

Fecha de vigencia: 31/08/2018

**Promotor:**

FUNDACIÓ SANT JOAN DE DÉU  
C/ Santa Rosa 39-57  
3ª Planta Edificio Docente  
08950 - Esplugues de Llobregat (Barcelona)

**Investigador/a principal:**

Dra. Lourdes Ibáñez Toda  
Servicio de Endocrinología  
Hospital de Sant Joan de Déu Barcelona  
Pº. Sant Joan de Déu nº 2  
08950 Esplugues de Llobregat  
Barcelona  
Tel.: 93 253 21 00, ext. 4424  
Fax: 93 203 39 59

**CONFIDENCIAL** La información y los datos incluidos en este protocolo contienen información privilegiada o confidencial que es propiedad de los autores. Ninguna persona está autorizada a hacer pública esta información sin el permiso por escrito del Autor principal. Estas limitaciones se aplicarán, igualmente, a toda la información considerada como privilegiada o confidencial que se le facilite en el futuro. Este material podrá ser divulgado y utilizado por su equipo y colaboradores, según sea necesario para la realización del estudio clínico.

## 1. Resumen

### 1.1 Tipo de solicitud.

Solicitud de Ensayo Clínico unicéntrico en Fase IV en nuevas indicaciones, prospectivo, abierto, aleatorio, con dos ramas paralelas, una de ellas en tratamiento experimental con la siguiente combinación de fármacos pioglitazona, espironolactona, metformina a dosis bajas y la otra, bajo tratamiento control con etinil-estradiol más levonorgestrel. Todas las pacientes serán adolescentes (de 12 a 18 años) afectas de hiperandrogenismo ovárico e hiperinsulinismo, sin riesgo de embarazo y predispuestas a padecer un síndrome metabólico, una alteración de la distribución de la grasa corporal y modificación consecutiva de marcadores endocrino-metabólicos, por reunir las características que se definen en los criterios de inclusión. Se desea comparar ambos tratamientos y averiguar si el tratamiento con la combinación de estos fármacos pioglitazona, espironolactona, metformina a dosis bajas es capaz de revertir las alteraciones mencionadas en un tratamiento de 18 meses y 6 meses más de seguimiento posterior sin tratamiento, mientras se evalúan los resultados.

Este estudio se corresponde con la convocatoria para la evaluación de tecnologías sanitarias del Instituto de Salud Carlos III y ha recibido una dotación para poder ser llevado a cabo.

### 1.2 Identificación del promotor:

El Promotor de este ensayo clínico es la FUNDACIÓ SANT JOAN DE DÉU (en adelante denominado el PROMOTOR)

C/ Santa Rosa 39-57  
3ª Planta Edificio Docente  
08950 - Esplugues de Llobregat (Barcelona)

### Título del ensayo clínico:

“Ensayo clínico prospectivo, abierto, aleatorizado, con dos grupos de pacientes para evaluar la eficacia y la seguridad de la combinación de Etilnil-estradiol y levonorgestrel versus la combinación de pioglitazona, espironolactona y metformina a dosis bajas en adolescentes con hiperandrogenismo ovárico e hiperinsulinismo: efectos sobre la función ovulatoria, parámetros de inflamación crónica, marcadores de evolución y efectividad del tratamiento, y de desarrollo de diabetes tipo 2”.

### 1.3 Código del protocolo y número EudraCT:

Código del Protocolo: FSJD-PIOSPIMET-2015  
Nº EudraCT: 2015-005092-24 Fase del Estudio: IV  
Versión 2.0  
Fecha de vigencia: 31/08/2018

### 1.4 Persona de contacto del Promotor:

Dña. Rosa María Morales Palau  
Unidad de Ensayos Clínicos, Fundació per la Recerca i la Docència Sant Joan de Déu  
Planta 0 Consultes Externes  
08950 Esplugues de Llobregat · Barcelona  
08950 Esplugues de Llobregat (Barcelona)  
Tél: 93 600 97 33 / Fax: 93 600 97 68

#### Solicitante:

Dña. Lidya Dominguez Burgo  
SERMES-CRO  
C/ Rufino González 14 2º Dcha, 28037 Madrid  
Tél: 91 375 69 30 / FAX: 91 375 69 31

### 1.5 Investigador principal

El investigador principal es la Dra. Lourdes Ibáñez Toda  
Servicio de Endocrinología  
Hospital de San Juan de Dios Barcelona  
P. Sant Joan de Déu nº 2  
08950 Esplugues de Llobregat  
Barcelona  
Tel.: 93 253 21 00, ext.4424  
Fax: 93 203 39 59  
e-mail: libanez@hsjdbcn.org

### 1.6 Centros de Realización

#### Desarrollo Clínico

El desarrollo clínico de este ensayo se llevará a cabo de forma unicéntrica en:  
Hospital de Sant Joan de Déu de Barcelona.

Actuará como coordinador/a y de referencia:

Investigador/a principal: Dra. Lourdes Ibáñez Toda  
Servicio de Endocrinología pediátrica  
Hospital de Sant Joan de Déu de Barcelona  
P. Sant Joan de Déu nº 2  
08950 Esplugues de Llobregat  
Barcelona  
Tel.: 93 253 21 00, ext.4424  
Fax: 93 203 39 59  
e-mail: libanez@hsjdbcn.org

Colaborará en el reclutamiento el Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital San Joan de Déu, bajo la supervisión de la Dra. Cristina Salvador. También colaborará el Servicio de Radiología del Hospital Sant Joan de Déu y CETIR Centre Mèdic Barcelona, concretamente el Dr. Luis del Río.

El profesor Francesc Villarroya, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Barcelona e IP de CIBEROBN, asesorará al equipo investigador en los estudios de expresión en tejido adiposo. El Profesor Francis de Zegher, de la Universidad de Lovaina, asesorará al equipo investigador en el análisis e interpretación de datos y en la elaboración de futuros manuscritos.

Los demás detalles de los centros participantes se describen en el anexo I “Centros e investigadores participantes” que se adjunta a este protocolo.

Los análisis clínicos generales y las exploraciones complementarias se efectuarán en los servicios de Laboratorio del Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona. Las muestras de saliva, fecales y el tejido adiposo subcutáneo se almacenarán en el Laboratorio de Investigación de la Fundación Sant Joan de Déu, donde se realizarán los estudios de polimorfismos de *DENND1A* en sangre periférica y de expresión génica en TAB. Los estudio de miRNAs se realizarán entre el Laboratorio de Investigación de la Fundación Sant Joan de Déu y la empresa Bioarray SL (Alicante). El estudio del microbioma se realiza por ASCIDEA SL (Barcelona). En los casos en que sea necesaria la colaboración de centros externos se recogerá en el anexo I “Centros participantes y colaboradores” que se adjunta a este protocolo.

En adelante cualquier modificación del número de centros participantes o colaboradores y de sus características deberá referirse al mencionado anexo I.

### 1.7 Comité Ético de Investigación Clínica.

Se solicitará la aprobación como Comité de Referencia del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital de Sant Joan de Déu de Barcelona.

La dirección a la cual dirigir toda la correspondencia de este ensayo como CEIC de referencia es:

CEIC Fundacio Sant Joan de Déu C/ Santa Rosa, 39-57, 3º planta  
08950 Esplugues de Llobregat  
Barcelona  
Tel.: 93 600 97 51  
Fax 93 600 97 71  
e-mail: ceic@fsjd.org

### 1.8 Nombre y calificación de la persona responsable de la monitorización y la farmacovigilancia

El monitor designado para el proyecto pertenecerá a:

SERMES-CRO  
C/ Rufino González 14 2º Dcha, 28037 Madrid  
Tél: 91 375 69 30 / FAX: 91 754 27 21

La farmacovigilancia del proyecto será realizada por SERMES-CRO, siendo la responsable de notificación de RAGIs:

Vicente MorenoSERMES CRO  
Director /Responsable de la Unidad de Farmacovigilancia  
e-mail: farmacovigilancia@sermescro.com

### 1.9 Laboratorios clínicos y Departamentos médicos o técnicos o instituciones implicadas en el Ensayo Clínico. Idoneidad de las Instalaciones.

Los análisis clínicos generales y las exploraciones complementarias se efectuarán en el Laboratorio del Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona. En los casos en que sea necesaria la colaboración de centros externos, se reflejará en el anexo I “Centros participantes y colaboradores” que se adjunta a este protocolo.

La Sección de Endocrinología (6 despachos), y el Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Sant Joan de Déu, suponen un marco físico apropiado para la captación y recepción de pacientes, así como para la realización de las visitas clínicas, las exploraciones de imagen (ecografía) y la biopsia del tejido adiposo. El grupo posee su propio laboratorio “Laboratorio de Endocrinología” ubicado en la 4ª planta del edificio

docente, con un área de 60 m<sup>2</sup>. El laboratorio está equipado con los recursos tecnológicos necesarios para realizar las determinaciones bioquímicas y genéticas (nanodrop, espectrofotómetro para la lectura de placas, fluorímetro, cubetas de electroforesis, fuentes de alimentación, termomixer, agitadores, congelador -20 ° (1) y -80 °C (2) equipados con sondas de registro y monitorización de la temperatura y conectados a un sistema de alarma, y PCR a tiempo real necesario para los estudios de expresión génica y genotipado. Asimismo, contamos con instrumentos de uso común entre los diferentes grupos de investigación situados en la 3ª y 4ª planta del edificio docente: cabina de flujo laminar, centrífugas, ultracentrífuga, transiluminador, sistema Kodak para la captación y análisis de imágenes, horno de hibridación, máquinas de PCR, cámara fría, cámara oscura, liofilizador, salas de cultivo celular, autoclave, agua milli-Q, baños, máquina de hielo, nitrógeno líquido, vórtex y neveras). También disponemos de la colaboración del laboratorio a tiempo real del Hospital Sant Joan de Déu para la determinación de parámetros hormonales.

El centro Médico CETIR dispone de los medios necesarios (densitómetros y aparatos de resonancia magnética acoplados a un software específico) para los estudios de composición corporal y distribución de grasa abdominal. Los investigadores cuentan con un ecógrafo de alta resolución y las sondas de transducción necesaria para la realización de ecografías de carótida y abdominales.

Bioarray SL es una empresa especializada en el análisis genético mediante secuenciación masiva y microarrays. Contrataremos su servicio para la hibridación de los miRNAs y su posterior análisis bioinformático.

Ascidea es una compañía especialistas en Genómica. Contrataremos su servicio para el estudio de Microbioma que requiere un análisis metagenómico y bioinformático posterior.

El investigador principal y tres de los investigadores colaboradores son miembros del Centro de Investigación Biomédica en Red CIBERDEM, lo que garantiza la posibilidad de acceso a técnicas más sofisticadas en el caso que fuera necesario, para poder llevar a cabo los objetivos planteados.

Los demás detalles de los centros participantes se describen en el anexo I “Centros e investigadores participantes” que se adjunta a este protocolo.

En adelante cualquier modificación del número de centros participantes o colaboradores y de sus características deberá referirse al mencionado anexo I.

## 1.10 Fármacos experimentales y control

### 1.10.1 Fármacos Experimentales:

El tratamiento experimental consistirá en la asociación de Pioglitazona, Espironolactona y Metformina (Abreviadamente PioSpiMet) que se administrará en forma de comprimidos comerciales de los siguientes productos:

- Metformina Sandoz®; comprimidos; composición cualitativa y cuantitativa: clorhidrato de metformina, 850 mg. Excipientes, c.s.p. Elaboración: Laboratorios Sandoz. Dosis: 850 mg/día.
- Aldactone Pfizer®; comprimidos; composición cualitativa y cuantitativa: espirolactona, 100 mg. Excipientes: Núcleo: sulfato de calcio dihidratado, almidón de maíz sin gluten, polividona K-30, aroma de menta, estearato de magnesio. Cubierta: hidroxipropilmetilcelulosa 2910, 5 cps; hidroxipropilmetilcelulosa 2910, 15 cps; polietilenglicol 400; opaspray M-1-7111 B (blanco). Elaboración: Laboratorios Pfizer. Dosis: 50 mg/día.
- Pioglitazona Cinfa®; comprimidos; composición cualitativa y cuantitativa: clorhidrato de pioglitazona, 15 mg. Excipientes, carmelosa de calcio, hidroxipropil celulosa, lactosa monohidrato, estearato de magnesio. Entidad elaboradora: Laboratorios Cinfa. Dosis: 7,5 mg/día.

En el anexo VII a este protocolo se adjuntan las fichas técnicas correspondientes, como “Descripción Técnica de los Productos de Ensayo”.

#### **1.10.2 Fármacos de Control:**

El tratamiento de control consistirá en:

- Loette Diario®; comprimidos; composición cualitativa y cuantitativa: EE, 20 µg; LNG, 100 µg. Dosis: 1 comp/día. Laboratorio: Wyeth Farma, S.A.

Ambos productos figuran asociados en comprimidos en un mismo preparado comercial para la administración en una sola toma diaria.

En el anexo VII a este protocolo se adjunta la ficha técnica correspondiente, como “Descripción Técnica de los Productos de Ensayo”.

#### **1.11 Fase del Ensayo Clínico:**

Se trata de un ensayo en Fase IV con medicamentos que se utilizarán en condiciones de uso distintas a las autorizadas. El protocolo supone la ampliación de un estudio piloto (FSJD-PioSpiMet-2012; EudraCT 2012-004100-35; <http://www.controlled-trials.com/ISRCTN29234515>), cuyos resultados preliminares han permitido establecer los objetivos. En este estudio en el que se propone un nuevo tratamiento para el hiperandrogenismo ovárico de las adolescentes con productos ya comercializados, en una nueva indicación para los

fármacos en estudio especialmente para uso pediátrico, como prueba piloto comparativa con el tratamiento convencionalmente utilizado, para aportar datos que ayuden a encontrar un tratamiento optimizado.

### 1.12 Objetivos:

1. Determinar los beneficios del tratamiento a dosis bajas con PioSpiMet (Pioglitazona+Espironolactona+Metformina) vs EE-LNG (etinil-estradiol+levonorgestrel) en adolescentes hiperandrogénicas sin riesgo de embarazo sobre: a) la ciclicidad menstrual y la ovulación; b) la sensibilidad a la insulina [insulinemia, lípidos, adipoquinas, resistencia a la insulina en tejido adiposo (IRA)], la cIMT (grosor íntima carotídea), la grasa visceral y hepática. Evaluar si los beneficios de PioSpiMet se mantienen al suspender el tratamiento y si se produce una regresión a la situación basal después de EE-LNG.

1. Caracterizar el perfil de miRNAs circulantes, del microbioma intestinal, la LTL (longitud telomérica en leucocitos) y la AT (actividad telomerasa) en pacientes y controles. Determinar los cambios longitudinales en los parámetros mencionados en las pacientes después PioSpiMet o EE-LNG, posibilitando la identificación de marcadores de evolución de la patología y de efectividad del tratamiento. Correlacionar los miRNAs diferencialmente expresados, y los cambios en el microbioma intestinal y en la LTL con cambios antropométricos, de biomarcadores de resistencia a la insulina y adipogénesis (adipoquinas), de marcadores cardiovasculares (cIMT) y de distribución de grasa abdominal (visceral y hepática). Analizar si los cambios en la LTL persisten después del tratamiento.

3. Determinar si los polimorfismos de *DENND1A* en sangre periférica difieren en pacientes y controles. Estudiar además los cambios longitudinales en la expresión en tejido adiposo blanco subcutáneo de genes de inflamación y de acción de la insulina, después del tratamiento con PioSpiMet o EE-LNG

### 1.13 Diseño del Estudio:

Se trata de un ensayo en Fase IV, con productos en una nueva indicación para los fármacos en estudio, especialmente para uso pediátrico y por tanto distinta a las autorizadas, en asociación: pioglitazona, espirolactona, metformina (PioSpiMet), comparada con el tratamiento convencional compuesto por etinil-estradiol y levonorgestrel.

El ensayo clínico es prospectivo, abierto, aleatorizado, con dos grupos paralelos de pacientes, para dilucidar qué tratamiento es el más ventajoso para el hiperandrogenismo ovárico e hiperinsulinismo de las adolescentes sin riesgo de embarazo. Se establece también un grupo control (n=12) de IMC y edad similar, sin evidencia de hiperandrogenismo (no hirsutas, ciclos regulares) reclutadas entre las compañeras de clase de las pacientes.

Los parámetros que se comparan en el presente estudio para evaluar la eficacia de los tratamientos en los grupos de pacientes son: ciclicidad menstrual y ovulación, sensibilidad a la insulina, grosor de la íntima carotídea, grasa visceral y hepática, caracterización del perfil de miRNAs circulantes, microbioma intestinal, LTL y actividad telomerasa. Se pretenden identificar marcadores de la progresión o eficacia de los tratamientos, correlacionar las diferencias de expresión de los miRNAs, cambios del microbioma y del LTL con antropometría, biomarcadores de resistencia a la insulina y adipogénesis, grosor de la íntima carotídea y distribución de grasa abdominal. Por último, se analizarán si los polimorfismos de *DENND1A* en sangre periférica difieren en los dos grupos de tratamiento. Se estudian cambios en la expresión de genes de inflamación y acción de la insulina en tejido adiposo subcutáneo.

En el punto 1.20 se adjunta un esquema del ensayo.

El grupo de tratamiento 1 (n=20) recibirá pioglitazona, espirolactona, metformina (PioSpiMet); el grupo de tratamiento 2 (n=20) recibirá tratamiento con un anticonceptivo oral conteniendo etinil-estradiol y levonorgestrel (EE-LNG). La aleatorización la realizará un investigador independiente mediante el programa: <http://www.sealedenvelope.com>, y será controlada por edad e índice de masa corporal (IMC). El grupo control no recibe tratamiento y está compuesto de sujetos sanos.

#### 1.14 Patología del Estudio.

El hiperandrogenismo ovárico—o síndrome del ovario poliquístico (SOP)— es la causa más frecuente de exceso de andrógenos en adolescentes y mujeres jóvenes, afectando aproximadamente al 5-7% de la población femenina en edad reproductiva (1,2). En adolescentes, se prefiere utilizar el término de hiperandrogenismo ovárico con hiperinsulinismo en lugar del término clásico síndrome de ovario poliquístico por varias razones: 1) el National Institutes of Health (NIH) recomienda otra terminología, porque la denominación clásica se basa en la morfología de ovario poliquístico, que no es un criterio diagnóstico necesario (3); 2) ninguna de las definiciones del SOP se ha validado en adolescentes (2); 3) el SOP se asocia clásicamente a obesidad, mientras que en adolescentes ocurre sin obesidad (4,5). El hiperandrogenismo ovárico se ha considerado tradicionalmente un trastorno primario del ovario (6). Consecuentemente, el tratamiento más recomendado son los anticonceptivos orales (ACOs), que revierten las alteraciones cosméticas, y determinan ciclos regulares anovulatorios. Este tratamiento se recomienda en adolescentes muy jóvenes -incluso premenárrquicas- sin riesgo de embarazo (4,7). Actualmente, se considera que el hiperandrogenismo ovárico puede ser consecuencia de la hipertrofia del tejido adiposo blanco subcutáneo (TABsc), y de las alteraciones metabólicas derivadas (2,8,9). Este concepto explicaría las morbilidades a medio y largo plazo, como la intolerancia a la glucosa, la diabetes tipo 2, la enfermedad cardiovascular, y la subfertilidad (10-12). Por consiguiente, las estrategias terapéuticas actuales deben dirigirse no sólo a revertir las alteraciones cosméticas sino también a reducir el riesgo de padecer estas complicaciones.

#### Hiperandrogenismo ovárico, riesgo cardiometabólico y diabetes tipo 2

La resistencia a la insulina se asocia con frecuencia al hiperandrogenismo ovárico, incluso en ausencia de obesidad (13). Se acompaña de un descenso de las concentraciones de proteína transportadora de las hormonas sexuales [sex hormone binding globulin (SHBG)] y de un perfil lipídico aterogénico. La dislipemia y el hiperinsulinismo, a su vez, se asocian a un patrón anómalo de adipoquinas -proteínas producidas por el tejido adiposo-, específicamente a una disminución de adiponectina de alto peso molecular (HMW-adip), con acción anti-inflamatoria y anti-diabetogénica (14). En estudios poblacionales, este patrón de adipoquinas se ha asociado a resistencia a la insulina, y mayor prevalencia de diabetes tipo 2 y riesgo cardiovascular (15). El hiperandrogenismo ovárico se asocia también a aumento de marcadores de inflamación, como la proteína C-reactiva ultrasensible (PCRus). La elevación de PCRus es independiente de la obesidad, siendo mucho más fiable que otros marcadores pro-inflamatorios como el tumor necrosis factor- (TNF) y la interleuquina 6 (IL-6). En población general, incrementos de PCRus dentro del rango normal se asocian a disfunción endotelial y arteriosclerosis subclínica en pacientes asintomáticos (16).

El factor preadipocitario tipo 1 (Pref-1) es un inhibidor de la diferenciación de adipocitos; el aumento de Pref-1 se han asociado a menor TABsc y a riesgo metabólico (17). La disregulación del TABsc se puede estimar calculando del índice de resistencia a la insulina en tejido adiposo (IRA), cuyo aumento se asocia a concentraciones bajas de HMW-adip (18).

Las mujeres hiperandrogénicas tienen más adiposidad visceral y hepática (2,19,20). El aumento de grasa visceral favorece la síntesis de adipoquinas pro-inflamatorias, y el acúmulo de macrófagos, que determinan resistencia a la insulina, aumento de PCRus, y mayor producción de ácidos grasos libres (FFA), que empeoran el perfil metabólico y aumentan el riesgo cardiovascular (19,21).

El grosor de la íntima carotídea (cIMT) es un marcador establecido y no invasivo de riesgo cardiovascular (22). La cIMT está aumentada en adolescentes hiperandrogénicas y está directamente relacionada con las concentraciones de PCRus, la resistencia a la insulina y otros componentes del síndrome metabólico (2,19). En mujeres jóvenes obesas con hiperandrogenismo ovárico, la prevalencia de arteriosclerosis coronaria subclínica es 5 veces superior a la de la población general (23).

La teoría de la hipertrofia del TABsc permite englobar el conjunto de alteraciones descritas en un solo mecanismo fisiopatológico (2,8,9,24). El TABsc permite almacenar el aporte energético sin consecuencias metabólicas negativas. La dotación de adipocitos subcutáneos del TABsc es distinta en cada individuo, se establece fundamentalmente durante la vida prenatal, y está co-determinada por factores genéticos y epigenéticos (2,9). En caso de balance energético positivo continuo, el exceso de aporte calórico determina una hipertrofia compensadora de los adipocitos subcutáneos, intentando almacenar el exceso de calorías. El agotamiento de la capacidad de almacenamiento determina lipotoxicidad, aumento de FFA y triglicéridos, un patrón anómalo de adipoquinas, resistencia a la insulina e hiperinsulinismo, inflamación (aumento de PCRus) y depósito ectópico de lípidos en hígado, músculo y páncreas (2,8,9). El hiperinsulinismo estimula la síntesis directa e indirecta (mediada por LH) de andrógenos (2,25). Ésto explicaría la presencia de resistencia a la insulina sin obesidad, por ejemplo, en pacientes con bajo peso al nacer (y menor dotación de adipocitos subcutáneos) y recuperación postnatal rápida y exagerada de peso (2). Asimismo, las mujeres hiperandrogénicas presentan adipocitos subcutáneos

hipertróficos, comparadas con las normoandrogénicas, que se correlaciona con las concentraciones de adiponectina, testosterona y SHBG, y la resistencia a la insulina (26).

### Hiperandrogenismo ovárico, genética y epigenética

#### 1. Perfil de miRNAs circulantes

Los miRNAs son RNAs pequeños (17-25 nucleótidos) no codificantes, muy abundantes en suero. Están implicados en la regulación de procesos biológicos y patológicos, incluyendo cáncer y diabetes (27). Estudios transversales demuestran la presencia de miRNAs diferencialmente expresados en mujeres hiperandrogénicas, sugiriendo que estarían implicados en el desarrollo de resistencia a la insulina y obesidad (28), y podrían ser biomarcadores diagnósticos (29). Sin embargo, estos estudios se han realizado exclusivamente en adultas y en poblaciones muy heterogéneas (con distintos fenotipos clínicos), lo que imposibilita sacar conclusiones válidas.

#### 2. Microbioma intestinal

El microbioma es el conjunto de microorganismos que se localizan en el intestino y presentan una relación simbiótica con el huésped. Estudios en animales de experimentación (germ-free) apoyan el concepto de disbiosis (alteración de la composición microbiana del intestino), asociada con patologías como obesidad y diabetes (30). Se ha postulado que la alteración de la flora intestinal podría constituir uno de los mecanismos fisiopatológicos del hiperandrogenismo ovárico (31); pero no se ha caracterizado el perfil de “normalidad” ni en adolescentes sanas, ni en adolescentes con hiperandrogenismo ovárico, y se desconoce qué efectos produce el tratamiento con ACOs o con sensibilizantes a la insulina + antiandrogénos sobre el microbioma.

#### 3. Longitud telomérica y actividad telomerasa

Los telómeros -situados en los extremos de los cromosomas- están compuestos por repeticiones en tándem TTAGGG. Durante la división celular, el extremo final del telómero no es copiado, y sufre acortamiento progresivo; al alcanzar una longitud crítica la célula entra en senescencia. Las células germinales y ciertas células madre tienen una telomerasa activa que alarga los telómeros tras cada ciclo de división, determinando una capacidad ilimitada para dividirse. Los telómeros cortos se han asociado con cáncer, CVD y diabetes (32,33). En un estudio transversal, el hiperandrogenismo ovárico se ha asociado a menor longitud telomérica en leucocitos (LTL) (34); estudios longitudinales piloto en adolescentes indican que la terapia combinada con pioglitazona, flutamida y metformina (PioFluMet) incrementa de modo reversible la LTL (35).

#### 4. Polimorfismos en el gen *DENNDIA*

El gen *DENNDIA* codifica una proteína que actúa como factor intercambiador del nucleótido guanina (GEFs) para RAB35, GTPasa endosomal, implicada en procesos de endocitosis. *DENNDIA* es un gen candidato en el hiperandrogenismo ovárico y en el control de la esteroidogénesis tecal (36). Varios polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) se han asociado a hiperandrogenismo ovárico (37,38). Sin embargo, existe gran divergencia en los resultados dependiendo de la población estudiada, y no se han realizado estudios en pacientes hiperandrogénicas con homogeneidad fenotípica procedentes de la región mediterránea.

#### 5. Expresión de genes relacionados con inflamación y acción de la insulina en TABsc.

Los estudios de expresión génica en TABsc y visceral en mujeres hiperandrogénicas indican una disregulación de cascadas relacionadas con la acción de la insulina, adipogénesis, e inflamación,

entre otras (39). En un estudio longitudinal en adolescentes con hiperandrogenismo ovárico, la terapia con un ACO que contiene etinil-estradiol (EE, 35 mcg) + acetato de ciproterona (AC, 5 mg), aumentó la expresión en TABsc de genes pro-inflamatorios y de activación de macrófagos, en relación a la expresión basal, y comparado con la terapia con PioFluMet (40). No existen estudios que comparen los efectos de combinaciones de sensibilizantes de la insulina + antiandrógenos con la de ACOs con menor dosis de estrógenos y progestágenos de escasa trombogénicidad.

*Ver apartado 20.1 Bibliografía General ( Antecedentes y Estado Actual del Tema)*

### **1.15 Tipo de población en estudio y número total de pacientes**

Se incluirán un total de 40 pacientes adolescentes, de 12 años a 18 años de edad, postmenárquicas en al menos 2 años, previamente controladas en la Sección de Endocrinología o en el Servicio de Ginecología del Hospital St. Joan de Déu de Barcelona, y diagnosticadas de hiperandrogenismo ovárico e hiperinsulinismo y sin riesgo de embarazo.

Se incluye también un grupo control de 12 sujetos con IMC y edad similar, sin evidencia de hiperandrogenismo (no hirsutas, ciclos regulares) reclutadas entre las compañeras de clase de las pacientes.

### **1.16 Selección de los pacientes**

Las pacientes se seleccionarán en el área de influencia del hospital participante, en Consultas Externas de Endocrinología y Ginecología, cuando sean remitidas a consulta por hallarse afectas de síntomas y signos compatibles con hiperandrogenismo e hiperinsulinismo, específicamente: hirsutismo y/o acné, y trastornos menstruales (oligomenorrea/amenorrea). Para el diagnóstico de hiperandrogenismo se requerirá la existencia de cifras elevadas de testosterona total (>60 ng/dL) y/o de un índice de andrógenos libre elevado (>5) (1), y/o de concentraciones elevadas de androstendiona (>160 ng/dL). Para el diagnóstico de hiperinsulinismo se requerirá la existencia de cifras basales elevadas de insulina (>15  $\mu$ U/mL), de un cociente glucosa/insulina basal <7, o de un pico de insulina > 100  $\mu$ U/mL en respuesta a una sobrecarga oral de glucosa estándar (75 gr) (1). Una vez confirmada la presencia de esta patología se informará a la paciente de los pasos y pruebas necesarios para verificar el diagnóstico. Se asegurará la ausencia de riesgo de embarazo durante el estudio.

En caso de que se confirme el diagnóstico se informará a la paciente y a sus familiares o responsables, de las posibilidades terapéuticas así como de la posibilidad de participar en este ensayo. Si la paciente aceptase participar se procederá a la firma de las hojas de consentimiento y a los trámites legales (comunicación al Ministerio Fiscal). Las adolescentes control serán compañeras de clase de las pacientes que aportarán ellas mismas; se reclutarán en distintas escuelas. Se abrirá historia clínica en el HSJD, se les explicará los objetivos del estudio (también a los padres/tutores legales) y se obtendrá el consentimiento informado.

La información facilitada así como el protocolo del ensayo, habrá sido aprobada previamente por el CEIC y por la AEMPS.

### 1.16.1 Criterios de inclusión y de exclusión

*Criterios de inclusión de las pacientes (deben cumplir todos los criterios):*

Deben cumplirse todos los siguientes criterios:

- 1) Edad igual o superior a los 12 años e inferior a los 18 años (4)
- 2) Menarquia al menos 2 años antes
- 3) Índice de masa corporal (IMC) inferior al percentil 97 y superior al percentil 10 para la edad (5)
- 4) Hiperandrogenismo clínico:
  - a) Hirsutismo y/o acné
  - b) Oligomenorrea o amenorrea
- Y Hiperandrogenismo bioquímico:
  - a) Testosterona total > 60ng/dL y/o índice de andrógenos libres (IAL) > 5
  - b) Androstendiona > 160 ng/Dl (1)
- 5) Hiperinsulinismo:
  - a) Insulina basal > 15  $\mu$ U/mL
  - b) Cociente glucosa/insulina <7 ó pico de insulina en el test de tolerancia oral a la glucosa (TTOG) > 100  $\mu$ UmL (1)

*Criterios de exclusión (cualquiera de ellos constituyen la exclusión de los pacientes):*

- 1) Embarazo o riesgo de embarazo
- 2) Hiperplasia suprarrenal congénita por déficit de 21-hidroxilasa
- 3) Hiperprolactinemia
- 4) Síndrome de Cushing
- 5) Hipotiroidismo no controlado
- 6) Alteración hepática, renal, de Creatin-fosfoquinasa (CPK) o de lactato deshidrogenasa (LDH)
- 7) Diabetes o intolerancia a la glucosa (1)
- 8) Alergias cutáneas conocidas
- 9) Tratamiento con antiandrógenos, estro-progestágenos, o fármacos que interfieran con el metabolismo lipídico e hidrocarbonado en los 6 meses previos.
- 10) Infecciones bacterianas conocidas.
- 11) Enfermedad inflamatoria intestinal.

### 1.17 Duración del tratamiento

*Duración del reclutamiento:* 6 meses

*Duración del tratamiento:* 12 meses.

*Duración de la observación post-tratamiento:* 12 meses.

### 1.18 Variables de valoración

- Clínicas: IMC, datos alimentarios y de actividad física (6), tensión arterial, puntuación de Ferriman & Gallwey (7), ciclicidad menstrual.
- Endocrino-metabólicas: glucosa, (método glucosa oxidasa), insulina, HOMA, lípidos (método colorimétrico), TTOG, andrógenos (testosterona total, índice de andrógenos libre [testosterona total (nmol/L)x100/SHBG (nmol/L)], androstendiona, sulfato de dehidroepiandrosterona (DEAS)], SHBG, PCRus [inmunoquimioluminiscencia (INMULITE 2005; Diagnostic Products, Los Angeles, CA)], , adiponectina de alto peso molecular (siglas en inglés- HMW adip), factor preadipocitario tipo 1, índice de resistencia a insulina en tejido adiposo [IRA, insulina basalácidos grasos libres (8) (ELISA específicos) (1, 9). Progesterona salival (12 muestras consecutivas, (ELISA específico) para estudiar la función ovulatoria (10). Las determinaciones de andrógenos, glucosa, insulina y perfil lipídico forman parte del protocolo habitual de seguimiento de pacientes con hiperandrogenismo.
- Composición corporal: absorciometría de doble energía (DXA); densidad y contenido mineral óseo; masa grasa total y abdominal, y masa magra (valores absolutos y porcentaje). Equipo de medición Lunar, modelo Prodigy (versión 12.3, Lunar Corp., Madison, Wisc., USA) (1). Radiación total en cada examen <10 Sievert. Coeficientes de variación (CVs) calculados a partir e 30 exploraciones repetidas de un fantoma de columna de hidroxapatita y resina plástica (Hologic Inc, Waltham, MA, USA): 2,0% y 2,6%, respectivamente, para la masa grasa y magra. CV para medición de la grasa abdominal en 3 exploraciones consecutivas realizadas en 14 sujetos: 0,74%.
- Distribución de la grasa abdominal y grasa hepática: 1) RM: área de grasa subcutánea (SAT), visceral (VAT) y hepática; dispositivo multi-slice 1.5 Tesla (Signa LX Echo Speed Plus Excite, General Electric Healthcare, Milwaukee, WI). Secuencias de 10 mm grosor desde el espacio intervertebral L4-L5 (1). CVs en el análisis por triplicado de 10 mujeres jóvenes en el intervalo de 3 meses (corte único): 7,2 % (SAT) y 8,8% (VAT); 2) Ecografía: Ecógrafo de alta resolución (MyLabTM25, Esaote, Florencia, Italia). Grasa visceral (sonda de 3.5 MHz): distancia entre la superficie interna de la pared abdominal y la pared posterior de la aorta a la altura del ombligo. Grasa subcutánea: grosor del panículo adiposo subcutáneo y preperitoneal (11).
- Vascular: grosor de la íntima carotídea (cIMT, ecografía) Ecógrafo MyLab™ Transductor de 12 MHz. La medición se realizará en diástole 1 cm antes de la bifurcación de ambas carótidas. CV intra-observador <10% (1, 12).

- Marcadores de evolución de la patología y de efectividad del tratamiento que se asociarán con cambios antropométricos, biomarcadores de resistencia a la insulina y adipogénesis, marcadores cardiovasculares y distribución de grasa abdominal:
  - miRNAs en suero: Extracción y purificación de RNA total de suero (incluyendo RNAs pequeños y miRNAs). El RNA íntegro se hibridará al Human miRNA V2 Oligo Microarray (Agilent Technologies; Palo Alto, CA), con 17.737 sondas correspondientes a 723 miRNAs. Los array se escanearán (Agilent G2565BA microarray scanner), se extraerá la información por intensidad de bandas (Agilent Feature Extraction software) y los datos se analizarán con un soporte bioinformático (miRbase) para obtener el perfil de miRNAs de cada muestra (13,14) (Bioarray SL, Alicante). Validación de resultados: Los miRNAs diferencialmente expresados se validarán individualmente por PCR a tiempo real (RT-PCR). Cada miRNAs se amplificará con primers específicos. Controles endógenos: RNU48 y RNU6B para la normalización de los resultados, análisis por cuantificación relativa ( $2^{-\Delta Ct}$ ).
  - Composición del microbioma: Recogida matinal de heces, que se pulverizarán con nitrógeno líquido, alicuotarán y almacenarán a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta procesamiento. Extracción de DNA con “MoBio PowerSoil DNA isolation kit”. Se amplificará la región V4 hipervariable del rRNA 16S (gen específico bacteriano) utilizando primers universales codificados 515F-806R; se secuenciarán los fragmentos amplificados (Illumina MiSeq) y se pre-procesarán utilizando QIIME (15), agrupando las secuencias filtradas en unidades taxonómicas operacionales (OTUs) (16,17) (Ascidea SL, Barcelona).
  - Longitud telomérica en leucocitos (LTL) y actividad telomerasa: extracción de DNA leucocitario de sangre periférica [EDTA con fenol-cloroformo (Promega)]. Determinación de LTL por RT-PCR (18); expresión como cociente T/S [número de repeticiones teloméricas (T) en relación a un gen de copia única (S)]. Amplificación por SYBR Green con primers específicos (Primer 3); el gen RNaseP se usará como gen de copia única, amplificación por taqman. Actividad telomerasa: obtención del “buffy coat” de sangre periférica fresca. Lisado celular y determinación de la actividad telomerasa en extracto celular medida por RT-PCR [Quantitative Telomerase Detection kit (Allied Biotech, Inc)] por tecnología SYBR Green (19). La LTL revertirá a su situación basal al finalizar la intervención.
- Polimorfismos de *DENNDIA* (rs10986105, rs2479106 y rs10818854) en sangre total por discriminación alélica con sondas pre-diseñadas (Life technologies) (20). Expresión génica en tejido adiposo blanco subcutáneo: biopsia tejido adiposo abdominal periumbilical por punción previa anestesia local con EMLA (1, 11); análisis de la expresión de CD163, TWEAK Receptor, ANGPTL4, Adiponectina, PPAR $\gamma$ , Glut-4, LPL, e IL-18 por RT-PCR (12,21).

*Variables principales de valoración:* frecuencia ovulatoria (al menos un ciclo ovulatorio después de PioSpiMet vs ninguno con EE-LNG), sensibilidad a la insulina (HOMA), grasa visceral y hepática, cIMT. Se considerará una respuesta positiva y discriminativa una disminución del HOMA  $\geq 10\%$ , acompañada de una reducción de las cifras de insulina basal  $\geq 10\%$ , y de dos o más de los cambios siguientes: disminución de la grasa visceral  $>20\%$ , hepática  $>30\%$ , o del cIMT  $> 20\%$ .

*Variables secundarias:* puntuación de Ferriman y Gallwey, andrógenos, triglicéridos, adiponectina alto peso molecular, IRA, PCRus; regularidad menstrual.

### ***Ver apartado 20.2 Bibliografía Específica de la Metodología***

#### **1.19 Calendario y fecha prevista de finalización.**

La duración prevista de este estudio clínico es de 3 años (36 meses). Una vez el proyecto sea aprobado por el CEIC y por la AEMPS se procederá al inicio del ensayo, durante el primer trimestre de 2016 y finalizarlo en el primer trimestre de 2019. Los hitos más significativos del ensayo serán:

- ✓ Fecha prevista de inicio: Primer trimestre de 2016; fecha prevista de finalización: Primer trimestre de 2019.
- ✓ Duración del período de inclusión: 6 meses
- ✓ Duración del período de tratamiento: 12 meses.
- ✓ Duración del período de observación post-tratamiento: 12 meses.  
Duración del período de tabulación de resultados definitivos y elaboración de manuscritos: 6 meses.

## 1.20. Desarrollo del ensayo y evaluación de la respuesta

El resumen de los hitos más destacados se expone en la siguiente tabla:

**Tabla 1. Determinaciones que se realizan durante el ensayo.**

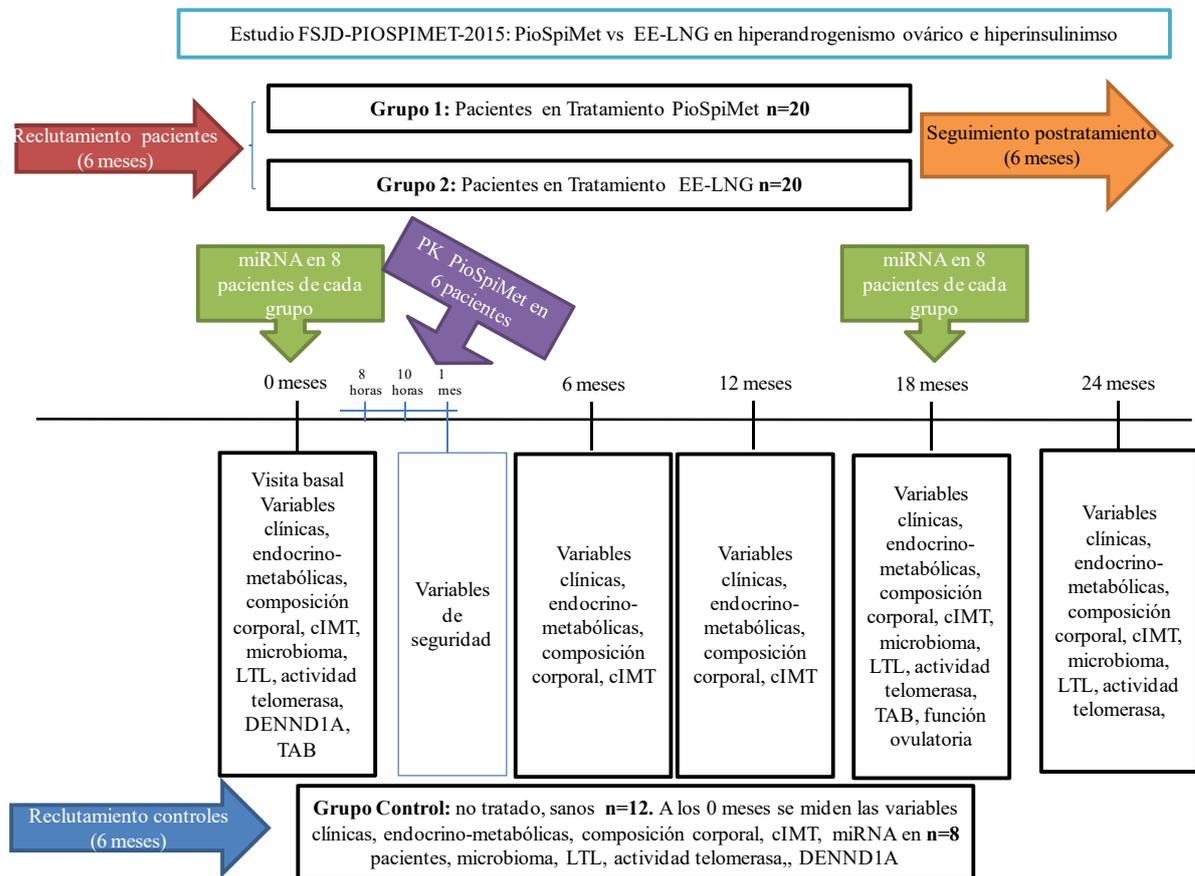
Variables	basal		8 h	10h	1m	6 m	12 m	18 m	24m
	Control	Ttmt*	Ttmt*	Ttmt*	Ttmt*	Ttmt*	Ttmt*	segto	segto *
<b>Clínicas</b>									
Peso, Talla, IMC, datos alimentarios, actividad física, score de Ferriman & Gallwey, ciclicidad menstrual, tensión arterial	X	X				X	X	X	X
<b>Endocrino-metabólicas</b>									
Hemograma, función hepática y renal, ionograma, CPK, LDH (parámetros de seguridad)	X	X			X	X	X	X	X
TTOG	X	X					X		X
Glucosa, Insulina, HOMA	X	X				X	X	X	X
HMW adip, PCRus, factor preadipocitario tipo 1, IRA, perfil lipídico, andrógenos, SHBG, androstendiona	X	X				X	X	X	X
<b>Composición Corporal</b>									
Densidad y contenido mineral óseo, DXA (densitometría)		X				X	X	X	X
Masa grasa total y abdominal, masa magra, (equipo de medición lunar)		X				X	X	X	X
<b>Distribución de grasa abdominal y grasa hepática</b>									
SAT, VAT y área de grasa hepática (RM y ecografía)		X				X	X	X	X

Variables	basal		8 h	10h	1m	6 m	12 m	18 m	24m
	Control	Ttmtó*	Ttmtó*	Ttmtó*	Ttmtó*	Ttmtó*	Ttmtó*	segto	segto *
<b>IMT carotídeo (Ecografía)</b>		X				X	X	X	X
<b>miRNA (microArray en sangre)</b>	X (n=8)	X (n=16, 8 cada grupo)					X	)	
<b>Composición del microbioma (heces)</b>	X	X					X		
<b>Longitud telomérica en leucocitos (LTL) y actividad telomerasa (sangre)</b>	X	X					X		X
<b>Polimorfismos de DENNDIA (rs10986105, rs2479106 y rs10818854) en sangre</b>	X	X							
<b>Expresión génica en tejido adiposo blanco subcutáneo (biopsia)</b>		X					X		
<b>Concentración serica PioSpiMet</b>			X(n=6 en grupo PioSpiMet)	X (n=6 en grupo PioSpiMet)	X (n=6 en grupo PioSpiMet)				
<b>Función ovulatoria** Progesterona salival</b>								X**	

\* Tratamiento: grupo 1 (PioSpiMet; n=20) y grupo 2 (EE-LNG n=20)

\*\*A los 21 meses post-tratamiento se empezará a tomar una muestra a la semana durante 3 meses hasta el mes 24 (total 12 muestras)

Figura 1 Esquema del ensayo clínico



## 1.21 Análisis estadístico

Se utilizará el programa informático SPSS versión 19.0. Se transformarán matemáticamente las variables cuantitativas que no sigan una distribución normal. Se comprobará (ANOVA), si existen diferencias basales en variables clínicas, analíticas y genéticas (medidas como variables cuantitativas). Para estudiar los cambios longitudinales de las variables clínicas, analíticas y genéticas, se utilizará el modelo lineal general para análisis repetidos, ajustando por factores de confusión en caso necesario. Se analizará la asociación entre parámetros endocrino-metabólicos (variables cuantitativas), clínicos y genéticos (medidos como variables cuantitativas) mediante análisis de correlación y regresión lineal múltiple. Se hará un análisis estadístico por intención a tratar y otro con los pacientes que hayan completado el seguimiento. Se considerará estadísticamente significativo un valor de  $p < 0.05$ .

Se realizará un análisis estadístico de la información generada con los primeros 20 sujetos durante el primer año del estudio. En el segundo año se realizará un análisis transversal de toda

la información generada y un análisis longitudinal de los sujetos incluidos durante los primeros 6 meses del estudio.

### 1.22 Aspectos éticos

El protocolo se llevará a cabo de acuerdo con la declaración de Helsinki actualizada en su última versión, así como las normas que establece el estado Español para el desarrollo de ensayos clínicos en menores de edad. Se recogerá un consentimiento informado por escrito a los padres o tutores legales de las pacientes y los controles, a quienes se les pedirá el asentimiento y se informará al Ministerio Fiscal con cada nueva inclusión de una participante. El protocolo de estudio será aprobado por los Comités de Ética de Investigación Clínica de los centros participantes y por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. El ensayo se realiza en contexto pragmático y no parece contravenir ninguno de los principios éticos, puesto que se busca el tratamiento del hiperandrogenismo ovárico de las adolescentes por medio de una pauta que *a priori* se espera que induzca una mejor tolerancia que los tratamientos convencionales en las pacientes. En cuanto a los controles, y por razones éticas, no se les realizarán todas las intervenciones que se realizan en la pacientes. Por ejemplo, no se les extraerá tejido adiposo para el estudio de expresión génica.

### 1.23 Aspectos prácticos

Todos los medicamentos referidos han sido autorizados para su uso en España y serán suministrados por El Servicio de Farmacia del Hospital de Sant Joan de Déu de Barcelona, donde se llevará a cabo un registro de dispensaciones, devoluciones y de los correspondientes números de lote. Los pacientes recibirán en cada una de las visitas al hospital la medicación requerida hasta el próximo control hospitalario y deberán aportar las cajas vacías de la medicación dispensada en la visita previa.

Todas las analíticas y exploraciones se realizarán así mismo en el mencionado hospital o en centros concertados siguiendo las rutinas habituales en la asistencia.

## 2.ÍNDICE DEL PROTOCOLO

1. Resumen .....	2
<b>2.ÍNDICE DEL PROTOCOLO .....</b>	<b>21</b>
3.Información general.....	24
4. Justificación y Objetivos .....	31
5. Tipo de ensayo clínico y diseño del mismo. ....	39
6. Selección de los pacientes.....	40
7. Descripción de los tratamientos .....	44
8. Desarrollo del ensayo y evaluación de la respuesta .....	48
9. Gestión de la Seguridad .....	54
10. Aspectos Éticos .....	58
11. Confidencialidad de los datos.....	59
12. Responsabilidades en el Estudio .....	61
13 Acceso Directo a los Datos/ Documentos Fuente .....	64
14 Manejo de los Datos y Archivos de Registro.....	64
15 Control y Garantía de Calidad.....	65
16 Financiación y Seguro .....	66
17 Uso de la Información y Política de Publicaciones .....	66
18 Productos en investigación.....	66
19 Análisis Estadístico. Valoración de la Eficacia y de la Seguridad.....	69
20 BIBLIOGRAFÍA .....	72
Anexo I Centros e Investigadores Participantes .....	78
Anexo II. – Formulario de notificación de acontecimientos adversos y Guia de Cumplimentación .....	80
Anexo III DECLARACIÓN DE HELSINKI .....	81
Anexo IV Hoja de información al paciente y Consentimiento Informado.....	86
Anexo V Cuaderno de Recogida de Datos (CRD) .....	87
Anexo VI Firma del protocolo por el promotor e investigador principal.....	88
Anexo VII Fichas técnicas de los medicamentos utilizados en el estudio. ....	89

## ABREVIATURAS

Siglas	Significado
AA	Acontecimiento adverso
AAG	Acontecimiento adverso grave
AT	Actividad telomerasa
AEMPS	Agencia Española del Medicamentos y Productos sanitarios
AOC/ACOs	Anticonceptivo Oral Combinado
BMI	Índice de Masa Corporal (Body Mass Index)
BPN	Bajo Peso al Nacer (de idéntico significado a SGA)
CEIC	Comité Ético de Investigación Clínica
cIMT	Grosor de la íntima carotídea
CEIC	Comité Ético de Investigación Clínica
LNG	Levonorgestrel
DHEAS	Sulfato de Dehidroepiandrosterona (DeHydroEpiAndrosterone Sulfate)
EE	Etinil-Estradiol
Spi	Espironolactona
FOH	Hiperandrogenismo ovárico funcional (Functional Ovarian Hyperandrogenism)
HDL	Lipoproteínas de alta densidad (High Density Lipoproteins)
HMW	Alto Peso Molecular (High Molecular Weight)
HOMA	Modelo Homeostático de Evaluación (Homeostatic Model Assessment)
IMC	Índice de Masa Corporal (idem BMI)
cIMT	Grosor de la íntima-media carotídea (Carotid Intima/Media Thickness)
IRA	Índice de resistencia a la insulina en tejido adiposo
LDL	Lipoproteínas de baja densidad (Low Density Lipoproteins)
LTL	Longitud telomérica en leucocitos
Met	Metformina
MS	Síndrome Metabólico (Metabolic Syndrome)
MSI	Insulina Sérica Media (Mean Serum Insulin)
NYHA	New York Heart Association
p	Percentil
Pio	Pioglitazona
PP	Pubarquia precoz
PioSpiMet	Pioglitazona+Espironolactona+Metmorfina
RA	Reacción adversa
RAG	Reacción adversa grave
RAGI	Reacción adversa grave e inesperada

Siglas	Significado
RM	Resonancia Magnética
SOP	Síndrome Ovárico Poliquístico
SNS	Sistema Nacional de Salud
SHBG	Globulina transportadora de hormonas sexuales (Sex Hormone Binding Globulin)

### 3. Información general

#### 3.1 Identificación del ensayo

Título:

“Ensayo clínico prospectivo, abierto, aleatorizado, con dos grupos de pacientes, para evaluar la eficacia y la seguridad de la combinación de Etilnil-estradiol y levonorgestrel versus la combinación de pioglitazona, espironolactona y metformina a dosis bajas en adolescentes con hiperandrogenismo ovárico e hiperinsulinismo: efectos sobre la función ovulatoria, parámetros de inflamación crónica, marcadores de evolución y efectividad del tratamiento, y de desarrollo de diabetes tipo 2”.

Código del Protocolo: FSJD-PIOSPIMET-2015

Nº EudraCT: 2015-005092-24

Fase del Estudio: IV

Versión 2.0

Fecha de vigencia: 31/08/2018

#### 3.2 Tipo de ensayo

Se trata de un ensayo clínico unicéntrico en fase IV, abierto, aleatorio, con dos ramas paralelas, una de ellas en tratamiento experimental con una combinación a dosis bajas de pioglitazona, espironolactona y metformina, y otra rama con el tratamiento de control convencionalmente utilizado a base de un anticonceptivo oral compuesto por levonorgestrel y etinil estradiol, para el tratamiento del hiperandrogenismo ovárico, en pacientes adolescentes sin riesgo de embarazo. Todas las pacientes mostrarán signos de síndrome metabólico, con hiperinsulinismo y analíticas propias de un estado de inflamación crónica. Todas estas características se definen con precisión en los criterios de inclusión. Se incluye, además, un grupo control de sujetos sanos, de IMC y edad similar a las pacientes, sin evidencia de hiperandrogenismo ovárico (no hirsutas, ciclos regulares).

Se desea averiguar si el tratamiento es capaz de revertir las alteraciones endocrino-metabólicas, vasculares y de composición corporal asociadas al hiperandrogenismo ovárico mejor que el tratamiento hormonal con anticonceptivos, en un ensayo piloto de 18 meses de duración y 6 meses de seguimiento posterior, y evaluar si los beneficios se mantienen al suspender el tratamiento. Además, se buscan marcadores de evolución de la patología y efectividad del tratamiento, así como los polimorfismos de *DENNDIA* en sangre periférica en pacientes y controles. También se estudian los cambios longitudinales en la expresión del tejido adiposo blanco subcutáneo de genes de inflamación y de acción de insulina.

Se realizará un análisis estadístico de la información generada con los primeros 20 sujetos durante el primer año del estudio. En el segundo año se realizará un análisis transversal de toda

la información generada y un análisis longitudinal de los sujetos incluidos durante los primeros 6 meses del estudio.

### 3.3 Descripción de los productos de estudio

Los productos en estudio se agrupan en dos tratamientos, que se componen de:

#### 3.3.1 Componentes del tratamiento experimental:

El tratamiento del grupo 1 (del fármaco experimental), consiste en los preparados separados de pioglitazona, espironolactona y metformina, para administrar conjuntamente y en adelante denominado PioSpiMet. Se compone de:

##### a) Pioglitazona

La pioglitazona forma parte del grupo de las Tiazolidinedionas, grupo de antidiabéticos orales con el código ATC A10BG03. La propiedad original es de los laboratorios Takeda Global Research que tiene concedidas en España varias licencias de comercialización. Para este ensayo se ha seleccionado el preparado Pioglitazona Cinfa® en comprimidos de 15 mg con un número de registro 76481, habitualmente en uso por el Servicio de Farmacia del hospital. La dosis del ensayo es de ½ comprimido, (7,5 mg) una vez al día.

Las tiazolidinedionas (glitazonas) son preparados que aumentan la sensibilidad a la insulina, o reducen la resistencia a la misma, con un efecto de aparición lenta, pues su máximo se alcanza al cabo de un mes de iniciada la administración. Reducen la liberación hepática de insulina e incrementan la captación de la misma por el músculo, de tal manera que aumentan la efectividad de la insulina endógena y reducen la cantidad de insulina exógena necesaria aproximadamente en un 30%, para mantener una glucemia determinada. Los efectos de la pioglitazona sobre los lípidos plasmáticos muestran aumentos de las concentraciones de HDL-colesterol, y disminuyen la proporción de grasa abdominal visceral (directamente relacionada con el riesgo cardiovascular), aumentando la grasa subcutánea, lo que determina un moderado aumento de peso y del índice de masa corporal, efecto que no ocurre con dosis bajas del fármaco. A dosis altas, actúa también aumentando la retención de líquidos en el organismo, por lo que puede producir problemas en los casos de insuficiencia cardíaca. En algunas tiazolidinedionas se ha destacado su toxicidad hepática, la cual es menor para la pioglitazona. Ninguno de los efectos secundarios se ha observado con dosis bajas (<15 mg/d) de pioglitazona. El mecanismo de acción se ejerce sobre un receptor nuclear denominado PPAR-γ (peroxisome-proliferator-activated-receptor-γ). Este receptor se expresa fundamentalmente en tejido adiposo, pero también en el músculo y en el hígado, y tiene un papel regulador en la diferenciación de los adipocitos. Los efectos de la pioglitazona a dosis bajas parecen estar mediados, sin embargo, por la inhibición de la fosforilación de PPAR-γ via CDK5, más que por su efecto agonista del mismo. La pioglitazona se fija notablemente a las proteínas plasmáticas (99%), tiene una semivida de

eliminación de unas 24 horas y es metabolizada por el CYP3A4 y el CYP2C a metabolitos activos que se eliminan principalmente por la bilis.

La pioglitazona está indicada en monoterapia en pacientes de diabetes tipo 2, especialmente con sobrepeso, que no logran estabilizarse con dieta y ejercicio. En doble terapia oral, se emplea combinada con metformina o con una sulfonilurea, especialmente si no se tolera la metformina. En triple terapia oral, combinada con metformina y una sulfonilurea cuando ambas no han logrado un control glucémico adecuado. Puede combinarse con insulina para aumentar la efectividad de la misma.

La pioglitazona no necesita ajuste de dosis en casos de insuficiencia renal moderada y no se dispone de experiencia en pacientes dializados, por lo que no se aconseja su administración a los mismos. No se puede administrar en los casos de insuficiencia hepática. No se tiene experiencia de uso en diabéticos menores de 18 años por lo que su ficha técnica no recomienda su uso en niños y adolescentes. Los comprimidos contienen lactosa como excipiente y no precisan condiciones especiales de conservación. Para más detalles de las condiciones de registro de uso se aconseja consultar la ficha técnica del preparado que se adjunta al final de este protocolo.

#### b) Espironolactona

Se trata de una sustancia con acción diurética y antagonista de la aldosterona; código ATC: C03DA01. Sus indicaciones terapéuticas son las siguientes: Hipertensión arterial esencial, tratamiento de la insuficiencia cardíaca crónica clases III y IV de la NYHA, asociado a su tratamiento convencional, hiperaldosteronismo primario, como agente de diagnóstico en el tratamiento prequirúrgico, o en el tratamiento a largo plazo de casos donde la intervención quirúrgica no está indicada. Hiperaldosteronismo secundario, en particular de los edemas relacionados con cirrosis hepática, insuficiencia cardíaca congestiva y síndrome nefrótico.

La espirolactona es un antagonista farmacológico específico de la aldosterona, que actúa principalmente mediante un mecanismo competitivo de unión a los receptores de la zona de intercambio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  dependiente de aldosterona localizados en el túbulo contorneado distal. La espirolactona actúa como un diurético ahorrador de potasio, provocando un aumento de la excreción de sodio y agua y manteniendo los niveles de potasio y magnesio. También posee un efecto antiandrogénico, probablemente por un antagonismo periférico de los andrógenos. Por este motivo, se utiliza en el tratamiento del hirsutismo asociado o no a hiperandrogenismo; la dosis habitual es de 100 mg/d, pero dosis de 50 mg/día parecen ser también efectivas, y carecen de los potenciales efectos secundarios.

A dosis elevadas, la espirolactona determina la pérdida de agua y sodio urinarios, y la retención de potasio; y los efectos clínicos finales son la diuresis economizadora de potasio y el descenso de la presión arterial.

La espirolactona también inhibe la biosíntesis de la aldosterona en pacientes con hiperaldosteronismo primario. En pacientes con hiperaldosteronismo secundario con edema actúa como diurético. Precisamente, su acción diurética, es efectiva en pacientes con edema refractario, asociados o no con aldosteronismo secundario, en patologías como la cirrosis hepática con ascitis, insuficiencia cardíaca congestiva y síndrome nefrótico, sobre todo en aquellas situaciones en que los otros diuréticos fracasan.

En cuanto a sus propiedades farmacocinéticas, la espirolactona se absorbe rápidamente y presenta una biodisponibilidad oral en torno al 90%, que se ve aumentada ligeramente por la presencia de alimentos debido a un aumento de la absorción y posiblemente a una disminución del metabolismo de primer paso. Tras la administración de 100 mg de espirolactona al día a voluntarios sanos que no estaban en ayunas durante 15 días, se obtuvieron para este compuesto unos valores de C<sub>max</sub> y t<sub>max</sub> de 80 ng/ml y 2,6 horas respectivamente. El grado de unión a proteínas plasmáticas tanto de la espirolactona como de sus metabolitos es superior al 90%. La espirolactona se metaboliza mayormente en el hígado, siendo los principales metabolitos activos, la canrenona y la 7-alfa- (tiometil) espirolactona, que presentan unos valores de C<sub>max</sub> de 181 ng/ml y 391 ng/ml, y de t<sub>max</sub> de 4,3 horas y 3,2 horas respectivamente. La espirolactona se elimina por vía urinaria y por vía fecal, estando casi todo el fármaco eliminado en forma de metabolitos. La semivida de eliminación de la espirolactona determinada tras la administración repetida de dosis de 100 mg/día fue de 1,4 horas, elevándose en el caso de los metabolitos (13,8 horas para 7-alfa-(tiometil) espirolactona y 16,5 horas para canrenona).

En la ficha técnica del producto que se añade al final del protocolo pueden completarse los detalles de este producto.

La dosis diaria de este fármaco para este ensayo será de ¼ de comprimido de 50 mg al día.

#### c) Metformina.

El tercer componente de este tratamiento combinado será la metformina, en forma de comprimidos de Metformina Sandoz®. Se presenta en forma de comprimidos blancos ranurados con 850 mg de metformina. El nombre comercial es el genérico del producto junto al del laboratorio fabricante y cuenta con el número de autorización código nacional 670938 y registro 71269, números que cambiaron al modificar el formato de fabricación el 02/03/2007. Se ha escogido este preparado por la facilidad de fraccionar los comprimidos para ofrecer la dosificación.

Las indicaciones terapéuticas de la metformina corresponden a las de los hipoglicemiantes orales del grupo de las biguanidas, la diabetes mellitus tipo 2, especialmente en pacientes con sobrepeso, cuando la dieta específica y el ejercicio no sean suficientes para normalizar la glucemia. En adultos se puede usar en monoterapia o asociada a otros antidiabéticos orales o

insulina. En niños se acepta a partir de los 10 años y en adolescentes, en monoterapia o en combinación con insulina (Ver ficha técnica en el anexo VII). El código de la clasificación anatomoterapéutica que le corresponde es el de antidiabético oral ATC A01BA02.

### 3.3.2 Componentes del tratamiento de control

#### a) Tratamiento con anticonceptivos orales combinados (AOC)

El tratamiento de control consiste en un preparado compuesto, LOETTE DIARIO® 100/20 µg comprimidos recubiertos con película, de los Laboratorios Wyeth Farma, S.A. Cada comprimido contiene 100 microgramos de levonorgestrel y 20 microgramos de etinilestradiol. El código nacional es el 650858, y el número de registro es el 66628.

El levonorgestrel es un derivado de la progesterona con actividad antiandrogénica, ya que compete con la dihidrotestosterona a nivel del receptor de andrógenos. El levonorgestrel tiene también acción antigluco corticoidea a dosis altas, por lo que en tratamientos prolongados se aconseja controlar las cifras de cortisol. Además del efecto antiandrogénico tiene un efecto progestágeno.

La forma de administración es similar a la de los AOC, tomando un comprimido diario sin interrupción durante 28 días consecutivos, para preservar la eficacia anticonceptiva. Los comprimidos deben tomarse en el orden indicado en el envase, aproximadamente a la misma hora cada día, con algo de líquido según se requiera. Cada nuevo envase se comienza el día siguiente al del último comprimido del envase previo. Durante la toma de los comprimidos inactivos se produce una hemorragia por privación. Ésta normalmente comienza al día 2-3 de iniciar la toma de comprimidos inactivos y puede no haber terminado antes de que se comience con el envase siguiente.

Las indicaciones del preparado están en el tratamiento de las enfermedades andrógeno-dependientes en las mujeres, como el acné, alteraciones seboreicas, alopecia androgénica y formas de hirsutismo.

Los efectos secundarios son los mismos que los de los anticonceptivos orales, donde destacan la tendencia al tromboembolismo, y alteraciones metabólicas, principalmente incremento de las concentraciones de glucosa e insulina, y de algunos marcadores de inflamación, como la PCRus. Para más detalles ver la ficha técnica del producto en el anexo VII correspondiente a este protocolo

#### b) Placebo: En este ensayo no es procedente el uso de placebo y por tanto no se ha considerado en el diseño del mismo.

Los demás detalles relativos a los productos utilizados específicos de este ensayo y que complementan las fichas técnicas, se aportan en el apartado de **Descripción del tratamiento**

### 3.4 Datos relativos al promotor

El Promotor de este ensayo clínico es la:

FUNDACIÓ SANT JOAN DE DÉU  
C/ Santa Rosa 39-57  
3ª Planta Edificio Docente  
08950 - Esplugues de Llobregat (Barcelona)

Se trata de un hospital universitario de tercer nivel que acoge primordialmente pacientes pediátricos.

### 3.5 Identificación del monitor

El Responsable de la Monitorización será:

SERMES-CRO  
C/ Rufino González 14 2º Dcha, 28037 Madrid  
Tél: 91 375 69 30 / FAX: 91 754 27 21

La farmacovigilancia del proyecto será realizada por SERMES-CRO, siendo la responsable de notificación de RAGIs:

Vicente Moreno  
SERMES CRO Director  
Responsable de la Unidad de Farmacovigilancia  
e-mail: farmacovigilancia@sermescro.com

Todos los centros tienen experiencia acreditada en estos servicios.

### 3.6 Datos de los investigadores del ensayo

#### Investigador principal

El investigador principal y responsable del protocolo es la Dra. Lourdes Ibáñez Toda

Servicio de endocrinología  
Hospital de Sant Joan de Déu  
Barcelona  
Pº. Sant Joan de Déu nº 2  
08950 Esplugues de Llobregat  
Barcelona  
Tel.: 93 253 21 00, ext. 4424  
Fax: 93 203 39 59  
e-mail: libanez@hsjdbcn.org

### Equipo investigador

La Dra. Paula Casano, del Servicio de Endocrinología colaborará con la investigadora principal Dra. Lourdes Ibáñez en la inclusión y seguimiento de los pacientes. También colaborará en el reclutamiento el Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital San Joan de Déu, bajo la supervisión de la Dra. Cristina Salvador. Esta misma Dra. colaborará en la recogida y análisis de datos y en la recogida de la biopsia del tejido adiposo.

También colaborará el Servicio de Radiología del Hospital Sant Joan de Déu y CETIR Centre Mèdic Barcelona, concretamente el Dr. Luis del Río.

El profesor Francesc Villarroya, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Barcelona e IP de CIBEROBN, asesorará al equipo investigador en los estudios de expresión en tejido adiposo. El Profesor Francis de Zegher, de la Universidad de Lovaina, asesorará al equipo investigador en el análisis e interpretación de datos y en la elaboración de futuros manuscritos.

En cuanto a la parte analítica y pruebas complementarias, se efectuarán en los servicios de Laboratorio del Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona. Las muestras de saliva, heces y el tejido adiposo subcutáneo se almacenarán en el Laboratorio de Investigación de la Fundación Sant Joan de Déu, donde se realizarán los estudios de polimorfismos de *DENNDIA* en sangre periférica y de expresión génica en TAB. Los estudio de miRNAs se realizarán entre el Laboratorio de Investigación de la Fundación Sant Joan de Déu y la empresa Bioarray SL (Alicante). El estudio del microbioma se realiza por ASCIDEA SL (Barcelona). La Dra. Ana Valls será la encargada del procesamiento y almacenamiento de muestras biológicas, así como de realizar las determinaciones de los parámetros endocrino-metabólicos.

Las analíticas y las técnicas exploratorias habituales se efectuarán en los hospitales de referencia e implicados según los estándares de calidad propios de cada hospital. En el Hospital St. Joan de Déu la Dra. Marta Díaz: está especializada en las determinaciones particulares del ensayo, específicamente, en el genotipado y estudios de expresión, longitud telomérica y actividad telomerasa. Realizará la validación de miRNAs. La Dra. Marta Díaz se encargará de aleatorizar a

las pacientes en uno u otro tratamiento, ya que no tendrá contacto con las pacientes y realizará un control por edad e índice de masa corporal (IMC).

Los estudios radiológicos, de imagen y otras pruebas complementarias se efectuarán en el CETIR Centre Mèdic Barcelona, con la colaboración del Dr. Luis del Rio, en las determinaciones de DXA y RM abdomen y la Dra. Giorgia Sebastiani en determinaciones de IMT carotídeo y medición de la grasa abdominal, colaborando en la tabulación y análisis de datos ecográficos.

La Dra. Lourdes Ibáñez será la responsable de la coordinación del proyecto, del mantenimiento de la base de datos y de dar soporte al resto de investigadores para el análisis, así como de elaborar los futuros manuscritos. La tabulación y análisis de los datos clínicos y los exámenes complementarios serán realizados por la Dra. Lourdes Ibáñez y la Dra. Paula Casano. La Dra. Marta Díaz colaborará en la tabulación y análisis de datos, así como en la elaboración de futuros manuscritos.

### 3.7 Centros donde se realizará el ensayo

La coordinación y el desarrollo clínico de este ensayo se llevará a cabo en el: Servicios de Endocrinología del Hospital Sant Joan de Déu, Esplugues de Llobregat. Barcelona, por lo que el ensayo se considera unicéntrico (**Ver Anexo I “Centros donde se realizará el ensayo”**). Si en el futuro se añaden nuevos centros a este ensayo las modificaciones y enmiendas correspondientes al protocolo se limitarán al mencionado Anexo I.

### 3.8 Duración prevista del ensayo

La duración prevista de este estudio clínico es de 24 meses (2 años) para cada paciente desde el inicio del tratamiento. El período de reclutamiento se prevé que dure 6 meses para garantizar la adecuada selección de los pacientes y la validez del ensayo. Se efectuarán las visitas basal (tiempo 0), y a los 6 , y 12 meses y seguirá al ensayo un período de observación postratamiento de doce meses de duración que finaliza con una visita a los 24 meses. En cuanto se disponga de las autorizaciones preceptivas del CEIC y de la Agencia Española de Medicamentos y Productos sanitarios (AEMPS) se procederá al inicio del ensayo, se espera que en el primer trimestre del año 2016, para finalizarlo en el primer trimestre de 2019, según el plan de trabajo previsto. La duración global del ensayo es de 36 meses (3 años), ya que a los 24 meses de duración del ensayo para el paciente se le añaden 6 meses de reclutamiento, y 6 meses de análisis de datos.

## 4. Justificación y Objetivos

### 4.1 Antecedentes y estado actual del tema

El hiperandrogenismo ovárico –o síndrome del ovario poliquístico- es la causa más frecuente de exceso de andrógenos en adolescentes y mujeres jóvenes, afectando aproximadamente al 5-7% de la población femenina en edad reproductiva (1,2). En adolescentes, se prefiere utilizar el término de hiperandrogenismo ovárico con hiperinsulinismo en lugar del término clásico síndrome de ovario poliquístico por varias razones: 1) el National Institutes of Health (NIH) recomienda otra terminología, porque la denominación clásica se basa en la morfología de ovario poliquístico, que no es un criterio diagnóstico necesario (3); 2) ninguna de las definiciones del SOP se ha validado en adolescentes (2); 3) el SOP se asocia clásicamente a obesidad, mientras que en adolescentes ocurre sin obesidad (4,5). El hiperandrogenismo ovárico se ha considerado tradicionalmente un trastorno primario del ovario (6). consecuentemente, el tratamiento más recomendado son los anticonceptivos orales (ACOs), que revierten las alteraciones cosméticas, y determinan ciclos regulares anovulatorios. Este tratamiento se recomienda en adolescentes muy jóvenes -incluso premenáuricas- sin riesgo de embarazo (4,7). Actualmente, se considera que el hiperandrogenismo ovárico puede ser consecuencia de la hipertrofia del tejido adiposo blanco subcutáneo (TABsc), y de las alteraciones metabólicas derivadas (2,8,9). Este concepto explicaría las morbilidades a medio y largo plazo, como la intolerancia a la glucosa, la diabetes tipo 2, la enfermedad cardiovascular, y la subfertilidad (10-12). Por consiguiente, las estrategias terapéuticas actuales deben dirigirse no sólo a revertir las alteraciones cosméticas sino también a reducir el riesgo de padecer estas complicaciones.

### Hiperandrogenismo ovárico, riesgo cardiometabólico y diabetes tipo 2

La resistencia a la insulina se asocia con frecuencia al hiperandrogenismo ovárico, incluso en ausencia de obesidad (13). Se acompaña de un descenso de las concentraciones de proteína transportadora de las hormonas sexuales [sex hormone binding globulin (SHBG)] y de un perfil lipídico aterogénico. La dislipemia y el hiperinsulinismo, a su vez, se asocian a un patrón anómalo de adipocinas -proteínas producidas por el tejido adiposo-, específicamente a una disminución de adiponectina de alto peso molecular (HMW-adip), con acción anti-inflamatoria y anti-diabetogénica (14). En estudios poblacionales, este patrón de adipocinas se ha asociado a resistencia a la insulina, y mayor prevalencia de diabetes tipo 2 y riesgo cardiovascular (15). El hiperandrogenismo ovárico se asocia también a aumento de marcadores de inflamación, como la proteína C-reactiva ultrasensible (PCRus). La elevación de PCRus es independiente de la obesidad, siendo mucho más fiable que otros marcadores pro-inflamatorios como el tumor necrosis factor- (TNF) y la interleuquina 6 (IL-6). En población general, incrementos de PCRus dentro del rango normal se asocian a disfunción endotelial y arteriosclerosis subclínica en pacientes asintomáticos (16).

El factor preadipocitario tipo 1 (Pref-1) es un inhibidor de la diferenciación de adipocitos; el aumento de Pref-1 se han asociado a menor TABsc y a riesgo metabólico (17). La disregulación del TABsc se puede estimar calculando del índice de resistencia a la insulina en tejido adiposo (IRA), cuyo aumento se asocia a concentraciones bajas de HMW-adip (18).

Las mujeres hiperandrogénicas tienen más adiposidad visceral y hepática (2,19,20). El aumento de grasa visceral favorece la síntesis de adipocinas pro-inflamatorias, y el acúmulo de macrófagos, que determinan resistencia a la insulina, aumento de PCRus, y mayor producción de

ácidos grasos libres (FFA), que empeoran el perfil metabólico y aumentan el riesgo cardiovascular (19,21).

El grosor de la íntima-media carotídea (cIMT) es un marcador establecido y no invasivo de riesgo cardiovascular (22). La cIMT está aumentada en adolescentes hiperandrogénicas y está directamente relacionada con las concentraciones de PCRus, la resistencia a la insulina y otros componentes del síndrome metabólico (2,19). En mujeres jóvenes obesas con hiperandrogenismo ovárico, la prevalencia de arteriosclerosis coronaria subclínica es 5 veces superior a la de la población general (23).

La teoría de la hipertrofia del TABsc permite englobar el conjunto de alteraciones descritas en un solo mecanismo fisiopatológico (2,8,9,24). El TABsc permite almacenar el aporte energético sin consecuencias metabólicas negativas. La dotación de adipocitos subcutáneos del TABsc es distinta en cada individuo, se establece fundamentalmente durante la vida prenatal, y está co-determinada por factores genéticos y epigenéticos (2,9). En caso de balance energético positivo continuo, el exceso de aporte calórico determina una hipertrofia compensadora de los adipocitos subcutáneos, intentando almacenar el exceso de calorías. El agotamiento de la capacidad de almacenamiento determina lipotoxicidad, aumento de FFA y triglicéridos, un patrón anómalo de adipocinas, resistencia a la insulina e hiperinsulinismo, inflamación (aumento de PCRus) y depósito ectópico de lípidos en hígado, músculo y páncreas (2,8,9). El hiperinsulinismo estimula la síntesis directa e indirecta (mediada por LH) de andrógenos (2,25). Ésto explicaría la presencia de resistencia a la insulina sin obesidad, por ejemplo, en pacientes con bajo peso al nacer (y menor dotación de adipocitos subcutáneos) y recuperación postnatal rápida y exagerada de peso (2). Asimismo, las mujeres hiperandrogénicas presentan adipocitos subcutáneos hipertróficos, comparadas con las normoandrogénicas, que se correlaciona con las concentraciones de adiponectina, testosterona y SHBG, y la resistencia a la insulina (26).

### Hiperandrogenismo ovárico, genética y epigenética

#### 1. Perfil de miRNAs circulantes

Los miRNAs son RNAs pequeños (17-25 nucleótidos) no codificantes, muy abundantes en suero. Están implicados en la regulación de procesos biológicos y patológicos, incluyendo cáncer y diabetes (27). Estudios transversales demuestran la presencia de miRNAs diferencialmente expresados en mujeres hiperandrogénicas, sugiriendo que estarían implicados en el desarrollo de resistencia a la insulina y obesidad (28), y podrían ser biomarcadores diagnósticos (29). Sin embargo, estos estudios se han realizado exclusivamente en adultas y en poblaciones muy heterogéneas (con distintos fenotipos clínicos), lo que imposibilita sacar conclusiones válidas.

#### 2. Microbioma intestinal

El microbioma es el conjunto de microorganismos que se localizan en el intestino y presentan una relación simbiótica con el huésped. Estudios en animales de experimentación (germ-free) apoyan el concepto de disbiosis (alteración de la composición microbiana del intestino), asociada con patologías como obesidad y diabetes (30). Se ha postulado que la alteración de la flora intestinal podría constituir uno de los mecanismos fisiopatológicos del hiperandrogenismo ovárico (31); pero no se ha caracterizado el perfil de “normalidad” ni en adolescentes sanas, ni en adolescentes con hiperandrogenismo ovárico, y se desconoce qué efectos produce el tratamiento con ACOs o con sensibilizantes a la insulina + antiandrógenos sobre el microbioma.

### 3. Longitud telomérica y actividad telomerasa

Los telómeros -situados en los extremos de los cromosomas- están compuestos por repeticiones en tándem TTAGGG. Durante la división celular, el extremo final del telómero no es copiado, y sufre acortamiento progresivo; al alcanzar una longitud crítica la célula entra en senescencia. Las células germinales y ciertas células madre tienen una telomerasa activa que alarga los telómeros tras cada ciclo de división, determinando una capacidad ilimitada para dividirse. Los telómeros cortos se han asociado con cáncer, CVD y diabetes (32,33). En un estudio transversal, el hiperandrogenismo ovárico se ha asociado a menor longitud telomérica en leucocitos (LTL) (34); estudios longitudinales piloto en adolescentes indican que la terapia combinada con pioglitazona, flutamida y metformina (PioFluMet) incrementa de modo reversible la LTL (35).

### 4. Polimorfismos en el gen *DENNDIA*

El gen *DENNDIA* codifica una proteína que actúa como factor intercambiador del nucleótido guanina (GEFs) para RAB35, GTPasa endosomal, implicada en procesos de endocitosis. *DENNDIA* es un gen candidato en el hiperandrogenismo ovárico y en el control de la esteroidogénesis tecal (36). Varios polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) se han asociado a hiperandrogenismo ovárico (37,38). Sin embargo, existe gran divergencia en los resultados dependiendo de la población estudiada, y no se han realizado estudios en pacientes hiperandrogénicas con homogeneidad fenotípica procedentes de la región mediterránea.

### 5. Expresión de genes relacionados con inflamación y acción de la insulina en TABsc

Los estudios de expresión génica en TABsc y visceral en mujeres hiperandrogénicas indican una disregulación de cascadas relacionadas con la acción de la insulina, adipogénesis, e inflamación, entre otras (39). En un estudio longitudinal en adolescentes con hiperandrogenismo ovárico, la terapia con un ACO que contiene etinil-estradiol (EE, 35 mcg) + acetato de ciproterona (AC, 5 mg), aumentó la expresión en TABsc de genes pro-inflamatorios y de activación de macrófagos, en relación a la expresión basal, y comparado con la terapia con PioFluMet (40). No existen estudios que comparen los efectos de combinaciones de sensibilizantes de la insulina + antiandrógenos con la de ACOs con menor dosis de estrógenos y progestágenos de escasa trombogénicidad.

Clásicamente, se consideraba que las alteraciones cosméticas (hirsutismo, acné) y la infertilidad derivada de la anovulación crónica eran las únicas co-morbilidades asociadas al hiperandrogenismo ovárico; actualmente, existe evidencia de que las alteraciones endocrino-metabólicas inherentes a la entidad pueden tener consecuencias a corto, medio y largo plazo, incluyendo el desarrollo de intolerancia a la glucosa, diabetes tipo 2 y enfermedad cardiovascular (10-12). Por consiguiente, las estrategias terapéuticas actuales deben ser capaces no sólo de revertir las alteraciones cosméticas asociadas al hiperandrogenismo ovárico sino también de garantizar una disminución del riesgo de padecer las complicaciones asociadas a la entidad.

#### *Opciones terapéuticas en el hiperandrogenismo ovárico*

El tratamiento “clásico” del hiperandrogenismo ovárico, independientemente de la necesidad de contracepción y de la edad de la paciente, es la administración de *anticonceptivos orales* (ACO) con diferentes asociaciones de estroprogestágenos. Los ACO mejoran el hirsutismo, el acné y regularizan los ciclos menstruales, ya que disminuyen el índice de

andrógenos libre –equivalente a la testosterona biológicamente activa- al aumentar los niveles de SHBG (28). Entre los más utilizados se encuentran los que contienen una combinación de etinilestradiol (EE) y un antiandrógeno como el acetato de ciproterona (AC) y aquéllos que contienen progestágenos no androgénicos, como la drospirenona. Sin embargo, existen estudios que indican que estos preparados en monoterapia agravan la resistencia a la insulina y la adiposidad corporal, e incrementan el riesgo cardiovascular (42-44). En nuestra experiencia, el tratamiento con EE-AC incrementa además la cIMT, la grasa visceral y hepática, las concentraciones de PCRus y la expresión en tejido adiposo subcutáneo de genes pro-inflamatorios y activadores de macrófagos (41,45). Asimismo, existe evidencia de que la drospirenona puede incrementar el riesgo de trombosis venosa comparada con otros progestágenos como el levonorgestrel (LNG), y de que tanto la drospirenona como el AC producen un mayor incremento de las concentraciones de SHBG, lo que se considera un factor de riesgo adicional de tromboembolismo (46, 47). Los ACOs con dosis bajas de EE (20 µg) son los que poseen mejor perfil de seguridad cardiovascular (48). Por consiguiente, la combinación de EE a dosis bajas y LNG podría considerarse la idónea para estudios comparativos en adolescentes.

Los agentes sensibilizantes de la insulina, como la metformina y las tiazolidinedionas (TZD), asociados a antiandrógenos, constituyen una buena alternativa terapéutica en el manejo del hiperandrogenismo ovárico, ya que revierten los signos y síntomas de hiperandrogenismo, y además, mejoran el perfil endocrino-metabólico y de adipoquinas, la composición corporal, y los marcadores de riesgo cardiovascular y diabetes tipo 2 (42, 45, 49, 50). Los efectos beneficiosos se mantienen al añadir un ACO en caso de que exista riesgo de embarazo (42, 51). Estas asociaciones utilizando dosis bajas de cada preparado, son mucho más eficaces que la administración de los mismos en monoterapia, a dosis más elevadas (42, 52).

La *metformina* es una biguanida autorizada para el tratamiento de la diabetes tipo 2 que inhibe la producción de glucosa hepática y aumenta la sensibilidad a la insulina a nivel periférico. Ejerce su acción activando el AMPK, un elemento clave del metabolismo celular necesario para la homeostasis energética, aunque el mecanismo no está bien esclarecido (53, 54). En adolescentes hiperandrogénicas, la metformina reduce los niveles de insulina y los andrógenos, mejora el perfil lipídico, revierten algunos parámetros de riesgo cardiovascular, y restablece la perioricidad y ovulación menstrual (42,55). Sin embargo, tiene un efecto limitado sobre el hirsutismo y sobre parámetros endocrino-metabólicos (42). La administración concomitante de un antiandrógeno puro, ejerce efectos aditivos beneficiosos sobre el hirsutismo, y sobre parámetros de riesgo cardiovascular: perfil lipídico, composición corporal y patrón de adipoquinas, disminuyendo los niveles séricos de IL-6 y aumentando las concentraciones de adiponectina (42, 51). Recientemente se ha comunicado la utilidad terapéutica de la metformina en la modulación de la pubertad, y en patologías como la osteoporosis, la psicosis y determinados tumores (54, 55). El efecto secundario más frecuente de la metformina son las alteraciones gastrointestinales transitorias, que se evitan iniciando gradualmente el tratamiento. El desarrollo de acidosis láctica sólo se ha descrito en pacientes ancianos con diabetes tipo 2 que

reciben dosis muy elevadas ( $>1.500$  mg/d), asociadas a hipoglucemiantes orales, con mal control metabólico, alteraciones de la función renal, e infecciones graves concomitantes (54, 55).

La *flutamida* y la *espirolactona* se han utilizado en monoterapia en el hiperandrogenismo ovárico en adolescentes. La flutamida es un antiandrógeno puro que bloquea la unión de los andrógenos a su receptor, y es más efectiva en el hiperandrogenismo que en el hiperinsulinismo (2). Los estudios en adolescentes son limitados, debido a su hipotética hepatotoxicidad, ausente a dosis bajas, y a su no disponibilidad universal (46). La espirolactona es un antagonista de la aldosterona, que bloquea la síntesis androgénica compitiendo con los andrógenos en su receptor; se utiliza desde hace décadas en pacientes con hirsutismo y acné, con o sin hiperandrogenismo (47). La espirolactona es en general muy bien tolerada; al inicio del tratamiento pueden producirse irregularidades menstruales transitorias (48).

La *pioglitazona* es un insulino sensibilizador que actúa uniéndose y activando el PPAR- (peroxisome-proliferator-activated- receptor-), que se expresa fundamentalmente en tejido adiposo y vascular, y regula la diferenciación de los adipocitos (49). En mujeres hiperandrogénicas, la pioglitazona normaliza los andrógenos y la ovulación y aumenta la sensibilidad a la insulina; sin embargo, a las dosis habitualmente utilizadas en monoterapia, incrementa el peso corporal (49). A dosis bajas, la pioglitazona no actúa como agonista PPAR-, sino que inhibe la fosforilación de PPAR- a través de la quinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5) (50). Este efecto modifica la expresión de diversos genes, incluyendo la adiponectina, y aumenta la sensibilidad a la insulina. Hace más de una década, constatamos que en adolescentes hiperandrogénicas, la *combinación* de flutamida y metformina a dosis bajas tiene efectos aditivos beneficiosos sobre el hiperandrogenismo, la sensibilidad a la insulina, la composición corporal, y sobre un amplio espectro de marcadores de inflamación, riesgo cardiovascular, y diabetes tipo 2 (44). La combinación es mucho más eficaz que la monoterapia a dosis más altas.

En estudios posteriores, analizamos los efectos de la *adición de pioglitazona* a dosis bajas (7,5 mg) a la combinación de flutamida (62,5 mg) y metformina (850 mg) (PioFluMet) en mujeres jóvenes y en adolescentes con hiperandrogenismo ovárico e hiperinsulinismo y factores de riesgo cardio-metabólico (19,40,51). En adolescentes, el tratamiento prolongado con PioFluMet tiene la misma eficacia sobre el hiperandrogenismo que la combinación EE-LNG. Sin embargo, los dos tratamientos tienen efectos divergentes sobre parámetros de riesgo cardiovascular y de desarrollo de diabetes tipo 2, ya que el EE-LNG incrementa el estado de inflamación crónica (incluyendo en TABsc), el riesgo metabólico y el hiperinsulinismo (19,40). La pioglitazona a dosis bajas, probablemente por su acción anti-fosforilación PPAR, potencia los efectos insulino-sensibilizantes de la metformina y de la flutamida, sin modificar el peso corporal, en una combinación terapéutica que posee las ventajas de todos los fármacos implicados y ninguno de sus potenciales efectos secundarios. Los efectos beneficiosos de PioFluMet persisten a los 6 meses de suspender el tratamiento (19,40).

Nuestro grupo ha demostrado que en adolescentes y mujeres jóvenes con hiperandrogenismo ovárico asociado a hiperinsulinismo y factores de riesgo cardio-metabólico, el tratamiento combinado prolongado con pioglitazona, flutamida y metformina (PioFluMet) a dosis bajas tiene efectos aditivos beneficiosos: reduce el grado de hirsutismo y los niveles de andrógenos, mejora

la dislipemia y el hiperinsulinismo, reduce la adiposidad central, visceral y hepática (íntimamente relacionada con la resistencia a la insulina) y la cIMT, restablece la perioricidad de los ciclos menstruales y la ovulación, y normaliza el estado pro-inflamatorio (41,45,49,50).

En el presente ensayo se utilizará espirolactona en lugar de flutamida, combinada con pioglitazona y metformina (PioSpiMet). Esta terapia es la que se compara con EE-LNG. Aunque la espirolactona es utilizada en monoterapia en pacientes hiperandrogénicas, existen pocos estudios sobre su eficacia y tolerancia. Los resultados obtenidos serán extrapolables a otras poblaciones, ya que la disponibilidad de espirolactona y EE-LNG es amplia, y su uso es práctica habitual.

*Ver Apartado 20.1- Bibliografía General (Antecedentes y Estado Actual del Tema)*

#### **4.2 Relevancia científico-sanitaria del proyecto e implicaciones**

En un estudio realizado en población similar a la propuesta en este estudio, que fue financiado como ensayo clínico no comercial (PI09/90444), hemos demostrado que el tratamiento con Pioglitazona + Flutamida + Metformina (PioFluMet) en adolescentes sin riesgo de embarazo tiene la misma eficacia sobre los signos y síntomas de hiperandrogenismo que la combinación EE-AC. Sin embargo, los dos tratamientos tienen efectos divergentes sobre parámetros de riesgo cardiovascular y de desarrollo de diabetes tipo 2, ya que la terapia con EE-AC incrementa el estado de inflamación crónica (incluyendo en tejido adiposo), el riesgo metabólico y el hiperinsulinismo (19,40). Por consiguiente, en adolescentes sin riesgo de embarazo el uso de EE-AC no es recomendable. Este estudio ha sido objeto de tres publicaciones en la revista Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism (2011, 2012 y 2013).

Los resultados preliminares del estudio piloto en el que se basa el proyecto actual demuestran que la combinación PioSpiMet tiene efectos más beneficiosos que EE-LNG sobre la grasa hepática y parámetros de riesgo cardiovascular, e igual eficacia sobre el hiperandrogenismo (52). Sin embargo, se desconocen los efectos sobre la función ovulatoria, y sobre marcadores genéticos de pronóstico y/o eficacia del tratamiento. También se desconoce si los beneficios persisten a largo plazo tras la suspensión de la terapéutica.

Esta alternativa terapéutica es mucho más fisiopatológica, ya que actúa sobre los mecanismos de base que condicionan la entidad, y permitirá reducir la potencial morbilidad derivada del uso indiscriminado de ACOs en el tratamiento del hiperandrogenismo ovárico en adolescentes sin riesgo de embarazo. Estos resultados serán extrapolables a otras poblaciones de adolescentes en países en los que existe disponibilidad de espirolactona y de EE-LNG, y en los que el uso de estos fármacos es práctica habitual.

#### **4.3 Hipótesis y Objetivos del ensayo**

##### Hipótesis

1. En adolescentes hiperandrogénicas sin riesgo de embarazo, el tratamiento con Pioglitazona + Espironolactona + Metformina (PioSpiMet) a dosis bajas comparado con etinil-estradiol + levonorgestrel (EE-LNG): a) normalizará la ciclicidad menstrual y la ovulación; b) reducirá el hiperinsulinismo, y normalizará los lípidos, el perfil de adipoquinas y el índice de resistencia a la insulina en tejido adiposo (IRA); c) disminuirá el grosor de la íntima-media carotídea (cIMT), y la grasa visceral y hepática. Los beneficios obtenidos con PioSpiMet se mantendrán al suspender el tratamiento (*vs* regresión a la situación basal con EE-LNG).
2. El perfil de miRNAs circulantes, la composición del microbioma intestinal, y la actividad telomerasa -pero no la longitud telomérica en leucocitos (LTL)-, diferirán entre pacientes y controles. Los parámetros mencionados presentarán cambios longitudinales divergentes en las pacientes después de PioSpiMet o EE-LNG, posibilitando la identificación de marcadores de evolución de la patología y de efectividad del tratamiento. Los miRNAs diferencialmente expresados, y los cambios en el microbioma intestinal y en la LTL se asociarán a cambios antropométricos, a biomarcadores de resistencia a la insulina y adipogénesis (adipoquinas), marcadores cardiovasculares (cIMT) y distribución de grasa abdominal (visceral, hepática). La LTL revertirá a su situación basal al finalizar la intervención.
3. Los polimorfismos de *DENNDIA* en sangre periférica diferirán entre pacientes y controles. Asimismo, en pacientes, existirá una expresión diferencial en tejido adiposo blanco subcutáneo de genes de inflamación y de acción de la insulina después de PioSpiMet o EE-LNG, indicativo de un perfil menos inflamatorio y más insulino-sensible con PioSpiMet.

### Objetivos

1. Determinar los beneficios del tratamiento a dosis bajas con PioSpiMet *vs* EE-LNG en adolescentes hiperandrogénicas sin riesgo de embarazo sobre: a) la ciclicidad menstrual y la ovulación; b) la sensibilidad a la insulina (insulinemia, lípidos, adipoquinas, IRA), la cIMT, la grasa visceral y hepática. Evaluar si los beneficios de PioSpiMet se mantienen al suspender el tratamiento y si se produce una regresión a la situación basal después de EE-LNG.
2. Caracterizar el perfil de miRNAs circulantes, del microbioma intestinal, la LTL y la actividad telomerasa en pacientes y controles. Determinar los cambios longitudinales en los parámetros mencionados en las pacientes después PioSpiMet o EE-LNG, posibilitando la identificación de marcadores de evolución de la patología y de efectividad del tratamiento. Correlacionar los miRNAs diferencialmente expresados, y los cambios en el microbioma intestinal y en la LTL con cambios antropométricos, de biomarcadores de resistencia a la insulina y adipogénesis (adipoquinas), de marcadores cardiovasculares (cIMT) y de distribución de grasa abdominal (visceral y hepática). Analizar si los cambios en la LTL persisten después del tratamiento.
3. Determinar si los polimorfismos de *DENNDIA* en sangre periférica difieren en pacientes y controles. Estudiar además los cambios longitudinales en la expresión en tejido adiposo blanco

subcutáneo de genes de inflamación y de acción de la insulina, después del tratamiento con PioSpiMet o EE-LNG.

## 5. Tipo de ensayo clínico y diseño del mismo.

### 5.1. Tipo de estudio

Este protocolo de ensayo clínico resulta de la adaptación al formato requerido por las Normas de Buena Práctica Clínica (Orden SCO 256/2007 del 5 de febrero) presentado a la convocatoria de ayudas a la evaluación de tecnologías sanitarias del Instituto de Salud Carlos III, ensayos de carácter no comercial con medicamentos, del BOE nº 65/2008 del 15 de marzo. El presente protocolo una vez aprobado por el CEIC se presentará para su aprobación a la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios.

Se trata de un ensayo en Fase IV en que se aplica el tratamiento experimental con productos autorizados y comercializados en España, como Pioglitazona, Espironolactona y Metformina (PioSpiMet), a dosis bajas, vs el tratamiento de control con levonorgestrel y etinil-estradiol, en pacientes adolescentes afectas de hiperandrogenismo ovárico. Se trata de aplicar en una nueva indicación de fármacos conocidos especialmente en uso pediátrico y que se combinan para una disminución de la resistencia, o una potenciación, de la insulina con un efecto antiandrogénico, versus el tratamiento con anticonceptivos orales combinados.

### 5.2. Diseño y aleatorización, proceso de muestreo

La muestra de ensayo estará compuesta por 40 pacientes mujeres de entre 12 y 18 años, que hayan tenido menarquia al menos dos años antes, y que hayan sido seguidas y estudiadas por los servicios de endocrinología o ginecología del Hospital de Sant Joan de Déu, y que no presenten riesgo de embarazo. Se incluye en el ensayo un grupo control de 12 adolescentes de la misma edad e IMC, sin evidencia de hiperandrogenismo (no hirsutas, ciclos regulares) reclutadas entre las compañeras de clase de las pacientes.

En cuanto al diseño se trata de un ensayo clínico prospectivo, abierto, aleatorizado, con dos grupos de pacientes en paralelo, y un grupo control de adolescentes sanas

Las pacientes se distribuyen en dos grupos de tratamiento: el grupo 1 (n=20) que recibirá tratamiento con pioglitazona+espironolactona+metformina (PioSpiMet); y el grupo 2 (n=20) que recibirá tratamiento con un anticonceptivo oral conteniendo etinil-estradiol + levonorgestrel (EE-LNG). La aleatorización la realizará un investigador independiente (Dra. Marta Díaz) mediante el programa: <http://www.sealedenvelope.com>, y será controlada por edad e IMC. Los sobres de aleatorización se guardarán en el Servicio de Farmacia que se encargará de suministrar y controlar la medicación.

La duración del reclutamiento se prevé de 6 meses, atendiendo a la prevalencia de la enfermedad y a la remisión de casos de los servicios de endocrinología y de ginecología del Hospital Sant Joan de Déu.

Tras la información al paciente y la verificación de los criterios de inclusión, se prevé una duración del tratamiento de 18 meses. Se realizará un análisis estadístico de la información generada con los primeros 20 sujetos durante el primer año del estudio. En el segundo año se realizará un análisis transversal de toda la información generada y un análisis longitudinal de los sujetos incluidos durante los primeros 6 meses del estudio.

Se realizará control clínico y exámenes complementarios a los 0, 6, y 12 meses de tratamiento y 6 meses después de finalizado el mismo, incluyendo la determinación de parámetros clínicos, endocrino-metabólicos, genéticos, vasculares (cIMT), de composición corporal y de distribución de grasa abdominal.

A los tres meses de finalizado el tratamiento, se estudiará la función ovulatoria mediante determinaciones seriadas de progesterona salival durante 12 semanas consecutivas.

### 5.3 Pacientes

Mujeres adolescentes (n=40) de edad igual o superior a 12 años e inferior a 18 años, post-menárquicas en al menos 2 años, previamente controladas en la Sección de Endocrinología o en el Servicio de Ginecología del Hospital Sant Joan de Déu, afectas de hiperandrogenismo ovárico asociado a hiperinsulinismo y sin riesgo de embarazo.

Un grupo (grupo 1, n=20) recibirá tratamiento con metformina (Metformina Sandoz®, 850 mg/d), Espironolactona (Aldactone Pfizer®, 50 mg/d) y Pioglitazona (Pioglitazona Cinfa®, 7,5 mg/d). El otro grupo (grupo 2, n=20) recibirá tratamiento con un anticonceptivo oral conteniendo Etil-estradiol (EE) y Levonorgestrel (Cpt) (Loette Diario®; Wyeth Farma, S.A., 1 comp/día.)

Atendiendo a las diferencias entre tratamientos no se efectúan en este ensayo maniobras de enmascaramiento.

Se recluta también un grupo control, de edad e IMC similar a las pacientes que se someten a tratamiento, sin evidencia de hiperandrogenismo (no hirsutas, ciclos regulares) reclutadas entre las compañeras de clase de las pacientes.

## 6. Selección de los pacientes

Las pacientes se seleccionarán en el área de influencia del hospital Sant Joan de Déu cuando sean remitidas a consulta por hallarse afectas de síntomas y signos compatibles con hiperandrogenismo e hiperinsulinismo, específicamente: hirsutismo y/o acné, y trastornos menstruales (oligomenorrea/amenorrea). Para el diagnóstico de hiperandrogenismo se requerirá la existencia de cifras elevadas de testosterona total ( $> 60$  ng/dL) y/o de un índice de andrógenos libre elevado ( $>5$ ), y/o de concentraciones elevadas de androstendiona ( $> 160$  ng/dL). Para el diagnóstico de hiperinsulinismo se requerirá la existencia de cifras basales elevadas de insulina ( $> 15$   $\mu$ U/mL), de un cociente glucosa/insulina basal  $< 7$ , o de un pico de insulina  $> 100$   $\mu$ U/mL en respuesta a una sobrecarga oral de glucosa estándar (75 gr). Una vez confirmada la presencia de esta patología se informará a la paciente de los pasos y pruebas necesarios para verificar el diagnóstico.

En caso de que se confirme el diagnóstico se informará a la paciente y a sus familiares o responsables, de las posibilidades terapéuticas así como de la posibilidad de participar en este ensayo. Si la paciente aceptase participar se procederá a la firma de las hojas de consentimiento. A las adolescentes control se les abrirá historia clínica en el HSJD, se les explicará los objetivos del estudio (también a los padres/tutores legales) y se obtendrá el consentimiento informado.

### 6.1. Número de pacientes

En estudios realizados en mujeres jóvenes con hiperandrogenismo ovárico asociado a hiperinsulinismo y marcadores de riesgo cardiovascular (**PI07/90105**, referencias 41, 45, bibliografía General), tratadas con la combinación PioFluMet se ha observado en el primer año, entre otros cambios, un aumento de la sensibilidad a la insulina (HOMA), una disminución de las cifras basales de insulina, una reducción de la grasa abdominal total y visceral, del contenido de lípidos intrahepático (IHLC) y del grosor de la íntima carotídea (cIMT). Las cifras de insulina disminuyen un 20% sobre valores basales, la grasa abdominal visceral se reduce en un 25%, el IHLC en un 40%, y el cIMT en un 22%. Los resultados preliminares del estudio FSJD-PioSpiMet-2012 en el que se ha sustituido la flutamida por espironolactona se confirman estos datos (3, bibliografía de la Metodología). Por tanto, si se quiere obtener una potencia mínima de la prueba del 80% con un nivel de significación de  $p < 0.05$  y detectar una diferencia en el cambio de la sensibilidad a la insulina o en las variaciones de la grasa visceral o del contenido de lípidos intrahepático durante los 18 meses de tratamiento de 0,8 múltiplos de DE entre los dos grupos, se deben incluir en cada grupo 17 pacientes. Se ha aumentado el número de pacientes ( $n=20$  por grupo) para garantizar el tamaño muestral en caso de pérdidas en el seguimiento.

### 6.2 Criterios de inclusión (Bibliografía, Sección 20.2, Metodología)

Para que una paciente pueda ser seleccionada para participar en el estudio deberá cumplir todos y cada uno de los siguientes criterios de inclusión:

- 1) Edad igual o superior a los 12 años e inferior a los 18 años (4)
- 2) Menarquia al menos 2 años antes
- 3) Índice de masa corporal (IMC) inferior al percentil 97 y superior al percentil 10 para la edad (5)
- 4) Hiperandrogenismo clínico:
  - c) Hirsutismo y/o acné
  - d) Oligomenorrea o amenorrea
- Y Hiperandrogenismo bioquímico:
  - c) Testosterona total  $> 60\text{ng/dL}$  y/o índice de andrógenos libres (IAL)  $> 5$
  - d) Androstendiona  $> 160\text{ ng/Dl}$  (1)
- 5) Hiperinsulinismo:
  - c) Insulina basal  $> 15\ \mu\text{U/mL}$
  - d) Cociente glucosa/insulina  $< 7$  ó pico de insulina en el test de tolerancia oral a la glucosa (TTOG)  $> 100\ \mu\text{UmL}$  (1)

### 6.3 Criterios de exclusión

Un paciente no podrá ser incluido en el estudio si presenta alguno, cualquiera, de los siguientes criterios de exclusión:

- 1) Embarazo o riesgo de embarazo:
- 2) Hiperplasia suprarrenal congénita por déficit de 21-hidroxilasa
- 3) Hiperprolactinemia
- 4) Síndrome de Cushing
- 5) Hipotiroidismo no controlado
- 6) Alteración hepática, renal, de Creatin-fosfoquinasa (CPK) o de lactato deshidrogenasa (LDH)
- 7) Diabetes o intolerancia a la glucosa (1)
- 8) Alergias cutáneas conocidas
- 9) Tratamiento con antiandrógenos, estro-progestágenos, o fármacos que interfieran con el metabolismo lipídico e hidrocarbonado en los 6 meses previos.
- 10) Infecciones bacterianas conocidas.
- 11) Enfermedad inflamatoria intestinal.

### 6.4 Duración aproximada del periodo de reclutamiento

Se prevé finalizar la inclusión de los 40 pacientes previstos y las 12 adolescentes control durante los primeros 6 meses.

La duración prevista de este estudio clínico es de 36 meses. Una vez el proyecto sea aprobado por el CEIC y por la AEMPS se procederá al inicio del ensayo, aproximadamente en el primer trimestre de 2016 y se finaliza en el primer trimestre de 2019.. Los hitos más significativos del ensayo serán:

- ✓ Fecha prevista de inicio: Primer trimestre de 2016; fecha prevista de finalización: primer trimestre de 2019..
- ✓ Duración del período de inclusión: 6 meses
- ✓ Duración del período de tratamiento: 12 meses.
- ✓ Duración del período de observación post-tratamiento: 12 meses.
- ✓ Duración del período de tabulación de resultados definitivos y elaboración de manuscritos: 6 meses.
- ✓ Duración total del ensayo: 30 meses desde el inicio del tratamiento.

### 6.5 Criterios de retirada y análisis previsto de las retiradas y abandonos.

Los pacientes se retiran del ensayo en las siguientes situaciones:

- Razones de seguridad-tolerabilidad a criterio del investigador. La seguridad-tolerabilidad se monitoriza a lo largo de todo el estudio del siguiente modo: al mes de iniciado el tratamiento, y posteriormente cada 6 meses–coincidiendo con las extracciones para determinar las variables de estudio-, se controlará el hemograma, la función hepática y renal, el ionograma, la glucemia, lactato deshidrogenasa (LDH) y creatin-fosfoquinasa (CPK), y la existencia de signos y/o síntomas que pudieran estar relacionados con la aparición de efectos adversos. El hallazgo de cifras de glucemia por debajo de 65 mg/dL, y de un aumento progresivo de las cifras de creatinina y/o urea, de transaminasas, de LDH, CPK, potasio, acompañado o no de síntomas sugestivos, será motivo de suspensión del tratamiento.

Asimismo, la existencia de signos y/o síntomas de hipoglucemia, la aparición de un rash cutáneo persistente, dolores abdominales, náuseas y/o vómitos persistentes, cefaleas, sinusitis, infecciones bacterianas severas, aún en ausencia de alteraciones biológicas, serán también motivo de suspensión del tratamiento. En estos casos, se monitorizará periódicamente la función renal y hepática, las cifras de glucemia, la LDH, y la CPK y el potasio, hasta la desaparición de los síntomas o la normalización de los parámetros alterados.

En el cómputo de resultados se considerarán las pacientes que hayan completado el estudio y los abandonos, efectuándose el análisis “por intención de tratar” y “por protocolo” comparando después las diferencias entre ambos métodos (Ver el punto **18. Análisis estadístico**). Cada caso de pérdida o abandono se valorará individualmente, justificando todas las actuaciones.

- Retirada voluntaria de los sujetos participantes cuando deseen, sin dar explicaciones y sin perjuicio de su atención médica posterior.
- Pérdida de seguimiento.
- Falta seria de cumplimiento con el protocolo del ensayo en opinión del investigador.
- Concurrencia durante el ensayo de una circunstancia incluida en los criterios de exclusión.

## 7. Descripción de los tratamientos

La medicación de ensayo propuesta consistirá en:

### 7.1. Fármacos Experimentales:

El tratamiento experimental consistirá en la asociación de Pioglitazona, Espironolactona y Metformina (Abreviadamente PioSpiMet) que se administrará en forma de comprimidos comerciales de los siguientes productos:

- Metformina Sandoz®; comprimidos; composición cualitativa y cuantitativa: clorhidrato de metformina, 850 mg. Excipientes, c.s.p. Elaboración: Laboratorios Sandoz. Dosis: 850 mg/día.
- Aldactone Pfizer®; comprimidos; composición cualitativa y cuantitativa: espironolactona, 100 mg. Excipientes: Núcleo: sulfato de calcio dihidratado, almidón de maíz sin gluten, polividona K-30, aroma de menta, estearato de magnesio. Cubierta: hidroxipropilmetilcelulosa 2910, 5 cps; hidroxipropilmetilcelulosa 2910, 15 cps; polietilenglicol 400; opaspray M-1-7111 B (blanco). Elaboración: Laboratorios Pfizer. Dosis: 50 mg/día.
- Pioglitazona Cinfa®; comprimidos; composición cualitativa y cuantitativa: clorhidrato de pioglitazona, 15 mg. Excipientes, carmelosa de calcio, hidroxipropilcelulosa, lactosa monohidrato, estearato de magnesio. Entidad elaboradora: Laboratorios Cinfa. Dosis: 7,5 mg/día.

En el anexo VII a este protocolo se adjuntan las fichas técnicas correspondientes, como “Descripción Técnica de los Productos de Ensayo”.

### 7.2. Fármacos de Control:

El tratamiento de control consistirá en la asociación de:

- Loette Diario®; comprimidos; composición cualitativa y cuantitativa: EE, 20 µg; LNG, 100 µg. Dosis: 1 comp/día. Laboratorio: Wyeth Farma, S.A.

La medicación será suministrada por el Servicio de Farmacia del Hospital Sant Joan de Déu, donde se llevará un registro de las dispensaciones y devoluciones. Las pacientes recibirán en cada una de las visitas la medicación requerida hasta el próximo control hospitalario, y deberán aportar las cajas vacías de la medicación dispensada en la visita previa. La medicación del ensayo se administrará de la forma siguiente: Grupo 1, espironolactona +pioglitazona+metformina por la noche antes de la cena. Grupo 2, los comprimidos de EE-LNG se ingerirán por la noche antes de la cena.

Si nuestra hipótesis es correcta, el tratamiento con PioSpiMet tendrá efectos beneficiosos superiores al tratamiento con EE-LNG sobre los factores que incrementan el riesgo de complicaciones derivadas del hiperandrogenismo ovárico (infertilidad por anovulación, enfermedad cardiovascular y diabetes tipo 2), y tendrá la misma eficacia sobre el hiperandrogenismo clínico y bioquímico. Esta alternativa terapéutica es mucho más fisiopatológica, ya que actúa sobre los mecanismos de base que condicionan la entidad, y permitirá reducir la potencial morbilidad derivada del uso indiscriminado de ACOs en el tratamiento del hiperandrogenismo ovárico en adolescentes sin riesgo de embarazo. Estos resultados serán extrapolables a otras poblaciones de adolescentes en países en los que existe disponibilidad de espironolactona y de EE-LNG, y en los que el uso de estos fármacos es práctica habitual.

### **7.3 Seguridad del tratamiento y criterios para la retirada de la medicación**

La metformina a dosis hasta tres veces superiores a las que se utilizarán en este estudio no tiene efectos adversos sobre las funciones hepática y renal cardíaca, no modifica los niveles séricos de electrolitos, vitamina B12 y ácido fólico, ni determina acidosis láctica (26, 27). La pioglitazona (asociada o no a metformina) a dosis hasta siete veces superiores a las que se utilizarán en este estudio no tiene efectos secundarios sobre la función hepática, sobre la función cardíaca, ni sobre la mineralización ósea (26, 27). En el 5% de pacientes tratados con dosis al menos dos veces superiores a las que se van a utilizar en este estudio, puede producir mialgias y aumento del volumen plasmático que no son persistentes ni se asocian a alteraciones hematológicas. La espironolactona, a dosis 4 veces superiores a las utilizadas en este protocolo, tiene un excelente perfil de seguridad en tratamientos de hasta 8 años (34-36). A dosis elevadas (400 mg/día) se ha asociado con trastornos electrolíticos y poliuria marcada.

Al mes de iniciado el tratamiento, y posteriormente cada 6 meses—coincidiendo con las extracciones para determinar las variables de estudio—, se controlará el hemograma, la función hepática y renal, el ionograma, la glucemia, lactato deshidrogenasa (LDH) y creatin-

fosfoquinasa (CPK), y la existencia de signos y/o síntomas que pudieran estar relacionados con la aparición de efectos adversos. El hallazgo de cifras de glucemia por debajo de 65 mg/dL, y de un aumento progresivo de las cifras de creatinina y/o urea, de transaminasas, de LDH, CPK, potasio, acompañado o no de síntomas sugestivos, será motivo de suspensión del tratamiento. Asimismo, la existencia de signos y/o síntomas de hipoglucemia, la aparición de un rash cutáneo persistente, dolores abdominales, náuseas y/o vómitos persistentes, cefaleas, sinusitis, infecciones bacterianas severas, aún en ausencia de alteraciones biológicas, serán también motivo de suspensión del tratamiento. En estos casos, se monitorizará periódicamente la función renal y hepática, las cifras de glucemia, la LDH, y la CPK y el potasio, hasta la desaparición de los síntomas o la normalización de los parámetros alterados.

#### 7.4 Modificación de las pautas. Criterios para la modificación de dosis

En este ensayo no son procedentes modificaciones de las pautas o de las dosis. La dosificación que se utiliza es muy baja y no se espera de ella un efecto inmediato, sino un efecto a medio plazo. Por ello no hay datos que sugieran la posibilidad de modificar la dosis ni criterios para proceder a ello. En caso de que a lo largo del ensayo surgieran hallazgos que hicieran pensar en estas posibilidades, serían tenidas en cuenta.

#### 7.5 Toxicidades de los fármacos

En los casos en los que sea necesario suspender el tratamiento, se monitorizará periódicamente la función renal, la función hepática, las cifras de glucemia, la LDH, y la CPK, hasta la desaparición de los síntomas o la normalización de los parámetros alterados.

#### 7.6 Medidas a adoptar en caso de intoxicación

A las dosis utilizadas es poco probable que se produzcan reacciones adversas relevantes y mucho menos intoxicaciones. Sin embargo, es procedente añadir los siguientes aspectos relativos a los fármacos del ensayo. Para los efectos adversos e interacciones de estos productos es aconsejable revisar la ficha técnica de cada uno de ellos en el Anexo VII.

**7.6.1 Pioglitazona:** De acuerdo con la experiencia del equipo investigador en estudios anteriores realizados en pacientes del mismo rango de edad y en mujeres jóvenes en períodos de hasta 36 meses, no es probable que la pioglitazona, a dosis de 7,5 mg una vez al día determine efectos secundarios de la función hepática o renal, o alteraciones de la densitometría ósea.

**7.6.2 Espironolactona:** La espironolactona es en general muy bien tolerada, a las dosis habitualmente utilizadas en el tratamiento del hiperandrogenismo (50-200 mg/día). A dosis elevadas (>200 mg/día) puede asociarse a trastornos electrolíticos, polimenorrea o poliuria. A dosis bajas, se han observado ocasionalmente

irregularidades menstruales que desaparecen a las pocas semanas de tratamiento, y que no condicionan abandono del mismo.

**7.6.3 Metformina:** A las dosis utilizadas es poco probable la producción de reacciones adversas. La acidosis láctica sólo se ha descrito en pacientes ancianos y/o casos de deshidratación con problemas renales. Se ha descrito la ingesta de hasta 85 g en una dosis, situación que llevó a la acidosis láctica y que requirió tratamiento en una unidad de cuidados intensivos.

**7.6.4 Levonorgestrel + Etilnil-estradiol:** Las precauciones atribuibles a su utilización son comparables a las del uso de anticonceptivos orales combinados. Los peligros de alteraciones hepáticas, accidentes tromboembólicos, depresión, etc son parecidos. No se han notificado reacciones adversas graves por sobredosis, con las que suele producirse náuseas, vómitos y posible hemorragia vaginal, tributarias de tratamiento sintomático.

## 7.7 Tratamientos concomitantes permitidos e incompatibles con el estudio

Estarán permitidos los analgésicos del tipo del tipo del paracetamol.

Se consideran incompatibles: Anticoagulantes, antiinflamatorios en general, incluyendo corticoides, hipoglucemiantes orales, antiandrógenos, estrógenos, progestágenos, digoxina, antibióticos en general y especialmente vancomicina, cotrimoxazol y trimetoprim, cimetidina, ranitidina, contrastes yodados, unos por que interferiran con la acción de los fármacos del estudio y otros por que modificarán las variables que se han de controlar para el seguimiento de los pacientes.

Para la pioglitazona hay que tener atención con el gemfibrocilo, que aumenta su biodisponibilidad, o con la rifampicina que la disminuye, si bien interfiere poco con los medicamentos más corrientes, incluidos los anticoagulantes, digoxina, metformina, sulfonilureas, etc.

Para la espironolactona, se ha descrito que su empleo puede verse afectada por la administración de los siguientes fármacos: Diuréticos ahorradores de potasio o suplementos de potasio: debe evitarse la administración concomitante ante el riesgo de hiperpotasemia. La administración conjunta de IECA o de antagonistas de los receptores de la angiotensina II con diuréticos ahorradores de potasio se ha asociado a la aparición de hiperpotasemia. Acido acetilsalicílico: Dosis altas de ácido acetilsalicílico pueden disminuir la acción diurética de la espironolactona por bloquear la secreción de canrenona (uno de los principales metabolitos activos de la espironolactona) en el túbulo renal. La indometacina y el ácido mefenámico han demostrado inhibir la excreción de canrenona.

La metformina requiere precauciones con los contrastes yodados y con las medicaciones que puedan interferir con el riñón, principal responsable de su eliminación. La ingesta de alcohol también puede ocasionar accidentes de tipo acidótico. Además se han de tener precauciones con los agonistas beta2, los diuréticos y los IECAs. Por último por el excipiente se han de tener precauciones en los casos de intolerancia a la lactosa y evitar el uso de metformina en la gestación.

Antes de administrar cualquier medicación consultar con los responsables del estudio, anotarlos, si es necesario, en el cuaderno de recogida de datos (Anexo V) y considerar la posibilidad de retirar al paciente del ensayo.

## 8. Desarrollo del ensayo y evaluación de la respuesta

El desarrollo del ensayo se basa en el seguimiento de las variables clínicas y analíticas principales y secundarias según se expone a continuación.

### 8.1 Inicio del ensayo y resultados de la selección pre-estudio

Las pacientes del estudio se seleccionarán de entre las que acuden a las consultas de Endocrinología o Ginecología –consecutivamente- con síntomas /signos de hiperandrogenismo ovárico e hiperinsulinismo. Esta selección se hará de acuerdo con los criterios de inclusión y exclusión mencionados, y después de comprobar analíticamente el diagnóstico.

### 8.2 Descripción del período experimental

Las modificaciones esperadas en este ensayo clínico suponen cambios lentos, por lo que las determinaciones iniciales, definitorias de un estado basal, se compararán con los valores que se registren a los 6 meses, y a los y 12 meses. Como control de seguimiento y seguridad, se compararán estos parámetros con los obtenidos a los 24 meses, 6 meses después de terminado el tratamiento. El conjunto de los parámetros a controlar es complejo, y puede resumirse en los siguientes variables:

### 8.3 Variables

- Clínicas: IMC, datos alimentarios y de actividad física (6), tensión arterial, puntuación de Ferriman & Gallwey (7), ciclicidad menstrual.
- Endocrino-metabólicas: andrógenos [testosterona total, índice de andrógenos libre (IAL, testosterona total (nmol/L) x 100/SHBG (nmol/L), androstendiona, sulfato de dehidroepiandrosterona (DEAS)], SHBG, glucosa, insulina, sensibilidad a la insulina [Homeostasis Model Assessment (HOMA)] (32), perfil lipídico, PCR ultrasensible (siglas en inglés- PCRus), adiponectina de alto peso molecular (siglas en inglés- HMW adip). Índice de resistencia a la insulina en tejido adiposo [IRA, insulina basal

(FI) x ácidos grasos libres (FFA) (33)], función ovulatoria (medición progesterona salival) (10). Las determinaciones de andrógenos, glucosa, insulina y perfil lipídico forman parte del protocolo habitual de seguimiento de pacientes con hiperandrogenismo.

- Composición corporal: absorciometría de doble energía (DXA); densidad y contenido mineral óseo; masa grasa total y abdominal, y masa magra (valores absolutos y porcentaje). Equipo de medición Lunar, modelo Prodigy (versión 12.3, Lunar Corp., Madison, Wisc., USA) (1). Radiación total en cada examen <10 Sievert. Coeficientes de variación (CVs) calculados a partir e 30 exploraciones repetidas de un fantoma de columna de hidroxapatita y resina plástica (Hologic Inc, Waltham, MA, USA): 2,0% y 2,6%, respectivamente, para la masa grasa y magra. CV para medición de la grasa abdominal en 3 exploraciones consecutivas realizadas en 14 sujetos: 0,74%.
- Distribución de la grasa abdominal y grasa hepática: 1) RM: área de grasa subcutánea (SAT), visceral (VAT) y hepática; dispositivo multi-slice 1.5 Tesla (Signa LX Echo Speed Plus Excite, General Electric Healthcare, Milwaukee, WI). Secuencias de 10 mm grosor desde el espacio intervertebral L4-L5 (1). CVs en el análisis por triplicado de 10 mujeres jóvenes en el intervalo de 3 meses (corte único): 7,2 % (SAT) y 8,8% (VAT); 2) Ecografía: Ecógrafo de alta resolución (MyLabTM25, Esaote, Florencia, Italia). Grasa visceral (sonda de 3.5 MHz): distancia entre la superficie interna de la pared abdominal y la pared posterior de la aorta a la altura del ombligo. Grasa subcutánea: grosor del panículo adiposo subcutáneo y preperitoneal (11).
- Vascular: grosor de la íntima carotídea (cIMT, ecografía) Ecógrafo MyLab™ Transductor de 12 MHz. La medición se realizará en diástole 1 cm antes de la bifurcación de ambas carótidas. CV intra-observador <10% (1, 12).
- Marcadores de evolución de la patología y de efectividad del tratamiento que se asociarán con cambios antropométricos, biomarcadores de resistencia a la insulina y adipogénesis, marcadores cardiovasculares y distribución de grasa abdominal:
  - miRNAs en suero: Extracción y purificación de RNA total de suero (incluyendo RNAs pequeños y miRNAs). El RNA íntegro se hibridará al Human miRNA V2 Oligo Microarray (Agilent Technologies; Palo Alto, CA), con 17.737 sondas correspondientes a 723 miRNAs. Los array se escanearán (Agilent G2565BA microarray scanner), se extraerá la información por intensidad de bandas (Agilent Feature Extraction software) y los datos se analizarán con un soporte bioinformático (miRbase) para obtener el perfil de miRNAs de cada muestra (13,14) (Bioarray SL, Alicante). Validación de resultados: Los miRNAs diferencialmente expresados se validarán individualmente por PCR a tiempo real (RT-PCR). Cada miRNAs se amplificará con primers específicos. Controles endógenos: RNU48 y RNU6B para la normalización de los resultados, análisis por cuantificación relativa (2- $\Delta$ Ct).
  - Composición del microbioma: Recogida matinal de heces, que se pulverizarán con nitrógeno líquido, alicuotarán y almacenarán a -80°C hasta procesamiento. Extracción de DNA con “MoBio PowerSoil DNA isolation kit”. Se

amplificará la región V4 hipervariable del rRNA 16S (gen específico bacteriano) utilizando primers universales codificados 515F-806R; se secuenciarán los fragmentos amplificados (Illumina MiSeq) y se pre-procesarán utilizando QIIME (15), agrupando las secuencias filtradas en unidades taxonómicas operacionales (OTUs) (16,17) (Ascidea SL, Barcelona).

- Longitud telomérica en leucocitos (LTL) y actividad telomerasa: extracción de DNA leucocitario de sangre periférica [EDTA con fenol-cloroformo (Promega)]. Determinación de LTL por RT-PCR (18); expresión como cociente T/S [número de repeticiones teloméricas (T) en relación a un gen de copia única (S)]. Amplificación por SYBR Green con primers específicos (Primer 3); el gen RNaseP se usará como gen de copia única, amplificación por taqman. Actividad telomerasa: obtención del “buffy coat” de sangre periférica fresca. Lisado celular y determinación de la actividad telomerasa en extracto celular medida por RT-PCR [Quantitative Telomerase Detection kit (Allied Biotech, Inc)] por tecnología SYBR Green (19). La LTL revertirá a su situación basal al finalizar la intervención.
- Polimorfismos de *DENNDIA* (rs10986105, rs2479106 y rs10818854) en sangre total por discriminación alélica con sondas pre-diseñadas (Life technologies) (20). Expresión génica en tejido adiposo blanco subcutáneo: biopsia tejido adiposo abdominal periumbilical por punción previa anestesia local con EMLA (1, 11); análisis de la expresión de CD163, TWEAK Receptor, ANGPTL4, Adiponectina, PPAR $\gamma$ , Glut-4, LPL, e IL-18 por RT-PCR (12,21).

*Variables principales de valoración:* frecuencia ovulatoria, (al menos un ciclo ovulatorio después de PioSpiMet vs ninguno con EE-LNG), sensibilidad a la insulina (HOMA), grasa visceral y hepática, cIMT. Se considerará una respuesta positiva y discriminativa una disminución de HOMA $\geq$ 10%, acompañada de una reducción de las cifras de insulina basal  $\geq$ 10%, y de dos o más cambios de los siguientes: disminución de la grasa visceral >20%, hepática >30%, o del cIMT > 20%.

*Variable secundarias:* puntuación de Ferriman & Gallwey, andrógenos, triglicéridos, adiponectina alto peso molecular, IRA, PCRus, regularidad menstrual.

Las variables se recogen a lo largo del ensayo en los tiempos que se describen en la siguiente tabla:

**Tabla 2. Tabla explicativa del desarrollo del ensayo**

Variables	basal		8 h	10h	1m	6 m	12 m	18 m	24m
	Control	Ttmt*	Ttmt*	Ttmt*	Ttmt*	Ttmt*	Ttmt*	Ttmt*	segmt*
<b>Clínicas</b>									
Peso, Talla, IMC, datos alimentarios, actividad física, score de Ferriman & Gallwey, ciclicidad menstrual, tensión arterial	X	X				X	X	X	X
<b>Endocrino-metabólicas</b>									
Hemograma, función hepática y renal, ionograma, CPK, LDH (parámetros de seguridad)	X	X			X	X	X	X	X
TTOG	X	X						X	X
Glucosa, Insulina, HOMA	X	X				X	X	X	X
HMW adip, PCRus, factor preadipocitario tipo 1, IRA, perfil lipídico, andrógenos, SHBG, androstendiona	X	X				X	X	X	X
<b>Composición Corporal</b>									
Densidad y contenido mineral óseo, DXA (densitometría)		X				X	X	X	X
Masa grasa total y abdominal, masa magra, (equipo de medición lunar)		X				X	X	X	X
<b>Distribución de grasa abdominal y grasa hepática</b>									
SAT, VAT y área de grasa hepática (RM y ecografía)		X				X	X	X	X
IMT carotídea (Ecografía)		X				X	X	X	X
miRNA (microArray en	X (n=8)	X (n=16,						X (n=16,	

Variables	basal		8 h	10h	1m	6 m	12 m	18 m	24m
	Control	Ttmtó*	Ttmtó*	Ttmtó*	Ttmtó*	Ttmtó*	Ttmtó*	Ttmtó*	segmto*
sangre)		8 cada grupo)						8 cada grupo)	
Composición del microbioma (heces)	X	X						X	
Longitud telométrica en leucocitos LTL) y actividad telomerasa (sangre)	X	X						X	X
Polimorfismos de <i>DENNDIA</i> (rs10986105, rs2479106 y rs10818854) en sangre	X	X							
Expresión génica en tejido adiposo blanco subcutáneo (biopsia)		X						X	
Concentración serica PioSpiMet			X(n=6 en grupo PioSpiMet)	X (n=6 en grupo PioSpiMet)	X (n=6 en grupo PioSpiMet)				
Función ovulatoria** Progesterona salival								X**	

\* Tratamiento: grupo1 (PioSpiMet; n=20) y grupo 2 (EE-LNG n=20)

\*\*A los 21 meses post-tratamiento se empezará a tomar una muestra a la semana durante 3 meses hasta el mes 24 (total 12 muestras)

## Metodología

Al grupo control se le realizarán las siguientes intervenciones: medida de variables clínicas (peso, talla, IMC, tensión arterial); extracción única en fase folicular del ciclo para determinar variables endocrino-metabólicas, LTL y actividad telomerasa, polimorfismos de *DENNDIA*, y muestra única de heces para microbioma. Además, en 8 de las 12 controles se analizarán los miRNA.

En cuanto a las pacientes, se les practicarán extracciones sanguíneas en fase folicular o después de 2 meses de amenorrea, excepto las realizadas para farmacocinética y parámetros de seguridad. A las 40 pacientes se les medirán las variables clínicas, endocrino-metabólicas, DXA, RM

abdominal, ecografía (cIMT y abdominal) en la visita basal, y también a los 6, 12, 18 y 24 meses. La función ovulatoria se testará postratamiento, entre los meses 18 y 24 durante 3 meses. TTOG, LTL y actividad telomerasa a los 0, 18 y 24 meses. Microbioma, a los 0 y 18 meses. Polimorfismos de *DENNDIA*, en la visita basal. Expresión génica en TABa los 0 y 18 meses. miRNAs, a los 0 y 18 meses en N=16 (8 de cada grupo). Las pacientes seleccionadas para estudios de miRNA serán las más representativas de cada grupo (menor desviación del promedio).

En un subgrupo de n=6 pacientes aleatorizadas para la combinación de PioSpiMet se estudiarán las concentraciones séricas de cada uno de estos fármacos (mediante HPLC) por separado durante el primer mes de tratamiento con el objeto de conocer la farmacocinética de estos compuestos en edad pediátrica. Para este subestudio las pacientes seleccionadas representarán los rangos de edad apropiados para tener resultados aplicables: tres pacientes de 12 a 15 años, tres pacientes de >15 a 18 años.

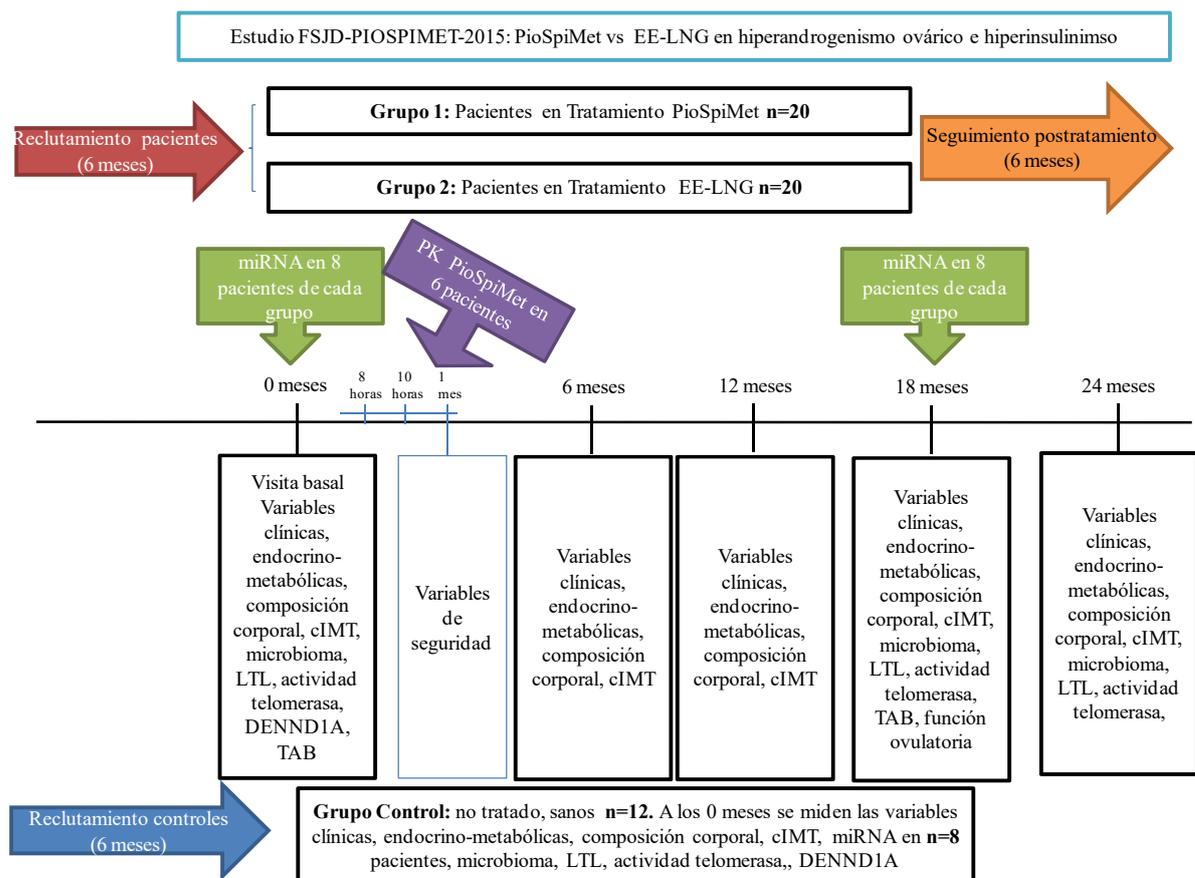
Las razones para realizar este subestudio son las siguientes:

- No existen datos del comportamiento de los niveles séricos de espironolactona en edad pediátrica (22);
- Los datos disponibles en pediatría relativos a la farmacocinética de la pioglitazona se han obtenido en adolescentes (12 a 17 años) después de la administración de dosis múltiples de 15 mg o superiores (23-25). Los resultados indican que la farmacocinética de la pioglitazona en esta franja de edad es similar a la del adulto (absorción rápida, exposición sistémica dosis-dependiente, acumulación mínima); sin embargo, no existen estudios que determinen si estos datos se replican con dosis de 7,5 mg/d.
- Nuestro grupo ha publicado resultados de la farmacocinética de la metformina en pediatría en pacientes tratadas a dosis similares a las propuestas en el presente estudio (26). Sin embargo, no existen datos sobre potenciales interacciones entre metformina y pioglitazona/espironolactona, y de su hipotética influencia sobre las concentraciones plasmáticas de metformina. Para el estudio de los niveles plasmáticos de los fármacos se realizarán dos extracciones adicionales de sangre 8 horas y 10 horas después de la primera ingesta del fármaco, y a los 30 días de tratamiento. Esta última extracción coincidirá con la programada para determinar parámetros de seguridad.

#### 8.4 Esquema del ensayo

El conjunto del seguimiento y desarrollo del ensayo puede mostrarse en el siguiente esquema:

Figura 2 Esquema del ensayo



## 9. Gestión de la Seguridad

Todos los datos relativos a la seguridad de los pacientes incluidos en el estudio se recogerán desde la firma del Consentimiento Informado hasta la finalización de la participación de los pacientes en el estudio.

### *Acontecimiento adverso (AA)*

Se define AA como cualquier incidencia perjudicial para la salud que se presente en un sujeto o paciente de una investigación clínica al que se ha administrado un medicamento, aunque no tenga necesariamente una relación causal con dicho tratamiento.

Un AA puede ser, por tanto, cualquier signo desfavorable y no intencionado (incluyendo un hallazgo anormal de laboratorio), síntoma o enfermedad temporalmente asociada con el uso de un medicamento (en investigación), esté o no relacionado con el medicamento (en investigación).

Los acontecimientos o reacciones adversas serán registrados en cada visita en la historia clínica del paciente y en el apartado del CRD correspondiente.

### ***Reacción adversa (RA)***

Se define RA como cualquier reacción que sea nociva y no intencionada a un medicamento en investigación, independientemente de la dosis administrada.

A diferencia de un AA, en el caso de una reacción adversa existe una sospecha de relación causal entre el medicamento en investigación y el acontecimiento adverso..

Se define RA inesperada a cualquier RA cuya naturaleza o intensidad no se corresponde con la información referente al producto (la ficha técnica del producto en el caso de un medicamento autorizado).

### ***Evaluación de AA y RA***

Un investigador evaluará todos los AA/RA adversas en función de los siguientes aspectos:

#### ***Intensidad***

Leve: se percibe el signo o síntoma, pero se tolera bien (en estudios con niños, se percibe el síntoma, pero se tolera bien).

Moderada: molestia suficiente para interferir en las actividad habituales (en estudios con niños, no hay duda de que le pasa algo).

Severa: molestia incapacitante e impide trabajar o realizar las actividades habituales (en los estudios con niños, angustia extrema o imposibilidad de realizar las actividades habituales). No confundir con los criterios de gravedad de un AA/RA descritos en el epígrafe siguiente.

#### ***Relación con la medicación empleada en el estudio***

Definitiva: existen pruebas de la exposición al fármaco del estudio. La secuencia temporal del inicio de la respuesta con respecto a la administración del fármaco es razonable. La explicación más probable de la respuesta observada es el fármaco (RAM). La eliminación de la provocación es positiva. La reanudación de la exposición (si es factible) es positiva. La respuesta muestra un patrón compatible con los conocimientos previos sobre el fármaco o sobre el grupo terapéutico al que pertenece.

Probable: existen pruebas de la exposición al fármaco del estudio. La secuencia temporal del inicio de la respuesta observada con respecto a la administración del fármaco es razonable. La explicación más probable de la respuesta es el fármaco. La eliminación de la exposición (si se hace) es positiva.

Posible: existen pruebas de la exposición al fármaco del estudio. La secuencia temporal del inicio de la respuesta observada con respecto a la administración del fármaco es razonable. La

respuesta observada podría haberse debido a alguna otra causa con idéntica probabilidad. La eliminación de la exposición (si se hace) es positiva.

Improbable: existen pruebas de la exposición al fármaco del estudio. Hay otra causa más probable de la respuesta observada. La eliminación de la exposición (si se hace) es negativa o ambigua. La reanudación de la exposición (si se hace) es negativa o ambigua.

No relacionada: el paciente no recibió el fármaco del estudio. O bien, la secuencia temporal del inicio de la respuesta observada con respecto a la administración del fármaco no es razonable; o bien hay otra causa obvia del AA.

### ***Desenlace del AA***

Recuperado sin secuelas: completamente recuperado o la condición ha vuelto al nivel observado al comienzo del estudio después de un tratamiento médico o quirúrgico.

Recuperado con secuelas: como resultado del AA, el paciente ha sufrido algún tipo de secuela persistente y significativa.

Estabilizado: el paciente no recupera la condición del comienzo del estudio y no se puede volver a normalizar mediante un tratamiento médico o quirúrgico.

No recuperado: el AA persiste.

Fatal: se produce el fallecimiento del paciente.

### ***Acontecimiento Adverso Grave (AAG) o Reacción Adversa Grave (RAG), notificación y seguimiento***

Se define como cualquier acontecimiento adverso o reacción adversa que a cualquier dosis:

Produzca la muerte del paciente,

Amenace la vida del paciente,

Haga necesaria la hospitalización del paciente o la prolongación de ésta,

Provoque invalidez o incapacidad permanente o importante,

Dé lugar a una anomalía o malformación congénita,

A efectos de su notificación, se tratarán también como graves aquellas sospechas de acontecimiento adverso o reacción adversa que se consideren importantes desde el punto de vista médico, aunque no cumplan los criterios anteriores, incluyendo los acontecimientos médicos importantes que requieran una intervención para evitar que se produzca una de las consecuencias anteriormente descritas. Asimismo, se notificarán como graves todas las sospechas de transmisión de un agente infeccioso a través de un medicamento.

El concepto “amenazar la vida del paciente” se refiere a que, en opinión del investigador, el paciente en el momento del acontecimiento o reacción adversa esté en un riesgo real de muerte; no se refiere a que el acontecimiento adverso/reacción adversa hipotéticamente pudiera haber ocasionado la muerte en caso de haber sido más intenso.

Toda AA o RA que cumpla estos criterios de gravedad deberá ser notificadas en un plazo de **24 horas desde su conocimiento** al monitor del estudio (**SERMES CRO**) y mediante los formularios habilitados a este fin y que serán proporcionados junto con la documentación de ensayo.

La información mínima inicial para realizar dicha notificación debe incluir lo siguiente:

Descripción del AA/RA y fecha de comienzo.

Datos del paciente (código de paciente, centro, fecha de nacimiento).

Datos del facultativo que notifica.

Información sobre el tratamiento recibido.

Criterio de gravedad.

Relación de causalidad con el fármaco del estudio.

Deberá vigilarse y seguirse a todos los pacientes con AAG para determinar su desenlace, estabilización o recuperación. Por tanto las notificaciones iniciales deberán ir seguidas de actualizaciones. Se recomienda que las actualizaciones tengan una cadencia quincenal o tan pronto suceda algún cambio en el estado del paciente.

### ***Reacción adversa inesperada (RAI)***

Se define como reacción adversa inesperada aquella cuya naturaleza, intensidad o consecuencias no se corresponde con la información de referencia para el medicamento (p.ej. el manual del investigador en el caso de un medicamento en investigación no autorizado para su comercialización, o la ficha técnica del producto en el caso de un medicamento autorizado).

El carácter inesperado de una reacción adversa se basa en el hecho de no haber sido previamente observada y no se basará en lo que pudiera ser anticipado en función de las propiedades farmacológicas del medicamento.

#### **9.1. Notificación expeditiva de reacciones adversas graves e inesperadas (RAGIs)**

Todas las sospechas de RAGIs se notificarán de acuerdo con la normativa vigente sobre ensayos clínicos en España, a la AEMPS, a los CEICs, a las Autoridades Sanitarias de las CCAA y a los investigadores, en los plazos y forma establecidos a continuación.

Deberá tenerse en cuenta que la notificación a la AEMPS se dirigirá en todos los casos al Área de Ensayos Clínicos de la Subdirección General de Medicamentos y Productos Sanitarios

La notificación de RAGIs será realizada por:

SERMES-CRO

Responsable de la Unidad de Farmacovigilancia: Vicente Moreno

C/ Rufino González 14 2º Dcha, 28037 Madrid

Tél: 91 375 69 30 / FAX: 91 375 69 31

e-mail: [farmacovigilancia@sermescro.com](mailto:farmacovigilancia@sermescro.com)

El plazo máximo de notificación de un caso individual de sospecha de RAGI a las correspondientes Autoridades Sanitarias será de 15 días naturales a partir del momento en que el promotor haya tenido conocimiento de la sospecha de reacción adversa. Cuando la sospecha de RAGI haya ocasionado la muerte del sujeto, o puesto en peligro su vida, el promotor enviará la información en el plazo máximo de 7 días naturales a partir del momento en que el promotor tenga conocimiento del caso. Dicha información deberá ser completada, en lo posible, en los

ocho días siguientes. Esta información deberá incluir una evaluación tanto de la importancia e implicación de los hallazgos, incluyendo experiencia previa relevante con el mismo medicamento o similares.

### 9.2. Notificación expeditiva de otra información de seguridad relevante

El promotor deberá notificar de manera expeditiva toda aquella información que pudiera modificar la relación riesgo/beneficio del medicamento en investigación, o determinar cambios en su pauta de administración o en la realización del ensayo, como por ejemplo, un cambio cualitativo o un aumento en el porcentaje de aparición de las RAG esperadas que se considere clínicamente relevante, o las RAGI que ocurran después de la finalización de un ensayo clínico y que sean notificadas por el investigador al promotor,

Esta información relevante se deberá notificar tan pronto como sea posible y no más tarde de 15 días después de que el promotor haya tenido conocimiento de la misma. Además, si se obtuviese información adicional que fuese relevante, deberá notificarse lo más rápido posible.

### 9.3 Definición de sobredosis en este protocolo

Una sobredosis se define como cualquier administración de la medicación del estudio en cantidades superiores a las establecidas en la pauta posológica del protocolo, ya sea de forma accidental o intencionada.

En este estudio sólo se contempla la posibilidad de sobredosis accidental. En cualquier caso se informaría al equipo médico y al monitor del estudio tan pronto se detectara.

## 10. Aspectos Éticos

### *Consideraciones generales*

El ensayo se llevará a cabo siguiendo rigurosamente las recomendaciones éticas internacionales para investigación y ensayos clínicos en humanos recogidas en las declaraciones internacionales éticas de Helsinki, las recomendaciones de la OMS, el código deontológico, las derivadas de la legislación española sobre ensayos clínicos (Ley 29/2006 de 26 de Julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios, Real Decreto 223/2004 de 6 de febrero, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos), así como las normas de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH) sobre Buena Práctica Clínica (BPC).

El investigador debe obtener aprobación por escrito del CEIC para el protocolo y el formulario de consentimiento informado, así como aprobación de la AEMPS según la legislación vigente. Se recomienda que el investigador informe al médico de cabecera del paciente de su participación en el estudio, si el paciente tiene un médico de cabecera y si el paciente o sus tutores están de acuerdo en que se le notifique.

El ensayo se realiza en contexto pragmático y no parece contravenir ninguno de los principios éticos, puesto que se busca el tratamiento del hiperandrogenismo ovárico de las adolescentes por medio de una pauta que a priori se espera que induzca una mejor tolerancia que los tratamientos convencionales.

El investigador considera que el ensayo es éticamente correcto puesto que se ampara en datos sólidos de la bibliografía, una experiencia acreditada sobre el tema y tiene como objetivo la búsqueda de un tratamiento mejor y mejor tolerado en unas condiciones que cumplen los estándares y la legislación actuales.

### ***Consentimiento informado***

El investigador es responsable de asegurarse que los pacientes y sujetos participantes en el ensayo, o sus representantes legales comprenden los riesgos y beneficios de su participación en el estudio, respondiendo a cualquier pregunta que cualquiera de ellos pudiera plantear durante el mismo, y compartiendo de manera oportuna cualquier información nueva que pudiera influir en la decisión de su participación en el estudio.

La hoja de información para pacientes/representantes legales se utilizará para explicar en términos sencillos, los riesgos y beneficios de la participación del paciente en el estudio, antes de su inclusión en el mismo, y para documentar que han comprendido perfectamente dichos riesgos y beneficios, y que desean que el paciente participe en el mismo (Anexo IV).

Los padres o responsables legales de las pacientes y sujetos participantes serán informados de los procedimientos no invasivos para la selección, que requerirán la práctica de determinaciones analíticas y pruebas complementarias que pueden considerarse mínimamente invasivas. Se informará también de los objetivos y procedimientos del ensayo y demás detalles incluidos en las normas de buena práctica clínica. Atendiendo a la edad de las pacientes se les facilitará una hoja de información específica.

El investigador es responsable de asegurarse que todos los pacientes/representantes legales proporcionen el consentimiento informado por escrito. Esta responsabilidad incluye la obtención de las firmas correspondientes, junto con la fecha, en el documento de consentimiento informado, antes de la realización de cualquiera de los procedimientos del protocolo y previamente a la administración de los fármacos en estudio (Anexo IV).

En cualquier momento del estudio, el paciente podrá retirarse del estudio sin expresión de causa y sin que por ello se derive responsabilidad ni perjuicio alguno.

## **11. Confidencialidad de los datos**

### **11.1 Identificación del paciente**

El paciente se identificará con un número de orden y el de ensayo además de las iniciales del nombre y los dos apellidos, a fin de cumplir en todo momento con las normas de BPC y con la

confidencialidad de datos según la Ley 15/1999. En el cuaderno de recogida de datos se especifica las normas par adjudicar los números de censo y en el apartado 5.2 los relativos al diseño y aleatorización.

### 11.2 Confidencialidad de los datos

Al firmar este protocolo, el investigador garantiza al PROMOTOR que la información que reciba de éste se mantendrá confidencial y que sólo será divulgada al CEIC, a la institución de pertenencia y a los empleados en el marco de un compromiso de confidencialidad adecuado (Anexo VI). Los datos generados por este estudio serán considerados confidenciales por el investigador, excepto para su inclusión en una publicación, tal como se señala en la sección Publicaciones del protocolo.

La identidad del paciente será mantenida de forma confidencial a lo largo de todo el estudio y los datos referidos a cada paciente, se transmitirán, si fuera necesario, encriptadamente.

Los datos obtenidos se tratarán según la ley 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal. De acuerdo con dicha ley, los datos personales que se requieren de los pacientes son los necesarios para cubrir los objetivos del estudio. Los pacientes/representantes legales participantes en el ensayo clínico tienen derecho al acceso a sus datos personales y a solicitar su rectificación o cancelación.

### 11.3 Confidencialidad de los registros de pacientes

El investigador deberá garantizar el anonimato de los pacientes y los sujetos participantes, y que su identidad está protegida de terceras partes no autorizadas. En los CRDs u otros documentos enviados al PROMOTOR, los pacientes no serán identificados por sus nombres sino por un código de identificación.

El investigador mantendrá un registro de reclutamiento de pacientes y sujetos participantes con los códigos, los nombres y las direcciones. Además deberá garantizar la confidencialidad de la información recogida.

Al firmar el protocolo, el investigador acepta que el PROMOTOR (o el representante del PROMOTOR), el CEIC o cualquier organismo legal pueda consultar y/o copiar los documentos del estudio a fin de verificar los datos de los CRDs. Al firmar el formulario de consentimiento, los pacientes, sujetos participantes y sus representantes legales aceptan este proceso. En caso de que vayan a fotocoparse los documentos del estudio durante la verificación de la información de las hojas de trabajo/CRDs, el paciente o sujeto participante se identificará mediante un solo código; los nombres completos/iniciales se ocultarán antes de su transmisión al PROMOTOR.

### 11.4 Confidencialidad de la información del investigador

Al firmar este protocolo, el investigador acepta que determinada información de identificación personal sobre él, los sub-investigadores y el personal del centro de estudio puede ser utilizada y

divulgada con fines de gestión del estudio, formando parte de solicitudes administrativas y por imperativo legal.

Esta información puede comprender:

- Nombre, dirección, número de teléfono y dirección de correo electrónico;
- Dirección y número de teléfono del hospital o consulta;
- Currículo u otro resumen de los títulos y credenciales; y
- Otra documentación profesional.

De conformidad con los objetivos antes descritos, esta información puede transmitirse al PROMOTOR. Además, el nombre del investigador y la dirección/número de teléfono del hospital/clínica pueden aparecer al comunicar determinados acontecimientos adversos graves a las autoridades sanitarias o a otros investigadores. Al firmar este protocolo, el investigador acepta expresamente estos usos y divulgaciones.

## 12. Responsabilidades en el Estudio

### 12.1 Responsabilidades del Promotor

- ✓ Establecer y mantener un sistema de garantías y control de calidad, con procedimientos normalizados de trabajo escritos, de forma que los ensayos sean realizados y los datos generados, documentados y comunicados de acuerdo con el protocolo, las normas de buena práctica clínica y lo dispuesto en el Real Decreto 223/2004.
- ✓ Firmar, junto con el investigador que corresponda, el protocolo y cualquiera de sus modificaciones.
- ✓ Seleccionar al investigador más adecuado según su cualificación y medios disponibles, y asegurarse de que éste llevará a cabo el estudio tal como está especificado en el protocolo.
- ✓ Proporcionar la información básica y clínica disponible del producto en investigación y actualizarla a lo largo del ensayo.
- ✓ Solicitar el dictamen del CEIC y la autorización de la AEMPS, así como suministrarles la información y recabar las autorizaciones que procedan, sin perjuicio de la comunicación a las Comunidades Autónomas, en caso de modificación o violación del protocolo o interrupción del ensayo, y las razones para ello.
- ✓ Suministrar de forma gratuita los medicamentos en investigación, garantizar que se han cumplido las normas de correcta fabricación y que las muestras están adecuadamente envasadas y etiquetadas. También es responsable de la conservación

de muestras y sus protocolos de fabricación y control, del registro de las muestras entregadas y de asegurarse que en el centro donde se realiza el ensayo existirá un procedimiento correcto de manejo, conservación y uso de dichas muestras. Excepcionalmente, se podrán acordar con el centro otras vías de suministro.

- ✓ Designar el monitor que vigilará la marcha del ensayo.
- ✓ Mantener unos registros detallados de todos los acontecimientos adversos que le sean comunicados por los investigadores. Estos registros se presentarán a la AEMPS cuando ésta así lo solicite.
- ✓ Comunicar a las autoridades sanitarias, a los investigadores y a los CEICs involucrados en el ensayo las sospechas de reacciones adversas graves e inesperadas de conformidad con lo establecido en los artículos 43 a 46 del Real Decreto 223/2004.
- ✓ Proporcionar al investigador y al CEIC, de forma inmediata, cualquier información de importancia a la que tenga acceso durante el ensayo.
- ✓ Proporcionar compensación económica a los tutores de los pacientes en caso de lesión o muerte relacionadas con el ensayo. Proporcionar al investigador cobertura legal y económica en estos casos excepto cuando la lesión sea consecuencia de negligencia o mala práctica del investigador.
- ✓ Acordar con el investigador las obligaciones en cuanto al tratamiento de datos, elaboración de informes y publicación de resultados. En cualquier caso, el promotor es responsable de elaborar los informes finales o parciales del ensayo y comunicarlos a quien corresponda.
- ✓ El promotor dispondrá de un punto de contacto, donde los tutores de los pacientes del ensayo puedan obtener mayor información sobre éste, que podrá delegar en el investigador.
- ✓ Notificar a la AEMPS y CEICs implicados la finalización del ensayo en el plazo de 90 días. Si la finalización fuese prematura, dicho plazo sería de 15 días incluyendo que el informe incluya los datos obtenidos hasta el momento de su conclusión anticipada, así como los motivos de ésta, y en su caso las medidas adoptadas en relación con los pacientes participantes en el ensayo.
- ✓ Remitir a la AEMPS y CEICs implicados el plazo de un año desde el final del ensayo un resumen del informe final sobre los resultados del ensayo.
- ✓ Cuando la duración del ensayo sea superior a un año, será necesario además que el promotor remita un informe anual sobre la marcha del ensayo.
- ✓ Remitir a la AEMPS, Comunidades Autónomas y CEICs implicados informe periódico de seguridad anualmente hasta el final del ensayo y siempre que lo soliciten autoridades sanitarias o CEICs implicados. Se deberá remitir un informe de evaluación «ad hoc» siempre que exista un problema de seguridad relevante.

### 12.2 Responsabilidades del Investigador

- ✓ Estar de acuerdo y firmar junto con el promotor el protocolo del ensayo.
- ✓ Conocer a fondo las propiedades de los medicamentos en investigación.
- ✓ Garantizar que el consentimiento informado se recoge de conformidad a lo establecido en el Real Decreto 223/2004.
- ✓ Recoger, registrar y notificar los datos de forma correcta y garantizar su veracidad.
- ✓ Notificar inmediatamente los acontecimientos adversos graves o inesperados al promotor.
- ✓ Garantizar que todas las personas implicadas respetarán la confidencialidad de cualquier información acerca de los pacientes del ensayo, así como la protección de sus datos de carácter personal.
- ✓ Informar regularmente al CEIC de la marcha del ensayo.
- ✓ Corresponsabilizarse con el promotor de la elaboración del informe final del ensayo, dando su acuerdo con su firma.

### 12.3 Responsabilidades del Monitor

- ✓ Trabajar de acuerdo con los procedimientos normalizados de trabajo del promotor, visitar al investigador antes, durante y después del ensayo para comprobar el cumplimiento del protocolo, garantizar que los datos son registrados de forma correcta y completa, así como asegurarse de que se ha obtenido el consentimiento informado de todos los pacientes/tutores de los pacientes antes de su inclusión en el ensayo.
- ✓ Cerciorarse de que los investigadores y el centro donde se realizará la investigación son adecuados para este propósito durante el período de realización del ensayo.
- ✓ Asegurarse de que tanto el investigador principal como sus colaboradores han sido informados adecuadamente y garantizar en todo momento una comunicación rápida entre investigador y promotor.
- ✓ Verificar que el investigador cumple el protocolo y todas sus modificaciones aprobadas.
- ✓ Comprobar que el almacenamiento, distribución, devolución y documentación de los medicamentos en investigación es seguro y adecuado.
- ✓ Remitir al promotor informes de las visitas de monitorización y de todos los contactos relevantes con el investigador.

### 13 Acceso Directo a los Datos/ Documentos Fuente

El PROMOTOR del estudio garantiza que el investigador o la institución permitirán el acceso directo a los datos o documentos fuente para la realización de la monitorización, la auditoría, la revisión por el CEIC, así como la inspección del ensayo por las Autoridades Sanitarias.

En este estudio no está previsto que el CRD constituya documento fuente para ningún dato que se recoja a lo largo del mismo.

En aquellos casos de documentos fuente en soporte electrónico, el monitor tendrá acceso a los mismos bajo supervisión del personal del estudio. Si esto no fuese posible, el personal del estudio los proporcionará en papel, firmados y fechados.

### 14 Manejo de los Datos y Archivos de Registro.

#### *Registro de los datos*

El CRD será elaborado antes del inicio del estudio y se realizará en papel. Las anotaciones en el CRD serán comparadas por el monitor del estudio con los contenidos en las historias clínicas de los pacientes.

El monitor del estudio realizará visitas periódicas a los centros del estudio en las que revisará la información registrada por los investigadores en los CRDs y los contrastará con los documentos fuente originales, con objeto de asegurar en conjunción con los investigadores participantes, que los datos recogidos sean exactos, completos y fiables.

Cuando existan dudas sobre la exactitud de alguno de los datos contenidos en el CRD, el monitor del estudio contactará con el investigador para las aclaraciones pertinentes. Todas las correcciones realizadas en el CRD deberán ir firmadas y fechadas por la persona que las realice.

Una vez recogidos los CRDs, se introducirán por duplicado en una base de datos validada, con accesos restringidos por nivel de usuario, provista de filtros de detección de inconsistencias y con trazabilidad de los datos hasta el cierre final de la misma. Si en el momento de la validación de los datos en la base de datos se detectan inconsistencias, se contactará con los centros para su resolución.

#### *Conservación de la documentación del estudio*

El investigador debe mantener un archivo adecuado y exacto sobre la realización del estudio, con toda la documentación para poder verificar posteriormente los datos del mismo.

El investigador deberá conservar la documentación del estudio en un archivo durante un mínimo de 15 años después de haber finalizado o interrumpido el estudio. Después de este periodo, los documentos podrán ser destruidos según la normativa local vigente.

Si el investigador desea asignar los archivos del estudio a una tercera parte o trasladarlos de lugar, deberá informar previamente al PROMOTOR del estudio.

Si el investigador no puede garantizar la conservación del archivo o parte del mismo en el centro de investigación, deberá acordar con el PROMOTOR su archivo en un depósito sellado fuera del centro, de forma que pueda ser devuelto sellado al investigador en caso de auditoría. Allí donde

sean necesarios los documentos fuente para el cuidado de un paciente concreto, se harán copias para el almacenamiento fuera del centro.

Los datos completos de filiación y el consentimiento por escrito se guardarán en el archivo del investigador.

### ***Modificación del protocolo***

Las peticiones por parte de los investigadores para modificar el protocolo se realizarán tras consulta con el PROMOTOR e investigador coordinador, y deberán ser redactadas y acordadas entre ambos.

Todas las modificaciones al protocolo deberán enviarse al CEIC o correspondiente, para informarle y obtener su aprobación de acuerdo con la normativa vigente, y a la AEMPS si procede. Deberá esperarse a la aprobación antes de implementar ninguna modificación, a excepción de aquellos casos en los que los pacientes del estudio corran un riesgo inminente, o cuando los cambios sólo hagan referencia a aspectos administrativos o logísticos del estudio (p.ej. cambio de número de teléfono).

Si se dieran circunstancias que pudieran poner en peligro la seguridad de los pacientes del estudio, el promotor y el investigador adoptarán las medidas urgentes oportunas para proteger a los pacientes de cualquier riesgo inmediato. El promotor informará lo antes posible tanto a la AEMPS como a los CEICs implicados en el ensayo de dichas circunstancias y de las medidas adoptadas.

## **15 Control y Garantía de Calidad**

### ***Procedimientos normalizados de trabajo***

Al firmar este protocolo, el PROMOTOR acepta la responsabilidad de implantar y mantener sistema de control y garantía de calidad con procedimiento normalizado de trabajo por escrito para garantizar que se realizan los estudios y que se generan, documentan y comunican los datos cumpliendo el protocolo, las normas aceptadas sobre BPC y todas las leyes, normas y reglamentos estatales y locales relacionadas con la ejecución del estudio clínico.

### ***Auditoría e inspección***

Al firmar este protocolo, el investigador acepta permitir la monitorización, auditoría, revisión por el CEIC e inspección por las autoridades competentes de los documentos y procedimientos relacionados con el ensayo, y facilitar acceso directo a todos los datos y documentos originales relacionados con el estudio.

El investigador facilitará al PROMOTOR la documentación del estudio con prontitud y en su totalidad previa petición y además la documentación estará disponible en el centro del investigador a petición para inspección, copia, revisión y auditoría en momentos razonables por parte de representantes del PROMOTOR o de cualquier organismo regulador. El investigador acepta tomar con prontitud las medidas razonables solicitadas por el PROMOTOR como

consecuencia de una auditoría para solventar deficiencias en la documentación del estudio y en las hojas de trabajo/CRDs.

El investigador informará sin dilación al PROMOTOR de cualquier inspección de las autoridades sanitarias realizada para este estudio.

Las personas excluidas de la realización o intervención en estudios clínicos por cualquier juez u organismo regulador no podrán realizar ni intervenir en este estudio. El investigador informará inmediatamente por escrito al PROMOTOR si alguna persona implicada en el estudio está excluida, pendiente de exclusión o, en opinión del investigador, amenazada de la misma.

## 16 Financiación y Seguro

El presente ensayo clínico se financiará con un Fondo del Ministerio de Sanidad y Política Social.

El investigador se compromete a no solicitar ninguna compensación económica a los pacientes, a sus compañías de seguros ni a los programas gubernamentales por los procedimientos incluidos en el estudio.

El PROMOTOR contratará un seguro de responsabilidad civil que cubra las responsabilidades del PROMOTOR, del investigador principal y de los investigadores colaboradores y del hospital o centro donde se lleva a cabo el estudio ante posibles daños y perjuicios que afecten o puedan afectar a la salud del paciente incluido en el ensayo desde su inclusión y hasta un año después de su finalización, tal y como exige la normativa vigente.

## 17 Uso de la Información y Política de Publicaciones

El PROMOTOR se encargará de llevar a cabo el registro de los datos del estudio en una base de datos de acceso público de ensayos clínicos (p.ej. [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)), con objeto de posibilitar la publicación posterior de los datos del estudio en una revista de investigación biomédica de reconocido prestigio. Además, y de acuerdo con el RD 223/2004 el PROMOTOR se compromete a la publicación de los resultados del estudio, tanto positivos como negativos.

La publicación que se derive del estudio debe incluir la aportación del investigador y del personal del PROMOTOR. Tal aportación se reflejará en la autoría de la publicación, y siempre que sea posible se establecerá un acuerdo preliminar respecto a la estrategia para el orden de los nombres de los autores antes de la realización del estudio.

El PROMOTOR deberá tener la oportunidad de revisar todos los resúmenes, manuscritos o presentaciones relativas a este estudio 60 días antes de su envío para publicación/presentación.

Toda la información identificada por el PROMOTOR como confidencial deberá eliminarse antes de enviar el manuscrito. La revisión del PROMOTOR podrá acelerarse para cumplir las normas de la publicación.

## 18 Productos en investigación

### 18.1 Fármacos Experimentales:

Los productos en investigación, tanto el tratamiento de ensayo como el de control son productos comercializados y han sido descritos en el apartado 3.3 y subapartados 3.3.1 y 3.3.2, consistentes en:

El tratamiento experimental consistirá en la asociación de Pioglitazona, Espironolactona y Metformina (Abreviadamente PioSpiMet) que se administrará en forma de comprimidos comerciales de los siguientes productos:

- Metformina Sandoz<sup>®</sup>; comprimidos; composición cualitativa y cuantitativa: clorhidrato de metformina, 850 mg. Excipientes, c.s.p. Elaboración: Laboratorios Sandoz. Dosis: 850 mg/día.
- Aldactone Pfizer<sup>®</sup>; comprimidos; composición cualitativa y cuantitativa: espironolactona, 100 mg. Excipientes: Núcleo: sulfato de calcio dihidratado, almidón de maíz sin gluten, polividona K-30, aroma de menta, estearato de magnesio. Cubierta: hidroxipropilmetilcelulosa 2910, 5 cps; hidroxipropilmetilcelulosa 2910, 15 cps; polietilenglicol 400; opaspray M-1-7111 B (blanco). Elaboración: Laboratorios Pfizer. Dosis: 50 mg/día.
- Pioglitazona Cinfa<sup>®</sup>; comprimidos; composición cualitativa y cuantitativa: clorhidrato de pioglitazona, 15 mg. Excipientes, carmelosa de calcio, hidroxipropil celulosa, lactosa monohidrato, estearato de magnesio. Entidad elaboradora: Laboratorios Cinfa. Dosis: 7,5 mg/día.

En el anexo VII a este protocolo se adjuntan las fichas técnicas correspondientes, como “Descripción Técnica de los Productos de Ensayo”.

### 18.2 Fármacos de Control:

El tratamiento de control consistirá en la asociación de:

- -Loette Diario<sup>®</sup>; comprimidos; composición cualitativa y cuantitativa: EE, 20 µg; LNG, 100 µg. Dosis: 1 comp/día.

Ambos productos figuran asociados en comprimidos en un mismo preparado comercial para la administración en una sola toma diaria.

En el anexo VII a este protocolo se adjunta la ficha técnica correspondiente, como “Descripción Técnica de los Productos de Ensayo”.

### **18.3 Identificación del producto**

Los productos de este ensayo son todos comercializados, por lo tanto se conservará el envase y los acondicionadores tal como proceden. Se prepararán unas etiquetas adhesivas para pegar en uno de los bordes del cartonaje de los envases en que se indicará al grupo de tratamiento que procede y el nombre del paciente y se acompañarán de la receta de la prescripción, entregándosele al paciente en cada una de las visitas. Se tomará nota de todas las características del etiquetado para garantizar en todo momento la trazabilidad del estudio, según las normas del sistema de calidad del Servicio de Farmacia.

#### **18.3.1 Manejo y dispensación**

El investigador principal dispondrá las cantidades necesarias de la medicación de ensayo y las conservará en las condiciones adecuadas para proceder a su administración según indicaciones del Servicio de Farmacia de cada Hospital.

#### **18.3.2 Empaquetado y etiquetado**

Toda la medicación de ensayo son medicamentos comercializados por lo que no se van a cambiar sus envoltorios. La medicación será dispensada por el Servicio de Farmacia del hospital, que tomará nota de los lotes y fechas de caducidad. A cada visita se recogerán los envases utilizados y se tomará nota de las posibles incidencias. Como el ensayo se realiza en un contexto pragmático se procurará alterar mínimamente el proceso de dispensación y administración de los medicamentos. A cada paciente se le entregará un cuaderno de tratamiento en que anotará diariamente la medicación tomada y las posibles incidencias.

#### **18.3.3 Solicitudes de suministro**

La petición de los medicamentos de ensayo se efectuará por el investigador principal al Servicio de Farmacia, mediante el modelo de petición incluido en el apartado de documentos y registros asociados.

#### **18.3.4 Depósito del producto en investigación**

Los productos utilizados en este ensayo estarán custodiados en los Servicios de Farmacia y se entregarán según las normas de dispensación de productos en ensayo clínico.

#### **18.3.5 Devolución del producto en Investigación**

Al finalizar el ensayo o bien la fase de administración del fármaco, el investigador principal hará balances de la medicación de ensayo, anotando en la Hoja de Altas/Bajas de medicamentos de ensayo medicación utilizada en la realización del ensayo y la medicación sobrante. A continuación, el investigador principal procede a la devolución de la medicación de ensayo sobrante al servicio de Farmacia, utilizando un procedimiento previamente acordado.

### 18.3.6 Destrucción del producto en Investigación

El servicio de Farmacia procederá a la destrucción de la medicación de ensayo sobrante, firmando un recibo y siguiendo los procedimientos que tengan prevista para la destrucción del producto en Investigación.

## 19 Análisis Estadístico. Valoración de la Eficacia y de la Seguridad

### Planteo general

El análisis estadístico se enfoca a permitir una evaluación cuantitativa global y una interpretación correcta de los resultados del ensayo que permita concluir la eficacia o no del preparado utilizado y la seguridad en las condiciones en que se haya empleado.

Comprende los siguientes puntos:

Estudio de casos:

- Datos clínicos y de seguridad
- Exploraciones complementarias
- Evaluación de variables primarias

### Estadística descriptiva y evaluación de los datos

Se utilizará el programa informático SPSS versión 19.0. Se transformarán matemáticamente las variables cuantitativas que no sigan una distribución normal. Se comprobará (ANOVA), si existen diferencias basales en variables clínicas, analíticas y genéticas (medidas como variables cuantitativas). Para estudiar los cambios longitudinales de las variables clínicas, analíticas y genéticas, se utilizará el modelo lineal general para análisis repetidos, ajustando por factores de confusión en caso necesario. Se analizará la asociación entre parámetros endocrino-metabólicos (variables cuantitativas), clínicos y genéticos (medidos como variables cuantitativas) mediante análisis de correlación y regresión lineal múltiple. Se hará un análisis estadístico por intención a tratar y otro con los pacientes que hayan completado el seguimiento. Se considerará estadísticamente significativo un valor de  $p < 0.05$ .

Se realizará un análisis estadístico de la información generada con los primeros 20 sujetos durante el primer año del estudio. En el segundo año se realizará un análisis transversal de toda la información generada y un análisis longitudinal de los sujetos incluidos durante los primeros 6 meses del estudio.

En esta sección, adicionalmente se reseñan los procedimientos y la estrategia del análisis estadístico.

### **Criterios para el análisis**

Una vez monitorizados los CRDs se introducirán por duplicado en una base de datos validada, con accesos restringidos por nivel de usuario, provista de filtros de detección de inconsistencias y con trazabilidad de los datos hasta el cierre final de la misma.

Una vez que todos los pacientes que permanezcan en el estudio lo hayan completado, se haya completado la revisión médica/científica del mismo, se hayan identificado las personas que han infringido el protocolo, y los datos se hayan declarado completos, se completará el análisis y se preparará un informe del estudio clínico.

### **Número de pacientes/pacientes y tamaño de la muestra**

En un estudio reciente realizado en adolescentes con hiperandrogenismo ovárico asociado a hiperinsulinismo y marcadores de riesgo cardiovascular (PI09/90444, refs.1,2, de la Metodología), tratadas con la combinación PioFluMet (conteniendo como antiandrógeno la flutamida, que en este estudio será sustituida por la espirolactona), se ha observado en el primer año: un aumento de la sensibilidad a la insulina (Homeostasis Model Assessment, HOMA) (3), una disminución de la insulina basal, una reducción de la grasa abdominal total y visceral, del contenido de lípidos intrahepático y de la cIMT. Las cifras de insulina disminuyen un 20% sobre valores basales, la grasa abdominal visceral se reduce en un 25%, el IHLC en un 40%, y el cIMT en un 22%. Los resultados preliminares del estudio FSJD-PioSpiMet-2012 en el que se ha sustituido la flutamida por espirolactona se confirman estos datos (3). Por tanto, si se quiere obtener una potencia mínima de la prueba del 80% con un nivel de significación de  $p < 0.05$  y detectar una diferencia en el cambio de la sensibilidad a la insulina o en las variaciones de la grasa visceral o del contenido de lípidos intrahepático durante los 18 meses de tratamiento de 0,8 múltiplos de DE entre los dos grupos, se deben incluir en cada grupo 17 pacientes. Se ha aumentado el número de pacientes ( $n=20$  por grupo) para garantizar el tamaño muestral en caso de pérdidas en el seguimiento.

Se adoptará, para todos los análisis estadísticos de este estudio, un nivel de confianza ( $1-\alpha$ ) de 0,95. Se fija como objetivo una potencia de los contrastes ( $1-\beta$ ) de 0,80. Para detectar una diferencias de medias tal que se considere un tamaño del efecto mediano (según Cohen,  $d = 0,5$ ), se ha calculado una muestra total final de 102 pacientes. Teniendo en cuenta un 10% de mortandad experimental, la muestra inicial debería estar compuesta por 114 pacientes.

Teniendo en cuenta el objetivo principal del estudio, y la hipótesis de partida, el cálculo de tamaño muestral se ha realizado considerando una prueba t para dos muestras independientes, en un contraste unilateral.

### **Procedimiento para contabilizar datos perdidos, no utilizados y erróneos**

Se utilizarán técnicas de doble verificación en la introducción de datos en la Base de Datos. Los datos considerados no erróneos serán depurados tras una tercera comprobación de dichos datos y estas discrepancias serán contrastadas con el equipo investigador.

Los datos perdidos, esto es, que no sea posible recuperar u obtener serán reportados posteriormente en la presentación de resultados. Siempre se mantendrá el análisis por intención de tratar independientemente de esta circunstancia.

Desde el momento en el que los pacientes o sujetos hayan finalizado su participación en el ensayo prematuramente, no se recogerá ningún dato adicional, si bien los datos recogidos hasta ese momento se utilizarán para el análisis por Intención de Tratar (especialmente en el análisis de seguridad).

### **Cambios en el plan estadístico inicial**

Al igual que el resto de la documentación que pertenece al protocolo, cualquier cambio en el plan estadístico inicial (en el análisis principal o secundarios y que sean cambios importantes), será considerado una modificación del protocolo y se deberá actuar como lo descrito en el apartado correspondiente a modificación del protocolo.

### **Análisis intermedios**

Se realizará un análisis estadístico de la información generada con los primeros 20 sujetos durante el primer año del estudio. En el segundo año se realizará un análisis transversal de toda la información generada y un análisis longitudinal de los sujetos incluidos durante los primeros 6 meses del estudio.

### **Aleatorización**

Los pacientes serán asignados a cada uno de los dos grupos del ensayo (grupo control o experimental) por un generador informático de asignación aleatoria.

La proporción de pacientes que recibirá cada tratamiento será de 1:1. La aleatorización se realizará en bloques y la realizará un investigador independiente (Dra. Marta Díaz) mediante el programa: <http://www.sealedenvelope.com>, y será controlada por edad e índice de masa corporal (IMC).

Los números de los pacientes se asignarán en orden creciente, a medida que sean admitidos en el estudio. Los números de aleatorización serán los números de los pacientes.

## 20 BIBLIOGRAFÍA

### 20.1 Bibliografía General (Antecedentes y Estado Actual del Tema)

1. Carmina E, et al. The diagnosis of polycystic ovary syndrome in adolescents. *Am J Obstet Gynecol* 2010; 203:201.e1-5.
2. Ibáñez L, et al. Hyperinsulinaemic androgen excess in adolescent girls. *Nat Rev Endocrinol* 2014; 100:499-508.
3. National Institutes of Health. Evidence-based methodology workshop on polycystic ovary syndrome, December 3 -5, 2012, Final report [online], <https://prevention.nih.gov/docs/programs/pcos/FinalReport.pdf>.
4. Legro R, et al. Diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98:4565-92.
5. Li L, et al. Clinical and metabolic features of polycystic ovary syndrome among Chinese adolescents. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 2012; 25:390-5.
6. Franks S. Polycystic ovary syndrome in adolescents. *Int J Obes (Lond)* 2008;32:1035-41.
7. Christensen SB, et al. Prevalence of polycystic ovary syndrome in adolescents. *Fertil Steril* 2013; 100:470-7.
8. de Zegher F, et al. Adipose tissue expandability and the early origins of PCOS. *Trends Endocrinol Metab* 2009;20:418-3.
9. Corbett SJ, Morin-Papunen L. The Polycystic Ovary Syndrome and recent human evolution. *Mol Cell Endocrinol* 2013; 373:39-50.
10. Gambineri A, et al. Polycystic ovary syndrome is a risk factor for type 2 diabetes: results from a long-term prospective study. *Diabetes* 2012; 61:2369-74.
11. Calderon-Margalit R, et al. Prospective association of polycystic ovary syndrome with coronary artery calcification and carotid-intima-media thickness: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults Women's study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014; 34:2688-94.
12. Legro RS et al. Letrozole versus clomiphene for infertility in the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 2014; 371:119-29.
13. Diamanti-Kandarakis E, et al. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications. See comment in PubMed Commons below *Endocr Rev* 2012; 33:981-1030.
14. O'Connor A, et al. High-molecular-weight adiponectin is selectively reduced in women with polycystic ovary syndrome independent of body mass index and severity of insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95:1378-85.
15. Hirose H, et al. Serum high-molecular-weight adiponectin as a marker for the evaluation and care of subjects with metabolic syndrome and related disorders. *J Atheroscler Thromb* 2010; 17:1201-11.
16. Koenig W. High-sensitivity C-reactive protein and atherosclerotic disease: from improved risk prediction to risk-guided therapy. See comment in PubMed Commons below *Int J Cardiol* 2013;168:5126-34.

17. de Zegher F, et al. Abundance of circulating preadipocyte factor-1 in early life. *Diabetes Care* 2012; 35:848-9.
18. Lomonaco R, et al. Effect of adipose tissue insulin resistance on metabolic parameters and liver histology in obese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2012; 55:1389-97.
19. Ibáñez L, et al. Oral contraception vs insulin sensitization for 18 months in nonobese adolescents with androgen excess: posttreatment differences in C-reactive protein, intima-media thickness, visceral adiposity, insulin sensitivity, and menstrual regularity. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98:E902-907.
20. Escobar-Morreale H et al. Abdominal adiposity and polycystic ovary syndrome. *Trends Endocrinol Metab* 2007; 18:266-72.
21. Meshkani R et al. Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Clin Biochem* 2009; 42:1331-46.
22. Bonora E, et al. Carotid atherosclerosis and coronary heart disease in the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2003; 26:1251 -57.
23. Shroff R, et al. Young obese women with polycystic ovary syndrome have evidence of early coronary atherosclerosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:4609-14.
24. Virtue S, Vidal-Puig A. It's not how fat you are, it's what you do with it that counts. *PLoS Biol* 2008; 23:e237.
25. Wu S, et al. Obesity induced infertility and hyperandrogenism are corrected by deletion of the insulin receptor in the ovarian theca cell. *Diabetes* 2014; 63:1270-82.
26. Mannerås-Holm L, et al. Adipose tissue has aberrant morphology and function in PCOS: enlarged adipocytes and low serum adiponectin, but not circulating sex steroids, are strongly associated with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96:E304-11.
27. Berends LM, et al. Early determinants of type-2 diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2012; 26:569-80.
28. Chen YH, et al. miRNA-93 inhibits GLUT4 and is overexpressed in adipose tissue of polycystic ovary syndrome patients and women with insulin resistance. *Diabetes* 2013; 62:2278-86.
29. Long W, et al. Characterization of serum microRNAs profile of PCOS and identification of novel non-invasive biomarkers. *Cell Physiol Biochem* 2014; 33:1304-15.
30. Zhao L. The gut microbiota and obesity: from correlation to causality. *Nat Rev Microbiol* 2013; 11:639-47.
31. Tremellen K et al. Dysbiosis of Gut Microbiota (DOGMA) -a novel theory for the development of Polycystic Ovarian Syndrome. *Med Hypotheses* 2012; 79:104-12.
32. Masi S, et al. Rate of telomere shortening and cardiovascular damage: a longitudinal study in the 1946 British Birth Cohort. *Eur Heart J* 2014; 35:3296-303.
33. Zhao J. et al. Short leukocyte telomere length predicts risk of diabetes in American indians: the strong heart family study. *Diabetes* 2014; 63:354-62.
34. Li Q. et al. A possible new mechanism in the pathophysiology of polycystic ovary syndrome (PCOS): the discovery that leukocyte telomere length is strongly associated with PCOS. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99:E234-40.

35. de Zegher F, et al. Long telomeres after long insulin sensitization in adolescent girls with hyperinsulinemic androgen excess: results of a randomized trial over 24 months. *JAMA Pediatrics* 2015 (in press).
36. McAllister JM, et al. Functional genomics of PCOS: from GWAS to molecular mechanisms. *Trends Endocrinol Metab* 2015; 26:118-24.
37. Cui L, et al. Polycystic ovary syndrome susceptibility single nucleotide polymorphisms in women with a single PCOS clinical feature. *Hum Reprod* 2015; 30:732-6.
38. Brower MA, et al. Further investigation in europeans of susceptibility variants for polycystic ovary syndrome discovered in genome-wide association studies of Chinese individuals. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:E182-6.
39. Mannerås-Holm L, et al. Gene expression in subcutaneous adipose tissue differs in women with polycystic ovary syndrome and controls matched pair-wise for age, body weight, and body mass index. *Adipocyte* 2014; 3:190-6.
40. Diaz M, et al. Ethinyl estradiol-cyproterone acetate versus low-dose pioglitazone-flutamide-metformin for adolescent girls with androgen excess: divergent effects on CD163, TWEAK receptor, ANGPTL4, and LEPTIN expression in subcutaneous adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97:3630-8.
41. Ibáñez L, et al. Treatment of androgen excess in adolescent girls: ethinylestradiol-cyproteroneacetate *versus* low-dose pioglitazone-flutamide-metformin. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 3361–6.
42. Ibáñez L, et al. Low-dose flutamide-metformin therapy for hyperinsulinemic hyperandrogenism in non-obese adolescents and women. *Hum Reprod Update* 2006; 12:243-52.
43. Mastorakos G, et al. Effects of two forms of combined oral contraceptives on carbohydrate metabolism in adolescents with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2006; 85:420-7.
44. Tfayli H, et al. Drospirenone/ethinyl estradiol *versus* rosiglitazone treatment in overweight adolescents with polycystic ovary syndrome: comparison of metabolic, hormonal, and cardiovascular risk factors. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96:1311-9.
45. Díaz M, et al. Ethinyl estradiol-cyproterone acetate versus low-dose pioglitazone-flutamide-metformin for adolescent girls with androgen excess: divergent effects on *CD163, TWEAK* Receptor, *ANGPTL4*, and *LEPTIN* expression in subcutaneous adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; Jul 12. [Epub ahead of print].
46. Voelker R. Risk of blood clots higher for oral contraceptives with certain progestins. *JAMA* 2011; 306:2206.
47. Raps M, et al. Sex hormone-binding globulin as a marker for the thrombotic risk of hormonal contraceptives. *J Thromb Haemost* 2012; 10:992-7.
48. Lidegaard Ø, et al. Thrombotic stroke and myocardial infarction with hormonal contraception. *N Engl J Med* 2012; 366:2257-66.
49. Ibáñez L, et al. Combined low-dose pioglitazone, flutamide, and metformin for women with androgen excess. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:1710-4.
50. Ibáñez L, et al. Pioglitazone (7.5 mg/d) added to flutamide-metformin in women with androgen excess: additional increments of visfatin and high-molecular-weight adiponectin. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008; 68:317-20.
51. Ibáñez L, et al. Ethinylestradiol-drospirenone, flutamide-metformin, or both for adolescents and

- women with hyperinsulinemic hyperandrogenism: opposite effects on adipocytokines and body adiposity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89:1592-7.
52. Gambineri A, et al. Treatment with flutamide, metformin, and their combination added to a hypocaloric diet in overweight-obese women with polycystic ovary syndrome: a randomized, 12-month, placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91:3970-80.
  53. Zou MH, et al. Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo. Role of mitochondrial reactive nitrogen species. *J Biol Chem* 2004; 279:43940-51.
  54. Dunaif A. Drug insight: insulin-sensitizing drugs in the treatment of polycystic ovary syndrome –a reappraisal. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008; 4:272-283.
  55. Brufani C, et al. Use of metformin in pediatric age. *Pediatric Diabetes* 2011; 12:580-8.

## 20.2 Bibliografía Específica de la Metodología

1. Ibáñez L, et al. Oral contraception vs insulin sensitization for 18 months in nonobese adolescents with androgen excess: posttreatment differences in C-reactive protein, intima-media thickness, visceral adiposity, insulin sensitivity, and menstrual regularity. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98:E902-907.
2. Matthews DR, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28:412-9.
3. Ibáñez L. Insulin sensitization and antiandrogens for adolescent girls with androgen excess. En: *Polycystic ovary syndrome: diagnostic & therapeutic challenges in adolescence*. Program of the 97th Annual Meeting of the Endocrine Society (Symposia S52-3). San Diego, USA, 7 de marzo de 2015.
4. CPMP/ICH/2711/99 (2001). Clinical Investigation of Medicinal Products in the Paediatric Population (International Conference on Harmonisation Expert Working Group, Topic E 11).
5. Ferrández-Longás A, et al. Estudio longitudinal de crecimiento y desarrollo. Centro Andrea Prader. Zaragoza 1980-2002. In ERGON, ed. *Patrones de crecimiento y desarrollo en España*. Atlas de gráficas y tablas., pp 61-115. Madrid: 2004.
6. Goran MI. Measurement issues related to studies of childhood obesity: assessment of body composition, body fat distribution, physical activity, and food intake. *Pediatrics* 1998; 101:505-18.
7. Ferriman D, Gallwey JD. Clinical assessment of body hair growth in women. *J Clin Endocrinol Metab* 1961; 21:1440-7.
8. Lomonaco R, et al. Effect of adipose tissue insulin resistance on metabolic parameters and liver histology in obese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2012; 55:1389-97.
9. de Zegher F, et al. Abundance of circulating preadipocyte factor-1 in early life. *Diabetes Care* 2012; 35:848-9.
10. Codner E, et al. Polycystic ovarian morphology in postmenarchal adolescents. *Fertil Steril* 2011; 95:702-6.
11. Bazzocchi A, et al. Accuracy, reproducibility and repeatability of ultrasonography in the assessment of abdominal adiposity. *Acad Radiol* 2011; 18:1133-43.

12. Díaz M, et al. Ethinylestradiol-cyproteroneacetate versus low-dose pioglitazone-flutamide-metformin for adolescent girls with androgen excess: divergent effects on CD163, TWEAK receptor, ANGPTL4 and LEPTIN expression in subcutaneous adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97:3630-8.
13. Gentleman, RC, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 2004; 5:R80.
14. Long W, Zhaob C, Ji C, Ding H, Cui Y, Guo X, Shen R, Liu J. Characterization of serum microRNAs profile of PCOS and identification of novel non-invasive biomarkers. *Cell Physiol Biochem* 2014; 33:1304-15.
15. Caporaso, JG, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J* 2012; 6:1621-4.
16. Wang Q, et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73:5261-7.
17. Rideout, JR, et al. Subsampled open-reference clustering creates consistent, comprehensive OTU definitions and scales to billions of sequences. *Peer J* 2014; 2: e545.
18. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res* 2002; 30:e47.
19. Lança V, et al. Quantitative telomerase activity in circulating human leukocytes: utility of real-time telomeric repeats amplification protocol (RQ-TRAP) in a clinical/epidemiological setting. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:870-3.
20. Brower MA, et al. Further investigation in europeans of susceptibility variants for polycystic ovary syndrome discovered in genome-wide association studies of Chinese individuals. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100:E182-6.
21. Gallego-Escuredo JM, et al. Differentially altered molecular signature of visceral adipose tissue in HIV-1-associated lipodystrophy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2013; 64:142-8.
22. Buck ML. Aldosterone inhibitors in infants and children. *Pediatr Phar* 2004; 10(1).
23. Pediatric investigation of nonalcoholic fatty liver disease and pioglitazone CIH. CRADA/NIDDK Collaboration Proposal (2008).
24. Mitchel EB, Lavine JE. Review article: the management of paediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2014; 40:1155-70.
25. Christensen ML, et al. Single- and multiple-dose pharmacokinetics of pioglitazone in adolescents with type 2 diabetes. *J Clin Pharmacol* 2005; 45:1137-44.
26. Sánchez-Infantes D, et al. Clinical pharmacokinetics of metformin in girls at age 9 years. *Clin Pharmacokinet* 2011; 50:735-738.
27. Ibáñez L, et al. Hyperinsulinaemic androgen excess in adolescent girls. *Nat Rev Endocrinol* 2014; 100:499-508.
28. Du Q, et al. A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials comparing pioglitazone versus metformin in the treatment of polycystic ovary syndrome. *Cur Med Res Opin* 2012; 28:723-30.
29. Levin D, et al. Pioglitazone and bladder cancer risk: a multipopulation pooled, cumulative exposure analysis. *Diabetologia* 2015; 58:493-204.
30. Ganie M.A., et al. Improved efficacy of low dose spironolactone and metformin combination than either drug alone in the management of women with polycystic ovary syndrome (PCOS): a six month, open label, randomized study. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: 3599-607.

31. Spritzer PM, et al. Spironolactone as a single agent for long-term therapy of hirsute patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2000; 52:587-94.
32. Matthews DR, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28:412-9.
33. Lomonaco R, et al. Effect of adipose tissue insulin resistance on metabolic parameters and liver histology in obese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2012; 55:1389-97.
34. Grace K, et al. Oral spironolactone in post-teenage female patients with acne vulgaris: practical considerations for the clinician based on current data and clinical experience. *J Clin Aesthet Dermatol* 2012; 5: 37–50.
35. Spritzer PM, et al. Spironolactone as a single agent for long-term therapy of hirsute patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2000; 52:587-94.
36. Lobo RA, et al. The effects of two doses of spironolactone on serum androgens and anagen hair in hirsute women. *Fertil Steril* 1985; 43:200-5.

## Anexo I Centros e Investigadores Participantes

### Equipo investigador

El ensayo se llevará a cabo en el hospital de Sant Joan de Déu de Barcelona.

El equipo investigador forma parte de la Sección de Endocrinología, Hospital Sant Joan de Déu, dirigido por la investigadora principal Dra. Lourdes Ibañez y coordinadora del proyecto, que cuenta con la colaboración de la Dra. Paula Casano, para llevar a cabo inclusión y seguimiento de pacientes, la recogida de datos y análisis de datos, además en la elaboración de manuscritos. La Dra. Ibañez y la Dra. Giorgia Sebastiani llevarán a cabo la cuantificación de la adiposidad visceral y del grosor de la íntima carotídea (ecografía). Adicionalmente realizarán el proceso de tabulación y análisis de datos ecográficos.

En el Servicio de Obstetricia y Ginecología, Hospital Sant Joan de Déu colaborará la Dra. Cristina Salvador con la inclusión y seguimiento de pacientes, así como en la recogida y análisis de datos.

Los análisis clínicos generales y las exploraciones complementarias se efectuarán en los servicios de Laboratorio del Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona. Las muestras de saliva, fecales y el tejido adiposo subcutáneo se almacenarán en el Laboratorio de Investigación de la Fundación Sant Joan de Déu, donde se realizarán los estudios de polimorfismos de *DENNDIA* en sangre periférica y de expresión génica en TAB. La Dra Marta Díaz está especializada en las determinaciones particulares del ensayo, específicamente, en la valoración de las adipoquinas (adiponectina total y de alto peso molecular, osteocalcina total y decarboxilada), que se realizara exclusivamente en el Hospital Sant Joan de Déu. El laboratorio hormonal del Hospital Sant Joan de Déu posee los analizadores necesarios para la determinación de las variables analíticas de estudio, como un analizador por quimioluminiscencia para determinaciones automáticas de parámetros hormonales. Adicionalmente la Dra. Marta Díaz colaborará en la recogida y análisis de datos y elaboración de manuscritos. Los estudios de miRNAs se realizarán entre el Laboratorio de Investigación de la Fundación Sant Joan de Déu y la empresa Bioarray SL (Alicante). El estudio del microbioma se realiza por ASCIDEA SL (Barcelona).

Los estudios radiológicos, de imagen y otras pruebas complementarias se efectuarán en el CETIR Centre Mèdic Barcelona, con la colaboración del Dr. Luis del Rio, en las determinaciones de DXA y RM abdomen y la Dra. Giorgia Sebastiani en determinaciones de IMT carotídeo.

El profesor Francesc Villarroya, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Barcelona e IP de CIBEROBN, asesorará al equipo investigador en los estudios de expresión en tejido adiposo. El Profesor Francis de Zegher, de la Universidad de Lovaina, asesorará al equipo investigador en el análisis e interpretación de datos y en la elaboración de futuros manuscritos.

### Centros donde se realizará el ensayo

La coordinación y el desarrollo clínico de este ensayo se llevará a cabo en el: Servicios de Endocrinología del Hospital Sant Joan de Déu, Esplugues de Llobregat. Barcelona.

## **Anexo II. – Formulario de notificación de acontecimientos adversos y Guia de Cumplimentación**

### **Anexo III DECLARACIÓN DE HELSINKI**

#### Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos

Adoptada por la 18ª Asamblea Médica Mundial, Helsinki, Finlandia, junio 1964 y enmendada por la 29ª Asamblea Médica Mundial, Tokio, Japón, octubre 1975, 35ª Asamblea Médica Mundial, Venecia, Italia, octubre 1983, 41ª Asamblea Médica Mundial, Hong Kong, septiembre 1989, 48ª Asamblea General Somerset West, Sudáfrica, octubre 1996, 52ª Asamblea General, Edimburgo, Escocia, octubre 2000, Nota de Clarificación del Párrafo 29, agregada por la Asamblea General de la AMM, Washington 2002, Nota de Clarificación del Párrafo 30, agregada por la Asamblea General de la AMM, Tokio 2004, 59ª Asamblea General, Seúl, Corea, octubre 2008

#### **A. INTRODUCCION**

1. La Asociación Médica Mundial (AMM) ha promulgado la Declaración de Helsinki como una propuesta de principios éticos para investigación médica en seres humanos, incluida la investigación del material humano y de información identificables.

La Declaración debe ser considerada como un todo y un párrafo no debe ser aplicado sin considerar todos los otros párrafos pertinentes.

2. Aunque la Declaración está destinada principalmente a los médicos, la AMM insta a otros participantes en la investigación médica en seres humanos a adoptar estos principios.

3. El deber del médico es promover y velar por la salud de los pacientes, incluidos los que participan en investigación médica. Los conocimientos y la conciencia del médico han de subordinarse al cumplimiento de ese deber.

4. La Declaración de Ginebra de la Asociación Médica Mundial vincula al médico con la fórmula "velar solícitamente y ante todo por la salud de mi paciente", y el Código Internacional de Ética Médica afirma que: "El médico debe considerar lo mejor para el paciente cuando preste atención médica".

5. El progreso de la medicina se basa en la investigación que, en último término, debe incluir estudios en seres humanos. Las poblaciones que están subrepresentadas en la investigación médica deben tener un acceso apropiado a la participación en la investigación.

6. En investigación médica en seres humanos, el bienestar de la persona que participa en la investigación debe tener siempre primacía sobre todos los otros intereses.

7. El propósito principal de la investigación médica en seres humanos es comprender las causas, evolución y efectos de las enfermedades y mejorar las intervenciones preventivas, diagnósticas y terapéuticas (métodos, procedimientos y tratamientos). Incluso, las mejores intervenciones actuales deben ser evaluadas continuamente a través de la investigación para que sean seguras, eficaces, efectivas, accesibles y de calidad.

8. En la práctica de la medicina y de la investigación médica, la mayoría de las intervenciones implican algunos riesgos y costos.

9. La investigación médica está sujeta a normas éticas que sirven para promover el respeto a todos los seres humanos y para proteger su salud y sus derechos individuales. Algunas poblaciones sometidas a la investigación son particularmente vulnerables y necesitan protección especial. Estas incluyen a los que no

pueden otorgar o rechazar el consentimiento por sí mismos y a los que pueden ser vulnerables a coerción o influencia indebida.

10. Los médicos deben considerar las normas y estándares éticos, legales y jurídicos para la investigación en seres humanos en sus propios países, al igual que las normas y estándares internacionales vigentes. No se debe permitir que un requisito ético, legal o jurídico nacional o internacional disminuya o elimine cualquiera medida de protección para las personas que participan en la investigación establecida en esta Declaración.

## **B. PRINCIPIOS PARA TODA INVESTIGACION MÉDICA**

1. En la investigación médica, es deber del médico proteger la vida, la salud, la dignidad, la integridad, el derecho a la autodeterminación, la intimidad y la confidencialidad de la información personal de las personas que participan en investigación.
2. La investigación médica en seres humanos debe conformarse con los principios científicos generalmente aceptados y debe apoyarse en un profundo conocimiento de la bibliografía científica, en otras fuentes de información pertinentes, así como en experimentos de laboratorio correctamente realizados y en animales, cuando sea oportuno. Se debe cuidar también del bienestar de los animales utilizados en los experimentos.
3. Al realizar una investigación médica, hay que prestar atención adecuada a los factores que puedan dañar el medio ambiente.
4. El proyecto y el método de todo estudio en seres humanos debe describirse claramente en un protocolo de investigación. Este debe hacer referencia siempre a las consideraciones éticas que fueran del caso y debe indicar cómo se han considerado los principios enunciados en esta Declaración. El protocolo debe incluir información sobre financiamiento, patrocinadores, afiliaciones institucionales, otros posibles conflictos de interés e incentivos para las personas del estudio y estipulaciones para tratar o compensar a las personas que han sufrido daños como consecuencia de su participación en la investigación. El protocolo debe describir los arreglos para el acceso después del ensayo a intervenciones identificadas como beneficiosas en el estudio o el acceso a otra atención o beneficios apropiadas.
5. El protocolo de la investigación debe enviarse, para consideración, comentario, consejo y aprobación, a un comité de ética de investigación antes de comenzar el estudio. Este comité debe ser independiente del investigador, del patrocinador o de cualquier otro tipo de influencia indebida. El comité debe considerar las leyes y reglamentos vigentes en el país donde se realiza la investigación, como también las normas internacionales vigentes, pero no se debe permitir que éstas disminuyan o eliminen ninguna de las protecciones para las personas que participan en la investigación establecidas en esta Declaración. El comité tiene el derecho de controlar los ensayos en curso. El investigador tiene la obligación de proporcionar información del control al comité, en especial sobre todo incidente adverso grave. No se debe hacer ningún cambio en el protocolo sin la consideración y aprobación del comité.
6. La investigación médica en seres humanos debe ser llevada a cabo sólo por personas con la formación y calificaciones científicas apropiadas. La investigación en pacientes o voluntarios sanos necesita la supervisión de un médico u otro profesional de la salud competente y calificado apropiadamente. La responsabilidad de la protección de las personas que toman parte en la investigación debe recaer siempre en un médico u otro profesional de la salud y nunca en los participantes en la investigación, aunque hayan otorgado su consentimiento.

7. La investigación médica en una población o comunidad con desventajas o vulnerable sólo se justifica si la investigación responde a las necesidades y prioridades de salud de esta población o comunidad y si existen posibilidades razonables de que la población o comunidad, sobre la que la investigación se realiza, podrá beneficiarse de sus resultados.
8. Todo proyecto de investigación médica en seres humanos debe ser precedido de una cuidadosa comparación de los riesgos y los costos para las personas y las comunidades que participan en la investigación, en comparación con los beneficios previsibles para ellos y para otras personas o comunidades afectadas por la enfermedad que se investiga.
9. Todo ensayo clínico debe ser inscrito en una base de datos disponible al público antes de aceptar a la primera persona.
10. Los médicos no deben participar en estudios de investigación en seres humanos a menos de que estén seguros de que los riesgos inherentes han sido adecuadamente evaluados y de que es posible hacerles frente de manera satisfactoria. Deben suspender inmediatamente el experimento en marcha si observan que los riesgos que implican son más importantes que los beneficios esperados o si existen pruebas concluyentes de resultados positivos o beneficiosos.
11. La investigación médica en seres humanos sólo debe realizarse cuando la importancia de su objetivo es mayor que el riesgo inherente y los costos para la persona que participa en la investigación.
12. La participación de personas competentes en la investigación médica debe ser voluntaria. Aunque puede ser apropiado consultar a familiares o líderes de la comunidad, ninguna persona competente debe ser incluida en un estudio, a menos que ella acepte libremente.
13. Deben tomarse toda clase de precauciones para resguardar la intimidad de la persona que participa en la investigación y la confidencialidad de su información personal y para reducir al mínimo las consecuencias de la investigación sobre su integridad física, mental y social.
14. En la investigación médica en seres humanos competentes, cada individuo potencial debe recibir información adecuada acerca de los objetivos, métodos, fuentes de financiamiento, posible conflictos de intereses, afiliaciones institucionales del investigador, beneficios calculados, riesgos previsibles e incomodidades derivadas del experimento y todo otro aspecto pertinente de la investigación. La persona potencial debe ser informada del derecho de participar o no en la investigación y de retirar su consentimiento en cualquier momento, sin exponerse a represalias. Se debe prestar especial atención a las necesidades específicas de información de cada individuo potencial, como también a los métodos utilizados para entregar la información. Después de asegurarse de que el individuo ha comprendido la información, el médico u otra persona calificada apropiadamente debe pedir entonces, preferiblemente por escrito, el consentimiento informado y voluntario de la persona. Si el consentimiento no se puede otorgar por escrito, el proceso para lograrlo debe ser documentado y atestiguado formalmente.
15. Para la investigación médica en que se utilice material o datos humanos identificables, el médico debe pedir normalmente el consentimiento para la recolección, análisis, almacenamiento y reutilización. Podrá haber situaciones en las que será imposible o impracticable obtener el consentimiento para dicha investigación o podría ser una amenaza para su validez. En esta situación, la investigación sólo puede ser realizada después de ser considerada y aprobada por un comité de ética de investigación.

16. Al pedir el consentimiento informado para la participación en la investigación, el médico debe poner especial cuidado cuando el individuo potencial está vinculado con él por una relación de dependencia o si consiente bajo presión. En una situación así, el consentimiento informado debe ser pedido por una persona calificada adecuadamente y que nada tenga que ver con aquella relación.
17. Cuando el individuo potencial sea incapaz, el médico debe pedir el consentimiento informado del representante legal. Estas personas no deben ser incluidas en la investigación que no tenga posibilidades de beneficio para ellas, a menos que ésta tenga como objetivo promover la salud de la población representada por el individuo potencial y esta investigación no puede realizarse en personas competentes y la investigación implica sólo un riesgo y costo mínimos.
18. Si un individuo potencial que participa en la investigación considerado incompetente es capaz de dar su asentimiento a participar o no en la investigación, el médico debe pedirlo, además del consentimiento del representante legal. El desacuerdo del individuo potencial debe ser respetado.
19. La investigación en individuos que no son capaces física o mentalmente de otorgar consentimiento, por ejemplo los pacientes inconscientes, se puede realizar sólo si la condición física/mental que impide otorgar el consentimiento informado es una característica necesaria de la población investigada. En estas circunstancias, el médico debe pedir el consentimiento informado al representante legal. Si dicho representante no está disponible y si no se puede retrasar la investigación, el estudio puede llevarse a cabo sin consentimiento informado, siempre que las razones específicas para incluir a individuos con una enfermedad que no les permite otorgar consentimiento informado hayan sido estipuladas en el protocolo de la investigación y el estudio haya sido aprobado por un comité de ética de investigación. El consentimiento para mantenerse en la investigación debe obtenerse a la brevedad posible del individuo o de un representante legal.
20. Los autores, directores y editores todos tienen obligaciones éticas con respecto a la publicación de los resultados de su investigación. Los autores tienen el deber de tener a la disposición del público los resultados de su investigación en seres humanos y son responsables de la integridad y exactitud de sus informes. Deben aceptar las normas éticas de entrega de información. Se deben publicar tanto los resultados negativos e inconclusos como los positivos o de lo contrario deben estar a la disposición del público. En la publicación se debe citar la fuente de financiamiento, afiliaciones institucionales y conflictos de intereses. Los informes sobre investigaciones que no se ciñan a los principios descritos en esta Declaración no deben ser aceptados para su publicación.

### **.C. PRINCIPIOS APLICABLES CUANDO LA INVESTIGACION MEDICA SE COMBINA CON LA ATENCION MEDICA**

1. El médico puede combinar la investigación médica con la atención médica, sólo en la medida en que tal investigación acredite un justificado valor potencial preventivo, diagnóstico o terapéutico y si el médico tiene buenas razones para creer que la participación en el estudio no afectará de manera adversa la salud de los pacientes que toman parte en la investigación.

2. Los posibles beneficios, riesgos, costos y eficacia de toda intervención nueva deben ser evaluados mediante su comparación con la mejor intervención probada existente, excepto en las siguientes circunstancias:

- El uso de un placebo, o ningún tratamiento, es aceptable en estudios para los que no hay una intervención probada existente.

- Cuando por razones metodológicas, científicas y apremiantes, el uso de un placebo es necesario para determinar la eficacia y la seguridad de una intervención que no implique un riesgo, efectos adversos graves o daño irreversible para los pacientes que reciben el placebo o ningún tratamiento. Se debe tener muchísimo cuidado para evitar abusar de esta opción.

3. Al final de la investigación, todos los pacientes que participan en el estudio tienen derecho a ser informados sobre sus resultados y compartir cualquier beneficio, por ejemplo, acceso a intervenciones identificadas como beneficiosas en el estudio o a otra atención apropiada o beneficios.

4. El médico debe informar cabalmente al paciente los aspectos de la atención que tienen relación con la investigación. La negativa del paciente a participar en una investigación o su decisión de retirarse nunca debe perturbar la relación médico-paciente.

5. Cuando en la atención de un enfermo las intervenciones probadas han resultado ineficaces o no existen, el médico, después de pedir consejo de experto, con el consentimiento informado del paciente o de un representante legal autorizado, puede permitirse usar intervenciones no comprobadas, si, a su juicio, ello da alguna esperanza de salvar la vida, restituir la salud o aliviar el sufrimiento. Siempre que sea posible, tales intervenciones deben ser investigadas a fin de evaluar su seguridad y eficacia. En todos los casos, esa información nueva debe ser registrada y, cuando sea oportuno, puesta a disposición del público.

**Anexo IV Hoja de información al paciente y Consentimiento Informado**

Se entregarán en documento aparte.

**Anexo V**

**Cuaderno de Recogida de Datos (CRD)**

Se entregará en documento aparte.

## Anexo VI Firma del protocolo por el promotor e investigador principal

### PROMOTOR

NOMBRE EN LETRAS DE  
IMPRESA

FIRMA

FECHA

### INVESTIGADOR PRINCIPAL

- Acepto realizar este estudio clínico de acuerdo con el diseño descrito en este protocolo y cumplir todas sus normas; sólo son aceptables las desviaciones del protocolo acordadas mutuamente mediante una enmienda al protocolo.
- Acepto realizar este estudio de acuerdo con las normas generalmente aceptadas sobre Buena Práctica Clínica y legislación aplicable vigente.
- Acepto también comunicar toda la información o los datos de acuerdo con el protocolo y, en particular, acepto comunicar todos los acontecimientos adversos graves según se define en el mismo.
- Acepto también utilizar todos los suministros clínicos proporcionados por el PROMOTOR y recoger y manipular todas las muestras clínicas de acuerdo con el protocolo.
- Entiendo que se utilizará y divulgará información que me identifica según se describe en el protocolo.
- Dado que la información contenida en este protocolo es confidencial, soy consciente de que se prohíbe su divulgación a terceros, salvo las personas implicadas en la aprobación, supervisión o realización del estudio. Garantizaré que se toman las precauciones necesarias para proteger tal información de posibles pérdidas, revelaciones involuntarias o accesos por parte de terceros.
- He leído este protocolo y acepto llevar a cabo este ensayo clínico de acuerdo con todas las estipulaciones del protocolo según la Ley 29/2006 de garantías de uso racional de los medicamentos y productos sanitarios, el Real Decreto 223/2004 por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos y la Orden SCO 256/2007, sobre la aplicación de las normas de Buena Práctica Clínica. Así mismo se efectuará según la declaración de Helsinki del año 2008 y demás normativas internacionales aplicables.

NOMBRE EN LETRAS DE  
IMPRESA

FIRMA

FECHA

## Anexo VII Fichas técnicas de los medicamentos utilizados en el estudio.

Se adjuntan en documento aparte, las siguientes fichas técnicas:

- Metformina Sandoz<sup>®</sup>; comprimidos; composición cualitativa y cuantitativa: clorhidrato de metformina, 850 mg. Excipientes, c.s.p. Elaboración: Laboratorios Sandoz. Dosis: 850 mg/día.
- Aldactone Pfizer<sup>®</sup>; comprimidos; composición cualitativa y cuantitativa: espironolactona, 100 mg. Excipientes: Núcleo: sulfato de calcio dihidratado, almidón de maíz sin gluten, polividona K-30, aroma de menta, estearato de magnesio. Cubierta: hidroxipropilmetilcelulosa 2910, 5 cps; hidroxipropilmetilcelulosa 2910, 15 cps; polietilenglicol 400; opaspray M-1-7111 B (blanco). Elaboración: Laboratorios Pfizer. Dosis: 50 mg/día.
- Pioglitazona Cinfa<sup>®</sup>; comprimidos; composición cualitativa y cuantitativa: clorhidrato de pioglitazona, 15 mg. Excipientes, carmelosa de calcio, hidroxipropil celulosa, lactosa monohidrato, estearato de magnesio. Entidad elaboradora: Laboratorios Cinfa. Dosis: 7,5 mg/día.
- Loette Diario<sup>®</sup>; comprimidos; composición cualitativa y cuantitativa: EE, 20 µg; LNG, 100 µg. Dosis: 1 comp/día. Laboratorio: Wyeth Farma, S.A