

UNIVERSITATEA “LUCIAN BLAGA” SIBIU
FACULTATEA DE MEDICINĂ VICTOR PAPILIAN

Rezistența la insulină în sindromul ovarelor polichistice

REZUMAT TEZĂ DOCTORAT

Conducător științific:

Prof. Univ. Dr. Ion Gh. Totoian

Doctorand:

Florina Ioana Gliga

CUPRINS

ABREVIERI.....	1
INTRODUCERE.....	2
CAPITOLUL I - SINDROMUL OVARELOR POLICHISTICE.....	1
1.1. Definiție și diagnostic – consens și controverse.....	1
1.2 Etiopatogenie.....	3
1.3. Noțiuni de fiziologie.....	4
1.4. Teorii etiopatogenetice în SOPC.....	6
1.4.1. Ipoteza disfuncției hipotalamo-hipofizare.....	7
1.4.2. Ipoteza hiperandrogenismului primar ovarian și adrenal.....	10
1.4.3. Ipoteza rezistenței la insulină.....	11
1.4.4. Ipoteza genetică.....	13
1.5.Tablou clinic.....	14
1.6.Investigatii paraclinice.....	18
1.6.1.Evaluarea paraclinică metabolică și hormonală.....	18
1.6.2.Imagistica în sindromul de ovar polichistic.....	21
1.7. Diagnostic diferențial.....	22
1.8.Riscuri și complicații.....	23
1.8.1.Obezitatea în SOPC.....	24
1.8.2.Riscul de diabet, sindrom metabolic, și boli cardiovasculare în SOPC.....	26
1.8.3.Riscul de cancer ginecologice.....	28
1.8.4. SOPC și complicații ale sarcinii.....	28
1.9.Tratament.....	29
CAPITOLUL II - INSULINO-REZISTENȚA DIN SINDROMUL DE OVAR POLICHISTIC.....	36
2.1 Insulino-rezistența.....	36
2.2 Țesuturile țintă pentru acțiunea insulinei.....	37
2.3 Determinarea paraclinică a insulino-rezistenței.....	42
CAPITOLUL III - GENETICA SINDROMULUI DE OVAR POLICHISTIC.....	44
3.1.Gene candidate în SOPC.....	44
3.1.1. Gena receptorului de insulină (INSR).....	47
3.1.2.Gena PPAR- γ 2.....	47
3.2. Metode de identificare a genelor implicate în SOPC.....	49
3.2.1. Principiile metodelor.....	49
3.2.2. Markerii utilizați în studiile de asociere și linkage.....	50
CAPITOLUL IV STUDIUL A – Studiul polimorfismului rs2252673 a genei INSR.....	51
4.1.Introducere.....	51
4.2. Subiecți și metode.....	52
4.2.1. Investigarea clinică și paraclinică a lotului INSR.....	52
4.2.2. Dezvoltarea metodei de genotipare.....	54
4.2.3.Analiza asocierii genotipurilor INSR cu SOPC.....	69
4.3. Rezultate.....	70
4.3.1. Date statistice ale aspectelor fenotipice ale loturilor.....	70
4.3.2.Genotiparea polimorfismului rs 2252673 INSR.....	83
4.3.3.Analiza statistică a asocierii SNP-ului rs2252673 cu SOPC.....	93
4.4.Discuții.....	99
4.4.1. Caracteristicile fenotipice ale lotului.....	101
4.4.2. Genotiparea prin analiză HRM a rs2252673 a genei INSR.....	108

4.4.3. Studiul de asociere SOPC – rs2252673 a genei INSR.....	112
CAPITOLUL V STUDIUL B Studiul polimorfismului Pro12Ala a genei PPAR- γ în relație cu SOPC	116
5.1. Introducere	116
5.2. Material și metodă.....	117
5.2.1. Analiza retrospectivă a datelor clinice și paraclinice.....	117
5.2.2. Genotiparea polimorfismului Pro12Ala a genei PPAR- γ	118
5.2.3. Analiza asocierii genotipurilor PPAR- γ cu SOPC	120
5.3. Rezultatele.....	122
5.3.1. Caracterizarea fenotipică a lotului.....	122
5.3.2. Analiza genotipurilor PPAR- γ	131
5.3.3. Analiza asocierii genotipurilor cu SOPC	132
5.4. Discuții	135
VI. DISCUȚII GENERALE	143
VII. CONCLUZII.....	147
Bibliografie.....	151
Anexa 1	166
Anexa 2	169
Anexa 3	171
Anexa 4	172
Anexa 5	175

INTRODUCERE

Sindromul ovarelor polichistice este o afecțiune heterogenă care asociază anovulație cronică, hiperandrogenism și tulburări metabolice care afectează aproximativ 5-10% din femeile aflate în perioada fertilă. Fiind o afecțiune cu diverse moduri de prezentare și cu etiologie încă necunoscută, definiția și criteriile de diagnostic ale SOPC sunt în continuare controversate.

Etiologia sindromului de ovar polichistic nu este în întregime înțeleasă, sindromul rezultând din interacțiunea factorilor genetici cu factori epigenetici și de mediu. Genele de susceptibilitate sunt numeroase și par a contribui fiecare într-o anumită proporție, redusă, dar semnificativă, la fenotipul sindromului, nefiind descoperită o singură genă determinantă. Sunt antrenate în procesul de polichistizare ovariană, modificări genetice, hipotalamusul și hipofiza, pancreasul endocrin, corticosuprarenalele și desigur, ovarele. Este dificil de stabilit mecanismul inițiator și modalitatea prin care ovarul este constrâns la transformarea chistică a foliculilor săi. Sub aspect fiziopatologic independent de cauza primară a afecțiunii, aceasta are tendința de a se perpetua în cerc vicios până la intervenția terapeutică.

Cercetările efectuate în ultimii ani apreciază dezvoltarea rezistenței la insulină și a hiperinsulinismului ca pe un important inel patogenic în cadrul sindromului; unii autori consideră că distincția între ovarele chistice, chiar în prezența semnelor de androgenizare, și sindromul ovarului sau ovarelor polichistice o face dezvoltarea rezistenței la insulină.

În lumina acestor considerații, lucrarea de față își propune să prezinte implicațiile rezistenței la insulină în fiziopatologia sindromului ovarelor polichistice, precum și interrelațiile genetice și endocrino – metabolice ce definesc sindromul.

PARTEA SPECIALĂ

Obiective

Având în vedere că modificările fenotipice din SOPC pot avea implicații genetice, am considerat că investigarea unor posibile mutații genetice în ceea ce privește insulino-rezistența prezintă un real interes; la nivel mondial rezultatele sunt contradictorii și investigațiile continuă, iar în populația română studiile sunt extrem de restrânse.

Datorită importanței asocierii a insulino-rezistenței și a tulburărilor metabolice în patogenia sindromului, am ales să studiem două mutații punctiforme (SNP) implicate diferit ca expresie genică în acțiunea insulinei. Opțiunea a ținut cont de faptul că în literatură există

date incerte în ceea ce privește implicarea polimorfismelor acestor gene în diabetul zaharat și rezistența la insulină, precum și studii specifice care să sugereze implicarea genelor în SOPC în alte populații decât cea română .

Pentru INSR au fost investigate multiple SNP-uri cu rezultate conflictuale; în ceea ce privește SNP-ul studiat de noi cercetările par a fi doar la început, informația din literatură fiind destul de limitată.

Pentru polimorfismul Pro12Ala al PPAR γ există numeroase date legate de obezitate, insulinorezistență, diabet zaharat și un număr destul de redus de studii în SOPC.

Ca atare în acest studiu am urmărit:

- Detalierea datelor privind rezistența la insulină a unui lot de pacienți SOPC comparativ cu un lot control, prin analiza statistică retrospectivă aplicată unui subgrup al bazei de date din Laboratorul de Genetică Endocrină Moleculară de la Universitatea de Medicină și Farmacie C. Davila, Catedra de Endocrinologie (ce cuprinde subiecți recrutați și descriși anterior de către grupul de studiu al ovarului polichistic din București și Montpellier) , precum și a unui grup SOPC- control recrutat din Tîrgu Mureș;
- Dezvoltarea unui protocol de genotipare pentru a unui polimorfism nucleotidic (SNP) prin PCR - HRM pentru SNP-ul rs2252673 ce corespunde unui polimorfism al genei INSR, în scopul efectuării unui studiu de asociere genetică a acestuia cu SOPC și respectiv cu rezistența la insulină.
- Investigarea unei posibile asocieri a polimorfismului Pro12Ala a genei PPAR- γ cu SOPC, precum și analiza relației dintre polimorfism și hiperandrogenemie, respectiv insulinorezistență studiu efectuat pe un subgrup al lotului anterior, reprezentat de pacientele din Tîrgu Mureș.

1. STUDIUL A - Studiul polimorfismului rs2252673 a genei INSR

Materiale și metode

Subiecții înrolați în studiu au fost femei neînrudite (n=338), care prezentau criteriile de diagnostic ale SOPC revizuite în 2003 la Rotterdam. Au fost excluse pacientele diagnosticate cu sindrom Cushing, hiperprolactinemie și tumori secretante de androgeni.

Pentru control a fost utilizat un lot alcătuit din (n=142) femei, cu vârsta cuprinsă între 14 și 43 de ani, cu ciclul menstrual regulat, fără hirsutism, fără afecțiuni majore, fără

tratamente hormonale în 3 ultimele luni sau istoric de infertilitate.

Toate pacientele au semnat un formular de consimțământ informat. Studiul a fost aprobat de Comisia de Etică a U.M.F. Carol Davila București și U.M.F. Tîrgu Mureș, în conformitate cu Declarația de la Helsinki .

Protocolul de evaluare subiecților a prevăzut ca:

- hirsutismul să fie evaluat prin scorul Ferriman- Gallwey, cu o valoare prag de 8 puncte.
- toate probele de sânge să fie recoltate între zilele 3 și 5 ale ciclului menstrual după o sângerare spontană, sau în ziua 7 după o sângerare indusă de progestative (în faza foliculară).
- determinarea valorilor glicemiei să fie făcută după 12 ore de post alimentar testosteronul total plasmatic, insulina bazale și SHBG să fie măsurate cu același tip de kit de dozare prin chemiluminiscență.
- ecografia ovariană să fie efectuată, pe cale transvaginală acolo unde a fost posibil, respectând indicațiile definiției de consens - Rotterdam 2003.
- pentru determinarea insulino-rezistenței s-au utilizat formulele HOMA-IR și HOMA2-IR calculator.
- alte teste inconstante pentru măsurarea parametrilor endocrini și metabolici folosite au fost: LH, FSH, PRL, E2, profil lipidic

Protocolul de genotipare a inclus următorii pași:

1.Extracția ADN. ADN-ul genomic a fost obținut din sânge integral recoltat pe, utilizând kit-ul de extracție ADN Promega Wizard (Promega - cod catalog A1620)

2.Stabilirea concentrațiilor ADN prin determinarea fluorescenței - Quant-It dsDNA - Invitrogen, cu analizorul RotorGene 6000 (Corbett Research) pentru realizarea unor diluții de 20ng/μl, respectiv 2ng/μl.

3.Alegerea primerilor. Am făcut design-ul primerilor de amplificare PCR (forward și reverse, cu sufixele F și R),și am studiat temperaturile de melting corespunzătoare folosind programul Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>):

INSR : Primeri PCR pt HRM rs2252673

rs2252673_F GACCCCTGGTGCCTGCTCCG

rs2252673_R aaAGGGGTTTCTGTGGCTTTTGGTGAAGCATCTGCTCTCCAGCAC

Alegerea a fost ghidată de designul metodei “snap back primer” pe care am folosit-o ca principiu de genotipare

4. Amplificarea genelor țintă prin PCR. Amplificarea ADN-ului prin s-a realizat prin PCR asimetric, utilizând cantități inegale din primerii F limitant (cantitate mică) și R în concentrații crescute (raport F/R 1/15). În plus primerul R prezintă o terminație aaAGGG care limitează amplificarea secvenței nucleotidice a catenei investigate. Fiind o secvență oligonucleotidică suficient de lungă cu o succesiune de baze complementară zonei de interes a catenei studiate, primerul R formează o buclă ”ac de păr” ce cuprinde SNP-ul de cercetat. După reacția PCR se formează două categorii de produse: atât bucla intramoleculară „ac de păr” (snapback) - sonda, cât și segmentul de interes - ampliconul prin realinierea duplexului între cei doi primeri.

5. Genotiparea prin metoda High Resolution Melt (HRM). Metoda HRM analizează probe de ADN dublu catenar amplificat în prealabil prin PCR, prin determinarea temperaturilor de melt (topire) a fragmentelor ADN obținute post PCR cu substanță fluorescentă. Analiza HRM permite diferențierea genotipurilor pe baza compoziției diferite în nucleotide, chiar și în cazul în care produsele diferă printr-o singură bază. În prezența unei mutații va apărea o modificare a formei sau a poziției curbei de melting profilul de „melt” a produsului PCR fiind dependent de conținutul în baze GC, lungimea secvenței, succesiunea perechilor de baze, forma fiind de asemenea diferită pentru homozigoți față de heterozigoți.

Experimentele control au vizat verificarea rezultatelor obținute prin genotipare HRM, și au fost efectuate prin electroforeză în gel de agaroză, și prin secvențializare directă, probele fiind alese din categoria celor cu probleme de interpretare la HRM, precum și aleator pentru confirmarea rezultatelor.

Rezultate

Date statistice ale aspectelor fenotipice ale loturilor

S-a observat prezența diferențelor semnificative pentru vârsta pacienților incluse în studiu. Media de vârstă a fost mai mare la lotul control, $28,78 \pm 6,29$ ani, comparativ cu lotul cu SOPC, $24,53 \pm 5,34$ ani.

Comparând valorile medii pentru principalii parametri fenotipici frecvent afectați în SOPC am constatat că înafara valorilor medii pentru glicemia bazală, există diferențe semnificative statistic pentru fiecare parametru în parte.

Principalele caracteristici clinice și paraclinice la control, respectiv SOPC.

Toate valorile sunt medie ±DS.

	Control	SOPC	Valoare P
BMI (kg/m ²)	23.04±4.29	28.02±7.17	<0.0001
WHR ratio	0.75±0.06	0.83±0.09	<0.0001
Insulină bazală (μIU/ml)	8.86±9.38	18.60±19.92	<0.0001
Glicemie bazală (mg/dl)	87.39±11.44	88.23±22.85	0.704
HOMA	2.04±2.28	4.11±4.61	<0.0001
HOMA2	1.15±0.92	2.17±1.51	<0.0001
FAI	2.66±2.26	8.58±8.12	<0.0001
SHBG	107.22±103.62	53.32±50.75	<0.0001
Hirsutism scor Ferriman	2.11±1.8	7.95±5.01	<0.0001

SOPC se asociază în mod semnificativ statistic cu o creștere a greutatei corporale, obezitatea fiind mai frecventă decât supraponderalitatea($p<0.0001$, test Chi pătrat)

Un BMI > 25kg/m² este prezent la 20% din femeile ce aparțin lotului martor, pe când la femeile cu SOPC valoarea este mult mai ridicată 61,6%, procentele fiind apropiate și în cazul obezității centrale 16,80%, respectiv 62,50% . Mai mult, SOPC se asociază în mod semnificativ statistic cu o creștere a greutatei corporale, obezitatea fiind mai frecventă decât supraponderea ($p<0.0001$)

Datele paraclinice pentru glicemie și insulinemie bazală au fost disponibile la 437 de pacienți, eșantionul reprezentând 91,05% din total. Calculul HOMA-IR și HOMA2-IR a fost efectuat din aceleași date.

Valorile medii ale glicemiei a jeun la pacientele din lotul SOPC nu diferă semnificativ față de mediile glicemiilor din lotul control, $p=ns$. Valorile medii ale insulinei dozată a jeun sunt mai mari în lotul SOPC față de lotul martor. Diferența este semnificativă statistic ($p<0.0001$).

În studiul de față am definit rezistența la insulină în funcție de indicii de insulinorezistență HOMA-IR. Acesta are valori medii semnificativ mai mari în lotul SOPC față de lotul control.

Pentru interrelația obezitate – insulinorezistență am comparat rezultatele HOMA IR și BMI la întreg lotul studiat; se observă o corelație pozitivă între cei doi parametri, rezistența la insulină crescând proporțional cu indicele de masă ponderală.

Analizând comparativ insulino rezistența cu SHBG ca și expresie a testosteronului biodisponibil observăm o corelație negativă între cei doi parametri, scăderea SHBG-urilor fiind însoțită de o scădere a sensibilității la insulină.

Între gradul hiperandrogenismului și cel al insulino rezistenței se constată o corelație pozitivă; scăderea sensibilității la insulină se modifică proporțional cu creșterea indicelui androgenilor liberi.

Dacă analizăm parametrii clinici legați de hiperandrogenism, se observă după cum era de așteptat că hirsutismul (apreciat la 92,5% din paciente) nu apare (decât sporadic) la controlii, în schimb apare cu frecvență mare (62,2%) în cazul pacientelor cu SOPC.

În mod paradoxal, prezența hirsutismului pare să nu se coreleze cu valoarea testosteronului total, corelația nefiind semnificativă statistic ($p=0,403$). În schimb, la analiza hirsutismului în funcție de FAI (free androgen index), există o corelație semnificativă statistic cu valoarea scorului Ferriman la pacientele SOPC ($p=0,005$).

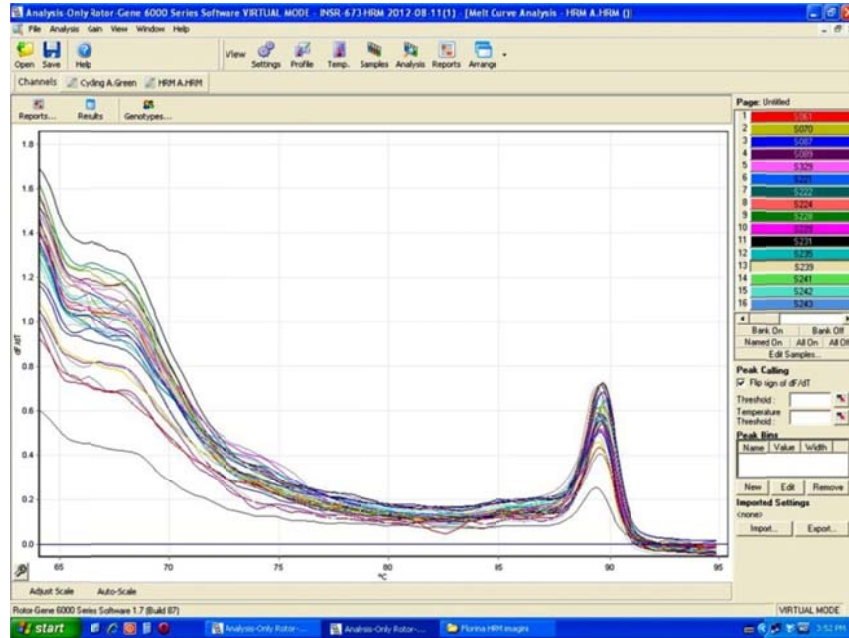
Genotiparea polimorfismului rs 2252673 INSR - rezultate

Conform bazei de date genetice referitor la SNP-ul rs2252673, alela wild-type conținând citozină, iar alela mutantă (rară), conținând guanină. (UCSC Genome Browser).

SNP-ul rs2252673 este un SNP de clasă III (bazele schimbate fiind G/C) și este mai dificil de genotipat prin HRM, datorită diferenței mici de T_m dintre alele (Shift-ul T_m tipic fiind mic, de 0,2-0,5°C).

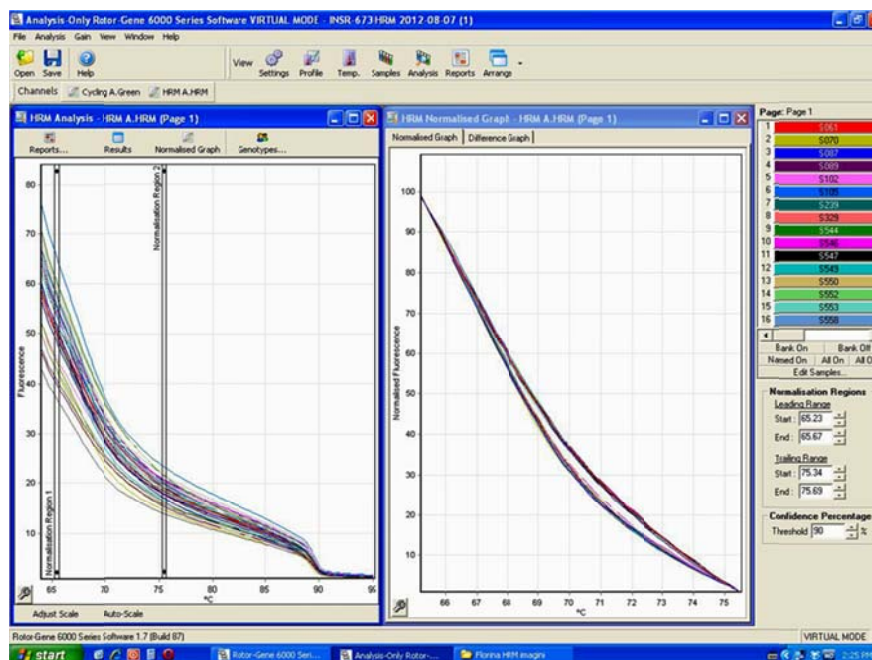
Din totalul de 480 de probe ADN introduse în reacție, majoritatea covârșitoare au avut un comportament interpretabil pentru analiza HRM; 9 probe au avut probleme de amplificare la reacția PCR, fiind neinterpretabile și la reintroducerea lor în experimentele ulterioare, motiv pentru care au fost eliminate din studiu.

Imaginile obținute și analizate HRM și melting sunt redată în figurile următoare:



Apectul curbelor de melting individualizează două curbe de melt, determinate de T_m diferite ale produselor obținute la PCR (sonda și ampliconul)

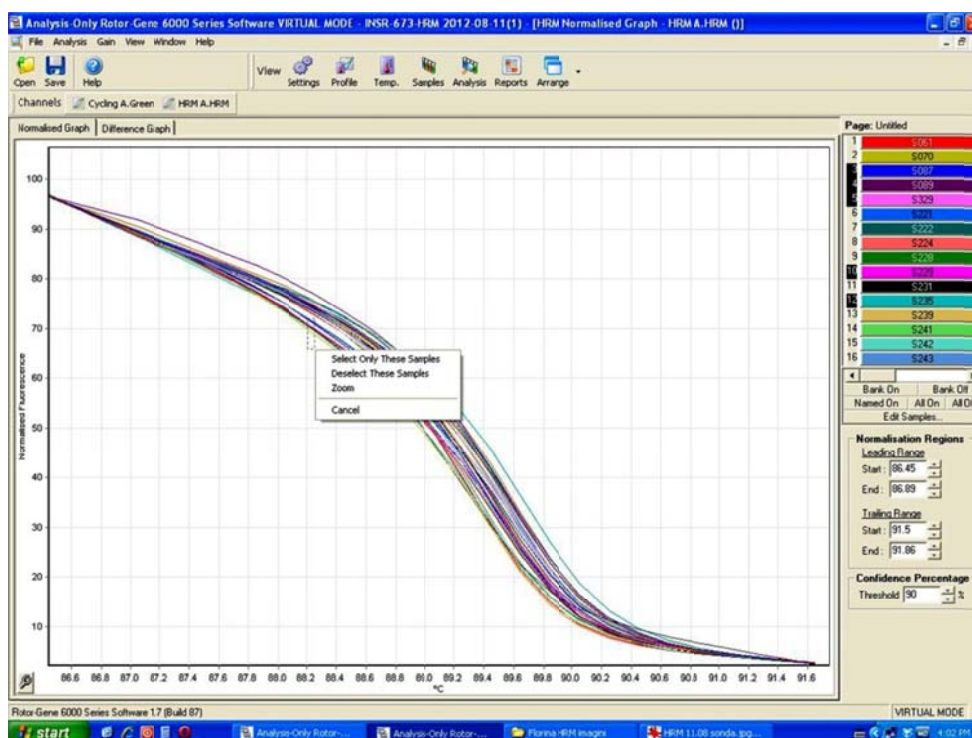
Alelele de referință ale acestui SNP sunt considerate pe catena antisens, gena fiind și ea transcrisă antisens. Pe baza frecvenței alelice și cunoscând design-ul primerilor, am stabilit că în analiza HRM clusterului din dreapta îi corespunde genotipul frecvent, respectiv C/C, clusterului din stânga genotipul C/G.



HRM sondă

Probele ADN care nu au avut un comportament grafic corespunzător celor două categorii de clustere, au fost urmărite pe amplicon. Dacă nici aici nu s-au încadrat pe modelul curbelor obținute au fost eliminate din analiză

Pe amplicon la o temperatura de melt mai înaltă, curbele se interpretează în felul următor: clusterul din dreapta corespund heterozigoților, iar cel din stânga sunt homozigoților.



Aspectul curbelor analizate HRM la nivelul ampliconului

Pentru verificarea rezultatelor s-a aplicat o metoda comparativa a probelor urmărind încadrarea lor pe sondă, respectiv pe amplicon; gradul de suprapunere a fost semnificativ, restul de probe cu rezultat incert fiind secventializate ulterior.

De asemenea au fost făcute interpretari paralele pe clustere pentru cele doua genotipuri individualizate

Analiza statistică a asocierii SNP-ului rs2252673 cu SOPC

Testarea asocierii statistice dintre genotipurile INSR și diagnosticul de SOPC (vs. control) a arătat lipsa diferențelor semnificative de frecvență pentru cele două genotipuri identificate, precum și a asocierii cu anumite aspecte fenotipice.

Interpretarea gradului de obezitate în funcție de genotipurile obținute nu a relevat o asociere semnificativ statistică a acestora; obezitatea ($BMI \geq 30$) este prezentă în proporții similare atât la homozigoți cât și la heterozigoți. ($p=1$)

În ceea ce privește insulino rezistența, nu s-a evidențiat o asociere semnificativ statistică între scăderea sensibilității la insulină și genotipurile INSR (homozigoți, heterozigoți). Parametrii care evidențiază alterarea sensibilității la insulină deși se corelează liniar, HOMA IR și HOMA 2IR prezintă indici de asociere diferiți. ($p=0,836$ pentru HOMA IR și $0,468$ HOMA 2IR, indici valabili pentru întregul lot)

Referitor la posibila asociere între genotipuri și hiperandrogenism rezultatele nu au demonstrat o diferență semnificativ statistică a distribuției genotipurilor în funcție de FAI nici în lotul martor ($p=1$) și nici în lotul SOPC ($p=0,184$)

2. STUDIUL B - Studiului polimorfismului Pro12Ala a genei PPAR- γ

Materiale și metode

Am efectuat un studiu caz-control format din 89 de femei de origine română, din care 47 cu SOPC și 42 controale, cu vârsta medie de $25,10 \pm 5,57$. Pacientele au fost recrutate prin Ambulatoriul de specialitate a Spitalului Județean Tg Mureș, precum și din Clinica de Endocrinologie Tg Mureș, în perioada 2009-2011.

Criteriile de includere a pacienților și protocolul de evaluare au fost similare cu cele din STUDIUL A.

Protocolul de genotipare a inclus următorii pași:

1. Extracția ADN s-a efectuat din sânge integral cu kitul de extracție ZymoBead™ Genomic DNA Kit :

2. Alegerea primerilor. Primerii aleși (Fermentas) prezintă următoare secvență nucleotidică:

- 5'-GCCAATTCAAGCCCAGTC-3'
- 5'-GATATGTTTGCAGACAGTGTATCAGTGAAGGAATCGCTTCCG-3'

2. Amplificare și genotipare prin PCR – RFLP (Polimorfismul lungimii fragmentelor de

1. Amplificarea prin PCR a fragmentului genomic care conține mutația sau polimorfismul studiate
2. Digestia produșilor de amplificare cu enzima de restricție corespunzătoare, timp de 2 ore, la 60°C [5U Bsh1236I (BstUI) (Fermentas®, Lituania)]

3. Electroforeza in gel de agaroză a fragmentelor de restricție
4. Interpretarea gelului de electroforeza în lumină UV cu ajutorul sistemului de fotodocumentare.

Analiza statistică a datelor a fost efectuată folosind EpiInfo for Windows. S-a utilizat testul „t” pentru compararea mediilor și testul F pentru aprecierea diferențelor între variante. Normalitatea datelor a fost verificată aplicând testul Kolmogorov-Smirnov. Pentru toate analizele am utilizat $\alpha=0,05$; orice valoare p mai mică decât α a fost considerată semnificativă statistic. Variabilele binare au fost analizate cu testul Fisher.[11]

Protocolul experimental a fost aprobat de comisia de Cercetare și Etică a Universității, și formularul de consimțământ a fost semnat de fiecare pacientă.

Rezultate

Caracterizarea fenotipică a subiecților control și SOPC

Au fost analizate statistic cele mai importante aspecte clinice ale sindromului, precum și parametrii care definesc insulinorezistența și hiperandrogenismul.

Principalele caracteristici clinice și paraclinice la control, respectiv SOPC. Toate valorile sunt medie \pm DS.

	Control n=42	SOPC n=47	Valoare P
Vârsta (ani)	28.64 \pm 4.34	25.06 \pm 5.52	0.001
BMI (kg/m ²)	22.74 \pm 1.87	28.70 \pm 6.43	<0.0001
WHR ratio	0.71 \pm 0.03	0.84 \pm 0.11	<0.0001
Insulină bazală (μIU/ml)	9.25 \pm 7.18	15.03 \pm 12.10	0.008
Glicemie bazală (mg/dl)	90.46 \pm 8.23	92.83 \pm 7.96	0.171
HOMA	2.04 \pm 1.54	3.43 \pm 2.69	0.004
HOMA2	1.18 \pm 0.88	1.99 \pm 1.38	0.002
Testosteron total (ng/ml)	0.48 \pm 0.2	0.071 \pm 0.31	<0.0001
SHBG	76.02 \pm 41.79	30.97 \pm 14.45	<0.0001
Hirsutism scor Ferriman	0.90 \pm 2.26	11.06 \pm 3.69	<0.0001

Din punct de vedere al aspectelor clinice, au fost detectate diferențe semnificative statistic privind obezitatea, dispoziția acesteia, precum și a semnelor de hiperandrogenism, între cele două grupuri studiate. Femeile din lotul SOPC au BMI-ul mai mare ($p < 0.0001$), incidența sau gradul obezității centrale este mai mare ($p < 0.0001$), și sunt mai hirsute; constatările sunt în concordanță cu caracteristicile fenotipice ale SOPC.

În ceea ce privește statusul metabolic valorile glicemiei a jeun ($p = 0,171$), nu sunt semnificativ statistic diferite ca medii în cele două loturi; în schimb insulina bazală ($p = 0,008$) și parametrii ce definesc insulinorezistența, HOMA IR și HOMA2 IR sunt semnificativ mai crescute la pacientele cu SOPC ($p < 0.005$).

Analiza genotipurilor PPAR- γ și asocierii cu SOPC

Analizarea produșilor rezultați după PCR prin migrare în gel de agaroză și evidențiere în lumină ultravioletă a individualizat trei genotipuri:

- Un singur produs fragment 270 bp (perechi de baze) – homozigot CC wild type (genotip Pro12Pro)
- Două fragmente 227, respectiv 43 bp – homozigot GG (genotip Ala12Ala)
- Trei fragmente 270, 227 respectiv 43 bp – heterozigot CG (genotip Pro12Ala)

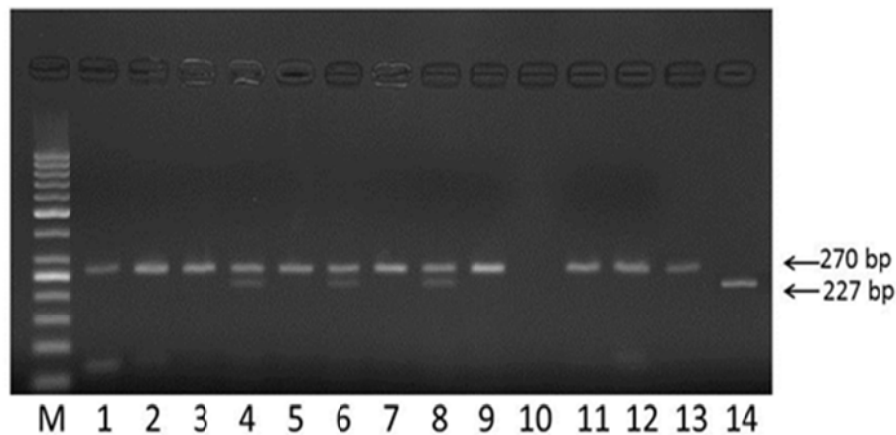


Figura 21 -Analiza polimorfismului genei PPAR- γ
(peroxisome proliferator-activated receptor γ) PCR-RFLP. M: marker molecular 50 bp ADN, culoarul 10: control negativ; culoarele 1-3, 5, 7, 9, 11-13: homozigoți CC (Pro12Pro), culoarele 4, 6, 8: heterozigoți CG (Pro12Ala), culoarul 14: homozigoți GG (Ala12Ala). Fragmentele ADN 43-bp nu se pot vizualiza în imagine.

Distribuția polimorfismului Pro12Ala a genei PPAR- γ s-a aflat în echilibru Hardy Weinberg în ambele loturi incidența alelelor Ala a fost de 10,68% (12 paciente) în grupul SOPC și 9,79% (11 paciente) în grupul control. O singură pacientă homozigotă pentru alele Ala a fost diagnosticată în lotul control.

În grupul SOPC indicele ponderal, obezitatea centrală și hirsutismul sunt comparabile între subiecții cu genotip Pro/Pro și cei cu genotip X/Ala ($p=ns$).

Metabolismul glucidic apreciat prin insulină, gradul rezistenței la insulină și glicemia bazală, precum și parametrii ce definesc insulinorezistența HOMA IR și HOMA 2IR, nu prezintă modificări semnificative asociate celor două genotipuri ($p=ns$).

Deasemenea profilul androgenic (testosteron total, SHBG și FAI) nu prezintă diferențe semnificative statistice asociate alelelor Ala ($p=ns$).

CONCLUZII

1. SOPC este o afecțiune heterogenă cu etiologie incertă care implică un posibil teren genetic afectat, cu multiple gene minim modificate a căror expresie clinică prin interacțiunea cu factori de mediu poate genera caracteristicile fenotipice ale sindromului.
2. Aspectul fenotipic caracterizat în esență prin hiperandrogenism asociază în procente ridicate obezitate și alterări ale sensibilității la insulină ce variază de la insulino rezistență până la DZ tip 2. Evaluarea alterărilor metabolice și impactul lor pe termen lung în ceea ce privește posibilele complicații reprezintă o latură extrem de importantă a sindromului fiind în continuare o reală provocare din punct de vedere al cercetării. Substratul etnic, fundalul genetic, antecedentele personale și heredo colaterale, precum și gradul obezității trebuie luate în calcul deoarece pot agrava sau chiar activa trigger-ul tulburărilor metabolice glicemice la femeile cu SOPC.
3. Aprecierea clinică devine cu atât mai importantă cu cât intervenția terapeutică disponibilă la momentul actual nu este capabilă să acopere și să echilibreze toate laturile patologice ale afecțiunii. Mai mult unele instrumente terapeutice deși sunt net benefice pentru anumite anomalii pot acționa prin exacerbarea altora.
4. Studiul a cuprins un număr de 338 de cazuri cu patologie SOPC și 142 de cazuri martor (STUDIUL A); din întregul lot a fost selectat un subgrup format de 89 de paciente (STUDIUL B) care a fost investigat suplimentar pentru încă o posibilă asociere genetică.

5. Pacientele au fost investigate clinic și paraclinic fiind urmăriți cu precădere anumiți parametri: indicele de masă corporală (BMI), raportul talie/șold (WHR), gradul de rezistență la insulină (HOMA-IR, HOMA2-IR), indicele de androgeni liberi (FAI).
6. Pentru întregul lot (STUDIUL A) s-a optimizat și aplicat un protocol de genotipare pentru un SNP al genei INSR rs2252673, urmat de un studiu de asociere al acestuia cu SOPC.
7. Subgrupul din STUDIUL B a fost genotipat și investigat pentru asocierea cu polimorfismul Pro12Ala a genei PPAR γ cu SOPC.
8. Alterarea sensibilității la insulină, deși prezentă la ambele loturi are o incidență crescută la femeile cu SOPC (58,75%) comparativ cu lotul martor (21,11%), cu valori medii ale indicilor HOMA-IR, HOMA2-IR semnificativ modificate statistic $p < 0.0001$ (STUDIUL A). Pentru STUDIUL B rezultatele au fost comparabile incidența insulinorezistenței fiind de 55.3% la femeile cu SOPC, respectiv 14.3% în lotul control, cu valori medii semnificativ crescute pentru lotul caz prin aprecierea celor doi indici, HOMA IR și HOMA 2IR ($p < 0.005$).
9. Pacientele cu SOPC sunt mai supraponderale și respectiv mai obeze decât femeile din lotul control. Un BMI $> 25\text{kg/m}^2$ este prezent la 20% din femeile ce aparțin lotului martor, pe când la femeile cu SOPC valoarea este mult mai ridicată 61,6%, procentele fiind apropiate și în cazul obezității centrale 16,80%, respectiv 62,50% . Mai mult, SOPC se asociază în mod semnificativ statistic cu o creștere a greutateii corporale, obezitatea fiind mai frecventă decât supraponderea ($p < 0.0001$), date valabile pentru (STUDIUL A). Comparatamentul este similar și pentru STUDIUL B unde pacientele din lotul SOPC au BMI-ul mai mare ($p < 0.0001$), și incidența sau gradul obezității centrale este mai mare ($p < 0.0001$).
10. Obezitatea generală și cea abdominală prezintă o relație de asociere (< 0.0001) și de corelație liniară pozitivă cu rezistența la insulină (< 0.0001) în cadrul SOPC, concluzie valabilă pentru ambele studii. Pacientele cu modificări ale metabolismului glucidic au un BMI mai crescut (supraponderale, obeze) și un raport talie/sold peste 0,8.
11. Insulinorezistența caracterizată prin HOMA IR și HOMA 2IR prezintă o corelație semnificativă statistic pozitivă cu FAI, hirsutism și tulburări menstruale, și negativă cu SHBG ($p < 0.005$). Cu alte cuvinte pacientele cu sensibilitatea la insulină alterată au un grad mai mare de hiperandrogenism clinic și paraclinic, și prezintă cu frecvență crescută oligomenoree sau amenoree. În plus scăderea concentrației de SHBG se corelează cu creșterea insulino-rezistenței.

12. Pentru STUDIUL A, prin optimizarea protocolului de genotipare prin HRM am prelucrat 480 de cazuri; 471 de probe au fost încadrate într-una din cele două variante identificate la analiza HRM: genotipul 1-homozigoți wilde type și genotipul 2-heterozigoți (cu un procent nesemnificativ de homozigoți mutanți sub 1%).
13. Pentru STUDIUL B, genotiparea polimorfismului Pro12Ala a genei PPAR γ a fost adaptată o metodă ce folosește digestia enzimatică a ADN-ului și electroforeză, cu identificarea genotipurilor și variantelor alelice.
14. Analiza statistică a asocierii SOPC cu INSR sugerează că gena prin rs 2252673 nu intervine semnificativ în riscul dezvoltării SOPC în populația română, neexistând diferențe notabile între frecvența genotipurilor în ceea ce privește diagnosticul. În mod similar genotipul nu pare să influențeze insulino-rezistența, obezitatea sau gradul de hiperandrogenism.
15. Rezultatele analizei statistice a studiului de asociere între polimorfismul Pro12Ala și SOPC nu susțin implicarea semnificativă a acesteia în diagnosticul sindromului; frecvența genotipurilor precum și a alelelor a fost distribuită proporțional echilibrat atât în lotul SOPC, cât și la controlii; comportamentul a fost similar în relație cu obezitatea, insulino rezistența și cu hiperandrogenismul.
16. În ceea ce privește integrarea studiului în literatură putem afirma că rezultatele asocierii polimorfismului Pro12Ala a genei PPAR γ descrise în publicații sunt contradictorii; cea mai mare parte a lucrărilor publicate se află în concordanță cu rezultatele obținute în teză, deși sunt raportate și studii în care asocierea a fost semnificativă.
17. Asocierea INSR prin rs2252673 cu SOPC a fost investigată într-o singură cercetare până la ora actuală, studiul concluzionând că gena intervine în apariția și dezvoltarea SOPC.
18. Rezultatele trebuie interpretate ca fiind preliminare, în lumina puterii statistice limitate a studiului și deschid calea unui studiu mai amplu, cu putere adecvată, pentru a înțelege asocierea genei studiate cu SOPC.
19. Din punct de vedere teoretic studiul nostru dorește să deschidă perspectiva unei cercetări mai aprofundate, privind etiopatogenia sindromului, în special a potențialelor implicații genetice.
20. Din punct de vedere practic având în vedere punerea la punct a unui nou algoritm de genotipare prin HRM pentru STUDIUL A, considerăm că am pus bazele implementării unui nou protocol de genotipare, cu un timp de lucru mai scurt, costuri scăzute și

consum redus de ADN, ce își poate arăta utilitatea mai ales în cazul genotipării unor loturi mari de subiecți. În același spirit, metoda folosită pentru genotiparea polimorfismului Pro12Ala a genei PPAR γ , poate fi aplicată la loturi mari de cazuri cu putere statistică mai ridicată.

Cuvinte cheie: Sindrom de ovare polichistice (SOPC), rezistență la insulină, INSR (insulin receptor gene), PPAR γ (peroxisome proliferator activated receptor gamma)