

SINDROMUL OVARELOR POLICHISTICE – GENE CANDIDATE IMPLICATE ÎN INSULINO REZISTENȚĂ

FLORINA IOANA GLIGA¹, F. BUICU²

^{1,2}Universitatea de Medicină și Farmacie, Tg. Mureș

Cuvinte cheie: Sindromul ovarelor polichistice, insulino rezistență, gene candidate

Rezumat: Sindromul ovarelor polichistice (SOPC) este o endocrinopatie heterogenă și complexă, fiind considerată cea mai frecventă afecțiune endocrină din perioada fertilă feminină. Reflectă multiple potențiale etiologice și manifestări clinice variabile. Criteriile de diagnostic includ cele mai pregnante trăsături: hiperandrogenismul clinic și/sau hiperandrogenemia biochimică, oligo/anovulația și morfologia ovariană polichistică; rezistența la insulină este prezentă în majoritatea cazurilor. În ciuda progreselor realizate în definirea aspectelor clinice ale sindromului, doar puține date certe există în ceea ce privește mecanismele etiopatogenetice din SOPC. Se pare că fenotipul SOPC derivă din interrelația factorilor genetici și de mediu. Multiple studii sugerează că factorii genetici joacă un rol major în etiologia SOPC. Cu toate acestea, modul de transmitere rămâne neelucidat. Acest articol prezintă o sinteză a celor mai investigate gene candidate posibil implicate în insulino rezistența din SOPC.

Keywords: Polycystic ovary syndrome, insulin resistance, candidate genes

Abstract: Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a complex, heterogeneous endocrinopathy, being considered the most common endocrine disorder in women reproductive period. It reflects multiple potential aetiologies and variable clinical presentations. The diagnostic criteria refer to the most pointed features: clinical hyperandrogenism and/or biochemical hyperandrogenemia, oligo/anovulation and polycystic ovarian morphology; insulin resistance is present in the majority of cases. Despite the progress in the definition of the clinical aspects of the syndrome, only very few certain data are available about the etiopathogenetic mechanisms in PCOS. It seems that the PCOS phenotype derives from the interaction between the environmental and genetic factors. Many studies suggest that genetic factors play a major part in the etiology of PCOS. This article presents a brief overview of the most investigated candidate genes involved in PCOS's insulin resistance.

Definiție, patogenic, semne clinice și epidemiologie SOPC

Definiția ovarului polichistic a fost o sursă de mari și continue controverse ale experților în domeniu. Sindromul este o afecțiune endocrină prezentă la aproximativ 7% din femeile în perioada reproductivă.(1) Nu există nici la ora actuală un consens ale criteriilor diagnostice sau definiției SOPC. Cele mai utilizate criterii stabilite la Conferința din 1990 National Institute of Child Health and Human Development (NICHD) includ: (a) semne clinice sau biochimice de hiperandrogenism, (b) oligoovulație, (c) eliminarea altor posibile afecțiuni ca și sindrom Cushing, hiperprolactinemie și hiperplazia adrenală congenitală non-clasică.(2) În 2003 în cadrul workshop-ului găzduit de ESHRE/ASRM în Rotterdam s-a ajuns la consensul că SOPC este diagnosticat când două din următoarele 3 criterii apar la o pacientă:(3)

1. oligo/anovulația
2. activitate androgenică în exces
3. ovare polichistice (ecografie ovariană)

Alte entități cu aceleași semne trebuie excluse.(4) Definiția de la Rotterdam este mai puțin restrictivă incluzând mai mulți pacienți, parte din ei fără un real exces androgenic.(5)

Disfuncția ovariană se manifestă de obicei prin oligo/amenoree determinată de oligo/anovulația cronică. Anovulația prelungită poate determina totuși sângerări uterine disfuncționale ce pot mima ciclul menstrual Majoritatea pacientelor cu SOPC 70-80% prezintă oligo sau amenoree.

Dintre pacientele cu oligomenoree 89-90% sunt diagnosticate cu SOPC.(6) Iar dintre cele cu amenoree, doar 40% sunt de cauză SOPC, disfuncția hipotalamică fiind cea mai frecventă cauză.(7) SOPC –ul este cea mai întâlnită cauză de infertilitate anovulatorie.(6)

Hiperandrogenismul. Semnele clinice și biochimice ale excesului de androgeni din SOPC rezultă din sinteza și secreția crescută de androgeni ovarieni. Nivelele crescute de LH (hormon luteinizant) și insulina acționează sinergic cu creșterea producției de androgeni. Insulino rezistența conduce la hiperinsulinemie, cu reducerea SHBG (sex hormone binding globuline) și creșterea fracției libere a testosteronului circulant, determinând atrezia foliculilor ovarieni. Semnele clinice de hiperandrogenism includ hirsutism (60%), acnee(30%) și alopecia androgenă.(8,9)

Caracteristici metabolice:

- **Insulino rezistența** presupune mecanisme complexe ce implică factori genetici și de mediu. Disfuncțiile metabolismului insulic în SOPC presupun reducerea secreției, scăderea eliberării hepatice (10,11), reducerea rezervelor hepatice, supresia gluconeogenezei hepatice și anomaliile ale receptorului de insulină.(9,12) Insulino rezistența din SOPC asociază efecte diverse și complexe asupra metabolismului lipidic, sintezei proteice și modulării producției de androgeni (augmentează efectele LH asupra celulelor tecale).(13)

¹Autor corespondent: Florina Ioana Gliga, Str. Ghe. Marinescu, Nr. 38, Tg-Mureș, E-mail: f.gliga@gmail.com, Tel: +40723 033391
Articol intrat în redacție în 18.04.2012 și acceptat spre publicare în 23.05.2012
ACTA MEDICA TRANSILVANICA Septembrie 2012;2(3):113-117

- **Dislipidemia** – este frecvent întâlnită la pacienții cu SOPC comparativ cu martori cu BMI (body mass index) corespondent; (14,15) trigliceridele serice sunt crescute și colesterol HDL scăzut. Dislipidemia apare independent de BMI și pare a fi etiopatogenetic multifactorială. Insulino rezistența joacă un rol important modulând lipoliza și alterând expresia lipoproteinlipazei și lipazei hepatice.(14,15)

Metode de studiu genetic în SOPC

Pentru elucidarea originii complexe poligenice a SOPC s-au abordat diverse metode (a) studii de asociere unde alelele predispozante se presupune a fi mai frecvente în populația afectată decât la indivizii sănătoși; (b) studii legate (linkate) unde subiecții și familiile lor sunt investigate pentru a se evidenția dacă particularitățile genomice sunt independente sau legate linkate cu fenotipul.

Pentru studiile asociate cunoașterea modului de transmitere genetică nu e absolut necesar, dar pentru o concluzie certă este nevoie de loturi largi de indivizi. Studiile linkate necesită cunoașterea modalității de transmitere; sunt destul de robuste pentru a identifica gene singulare cu determinism patologic mendelian, dar sunt insuficiente în complexul de modificări genetice din SOPC.(16)

Studiile linkate utilizează SNP (polimorfism mononucleotidic) pentru determinarea posibilelor mutații în genele candidate.(17)

Gene candidate pentru insulino rezistență în SOPC

S-a demonstrat că femeile cu SOPC obeze sau non-obeze în comparație cu femei sănătoase prezintă diverse grade de insulino rezistență și hiperinsulinism compensator, la ora actuală fiind cunoscute ca trăsături comune ale sindromului.(18) Ca atare numeroase gene ce coordonează secreția și acțiunea insulinei au fost explorate ca și gene candidate în patogeneza pe SOPC.

1. Gena insulinei (INS)

INS include în regiunea 5' a genei VNTR (număr variabil de repetări în tandem - *variable tandem repeats*); polimorfismul VNTR coordonează rata de transcripție a INS și probabil pe cea a genei ce codifică IGF-II (insulin growth factor).(19,20) Numărul de repetări al INS VNTR variază de la 26 la 200, și datorită acestei caracteristici polimorfismul INS VNTR prezintă 3 clase. La caucazieni repetările sunt distribuite bimodal, alelele clasa I având o medie de 40 de repetări, iar alelele clasa III o medie de 157 de repetări (alelele clasa II sunt rare). Activitatea transcripțională a regiunii polimorfism mai lung este mai mare a celei cu polimorfism scurt.(19)

La ora actuală nu se cunoaște dacă hiperinsulinismul din SOPC derivă din insulino rezistență sau ca efect direct al afectării celulelor betapancreatice. Ca atare pentru clarificarea defectelor genetice și asocierea cu anomaliile de secreție sau activitate a insulinei, Waterworth et al. au evaluat pentru prima dată prin studii asociate și linkate polimorfismul INS VNTR în familii cu SOPC.(20) Au descoperit o asociere între SOPC și variația alelică a locusului INS VNTR în 3 populații diferite. Mai mult au descoperit că alelele clasa III sunt asociate cu SOPC anovulatorii și sunt mai frecvente la femei cu simptomatologie de ovare polichistice prezentă.(21) Aceste date susțin ideea că polimorfismul VNTR are un rol funcțional în instalarea hiperinsulinemiei și/sau insulino rezistenței în SOPC. Același grup a evidențiat transmiterea semnificativ mai frecventă a alelelor clasa III, de la tată către fetele afectate, date confirmate și de studiul Eaves et al.(22)

Cu toate acestea într-un studiu mai mare, Urbanek et al. (1999) nu confirmă implicarea genei insulinei în SOPC și nici asocierea între alelele clasa III și hiperandrogenemie.(23) Alte studii (Calvo et al., 2002; Vankova et al., 2002) nu susțin

asocierea alelelor INS VNTR cu hiperandrogenismul sau SOPC.(24,25) Un studiu recent efectuat pe un grup populațional chinez sprijină concluziile anterioare.(26) Rezultatele conflictuale pot fi explicate prin aplicarea criteriilor diferite, la grupuri etnice și areale geografice diferite; de asemenea folosirea unor loturi mici este considerat un factor major de risc pentru generarea de rezultate ce nu sunt susținute la examinări ulterioare.(27)

2. Gena receptorului de insulină INSR

Alterarea sensibilității la insulină la pacientele cu SOPC au condus la ipoteza că afectarea genetică a receptorului de insulină sau un defect postreceptor poate contribui la patogenia sindromului. Studii moleculare ale regiunii codante din receptorul de insulină a femeilor cu SOPC au relevat un număr mare de polimorfisme silențioase, parte din ele fiind prezente și la subiecții normali.(28)

Prima secvențiere a INSR nu a evidențiat nici o mutație la femeile cu SOPC.(29) Ulterior Conway et al.(30) a analizat o secvență a domeniului tirozine kinasei din INSR la 22 de paciente cu SOPC, și Talbot et al.(31) a investigat mutațiile prin scanarea moleculară a 24 de paciente; nici unul din studii nu a evidențiat mutații semnificative în relația cu insulino rezistența din SOPC.(31) Siegel et al. (2002) a pus în evidență un polimorfism mononucleotidic (SNP) C/T în domeniul tirozine kinasei asociat cu.(32) Recent Urbanek et al. a investigat o porțiune întinsă a cromozomului 19p13.2 susținând asocierea polimorfismului INSR cu SOPC.(33) Într-un studiu caz-control Godarzi et al. (2011) a identificat multiple noi SNP-uri a genei INSR asociate cu SOPC.(34)

3. IRS – Proteina substrat a receptorului insulic

Fiziologic insulina se leagă de subunitatea α a receptorului de insulină care accelerează transportul transmembranar al glucozei și inițiază autofosforilarea subunității β , activând tirozin kinaza. Fosforilarea tirozinei activează via substratului receptorului de insulină IRS-1 și IRS-2, sinteza de proteine ce promovează acțiunea metabolică și mitogenică a insulinei. Când IRS -1 este disfuncțional, IRS-2 rămâne principalul mesager intracelular, dar necesită concentrații mai mari de insulină pentru activare.(35)

Multiple polimorfisme ale genelor IRS1 și IRS2 au fost implicate în insulino rezistență. Polimorfismele Gly972Arg pentru IRS-1 și Gly1057Asp pentru IRS-2 par să crească susceptibilitatea diabetului zaharat tip 2.(36,37) Deși inițial nu a existat nici o asociere cu SOPC a IRS (by Urbanek et al. (23), potențialul rol al SNP-urilor genei IRS a fost investigat în continuare.

Sir-Petermann et al. au observat o frecvență crescută a alelei Arg972 IRS-1 la paciente cu SOPC din Chile(38). Din contră, El Mkaem et al. nu evidențiază nici o diferență în distribuția alelelor IRS-1 Gly972Arg și IRS-2 Gly1057Asp între paciente cu SOPC și lotul martor; totuși au demonstrat că IRS-1 Gly972Arg era prevalent la pacientele insulino rezistente, față de pacientele fără insulino rezistență sau cele din lotul de control. (39) Ehrmann et al. au investigat influența polimorfismelor Gly972Arg IRS-1 and of Gly1057Asp IRS-2 la un lot de femei nediabetice cu SOPC; deși genotipul IRS 1 nu a fost asociat semnificativ cu modificările clinice sau hormonale ale subiecților cu SOPC nondiabetici, purtătorii genotipului IRS-2 Gly/Gly au fost asociați cu nivele semnificativ crescute ale glicemiei la 2h la proba de încărcare cu glucoză comparativ cu purtătorii de genotip Gly/Asp sau Asp/Asp (40), contrazicând astfel rezultatele studiului El Mkaem et al.

Confirmând concluziile grupului El Mkaem et al. (39), Villuendas et al. demonstrează că polimorfismele IRS au o distribuție egală printre pacientele cu SOPC și lotul control în Spania.(41)

Dilek et al. au raportat o incidență crescută a polimorfismului Gly972Arg IRS-1 la femeile din Turcia cu SOPC (42) în concordanță cu datele oferite de Sir-Petermann et al. (38) Mai mult, similar datelor obținute de El Mkedem et al. și Villuendas et al., au demonstrat că purtătoarele de Gly972Arg sunt mai obeze, cu o insulinorezistență mai mare și glicemia bazală mai ridicată, comparativ cu alte pacinte cu SOPC sau controale. (42,43)

Global privind, asocierea IRS cu SOPC și insulino rezistența, poate fi interpretată prin interrelaționarea cu alte gene candidate ale sindromului. Se poate sublinia totuși că polimorfismul IRS pare a fi asociat separat cu rezistența la insulină, mai mult decât cu SOPC.

4. Calpain10 gene

Calpain-10 este o cistein protează ce intervine în secreția și acțiunea insulinei, iar studii genetice au arătat că variații ale genei CAPN10 ce codifică calpaina 10 poate fi asociată cu diabetul zaharat de tip2. (45) Deoarece SOPC și diabetul de tip2 împart un număr comun de posibili factori etiologici, Ehrmann et al. a încercat să determine dacă variații ale genei CAPN10 pot fi implicate în patogeneza SOPC sau a diabetului de tip 2. (46); a fost demonstrată o corelație între haplotipul 112/121 a acestei gene și un nivel crescut al insulinei la femeile afro americane și un risc crescut de PCOS atât la femeile afro americane cât și la cele caucaziene.

Gonzales et al. au investigat patru SNP-uri (SNP-19, SNP-43, SNP-44, SNP-63) ale genei CAPN10, realizând că SNP44 este asociat consecvent cu SOPC la femeile spaniole (47,48). Cu toate acestea, folosind aceleași SNP-uri, Haddad et al. și Escobar-Morreale et al. nu au putut susține asocierea. (48,49)

5. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ gene.

Activarea receptorului (PPAR)- γ promovează diferențierea adipocitelor, crescând sensibilitatea la insulină. Gena PPAR- γ conține un SNP Pro12Ala; a fost demonstrat că alelele Ala12 PPAR- γ favorizează creșterea în greutate la persoanele obeze adulte, precum și la fete și adolescente obeze cu hiperandrogenism.

Investigații în diverse grupuri populaționale au fost făcute pentru două polimorfisme ale genei PPAR- γ . (50) Prima se referă la o substituție silențioasă CAC478-CAT la nivelul exonului 6, iar a doua este o substituție prolină cu alanina (missense) la nivelul exonului 2, codon 12.

Majoritatea studiilor nu demonstrează o legătură semnificativ statistică între SOPC și polimorfismul PPAR- γ , deși investigațiile funcționale mențin suspiciunea implicării PPAR- γ în etiopatogenia SOPC (50-54). Un studiu global recent nu probează diferențe semnificative statistic ale genotipului sau ale distribuției alelelor polimorfismului Pro12Ala între lotul SOPC și lotul martor. (55)

Alte gene candidat implicate în SOPC

Printre celelalte gene investigate (IGF Insulin-like growth factors, paraoxonaza, gene ce codifică glicogen sintetaza, resistina, leptina, adiponectina) nu au fost individualizate asocieri semnificative între SOPC și variantele genomice ale acestor gene.

CONCLUZII

Sindromul ovarelor polichistice este o afecțiune complexă ce ilustrează interacțiunea dintre factorii de mediu și susceptibilitatea genetică. În ciuda eforturilor depuse prin implicarea multiplelor variante genetice în mecanisme patogenetice logice ale sindromului, la ora actuală nu există nici o genă universal acceptată ca implicare certă în etiopatogenia SOPC.

REFERINTE

1. Azziz R, Woods KS, Reyna R, Key TJ, Knochenhauer ES, Yildiz BO. The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2004;89(6):2745-2749.
2. Zawadzki JK, Dunaif A. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome. In: Dunaif A, Givens J, Haseltine F, Merriam GR, editors. *Polycystic Ovary Syndrome*. Boston, Mass, USA: Blackwell Scientific; 1992. p. 377-384.
3. Azziz R. Diagnosis of Polycystic Ovarian Syndrome: The Rotterdam Criteria Are Premature. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2006;91(3):781-785.
4. The Rotterdam ESHRE/ASRM - sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long - term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Human Reproduction*. 2004;19(1):41-47.
5. Carmina E. Diagnosis of polycystic ovary syndrome: from NIH criteria to ESHRE-ASRM guidelines. *Minerva ginecologica*. 2004;56(1):1-6.
6. Brassard M, AinMelk Y, Baillargeon JP: Basic infertility including polycystic ovary syndrome. *Med Clin North Am*. 2008;92:1163-1192.
7. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, Janssen OE, Legro RS, Norman RJ, Taylor AE, Witchel SF. Task Force on the Phenotype of the Polycystic Ovary Syndrome of The Androgen Excess and PCOS Society: The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertil Steril* 2009;91:456-488.
8. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, Janssen OE, Legro RS, Norman RJ, Taylor AE, Witchel SF, Androgen Excess Society: Position statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:4237-4245.
9. Teede H, Deeks A, Moran L. Polycystic ovary syndrome: a complex condition with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan, *BMC Medicine*. 2010;8:41.
10. Dunaif A, Finegood DT. Beta-cell dysfunction independent of obesity and glucose intolerance in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81:942-947.
11. O'Meara N, Blackman JD, Ehrmann DA, Barnes RB, Jaspan JB, Rosenfield RL, Polonsky KS. Defects in beta-cell function in functional ovarian hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993;76:1241-1247.
12. Ehrmann DA, Barnes RB, Rosenfield RL, Cavaghan MK, Imperial J. Prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care*. 1999;22:141-146.
13. Diamanti-Kandarakis E, Papavassiliou AG. Molecular mechanisms of insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *Trends Mol Med*. 2006;12:324-332.
14. Meyer C, McGrath BP, Teede HJ. Overweight women with polycystic ovary syndrome have evidence of subclinical cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:5711-5716.
15. Talbott E, Clerici A, Berga SL, Kuller L, Guzick D, Detre K, Daniels T, Engberg RA. Adverse lipid and coronary heart disease risk profiles in young women with polycystic ovary syndrome: results of a case-control study. *J Clin Epidemiol*. 1998;51:415-422.

REFERATE

16. March RE. Gene mapping by linkage and association analysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology*. 1999;13(2):113-122.
17. Palmer LJ, Cardon LR. Shaking the tree: mapping complex disease genes with linkage disequilibrium. *Lancet*. 2005;366(9492):1223-1234.
18. Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocrine Reviews*. 1997;18(6):774-800.
19. Kennedy GC, German MS, Rutter WJ. The minisatellite in the diabetes susceptibility locus IDDM2 regulates insulin transcription. *Nature Genetics*. 1995;9(3):293-298.
20. Paquette J, Giannoukakis N, Polychronakos C, Vafiadis P, Deal C. The INS 5' variable number of tandem repeats is associated with IGF2 expression in humans. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(23):14158-14164.
21. Waterworth DM, Bennett ST, Gharani N, et al. Linkage and association of insulin gene VNTR regulatory polymorphism with polycystic ovary syndrome. *Lancet*. 1997;349(9057):986-990.
22. Eaves IA, Bennett ST, Forster P, et al. Transmission ratio distortion at the INS-IGF2 VNTR. *Nature Genetics*. 1999;22(4):324-325.
23. Urbanek M, Legro RS, Driscoll DA, et al. Thirty-seven candidate genes for polycystic ovary syndrome: strongest evidence for linkage is with follistatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(15):8573-8578.
24. Calvo RM, Tellería D, Sancho J, San Millán JL, Escobar-Morreale HF. Insulin gene variable number of tandem repeats regulatory polymorphism is not associated with hyperandrogenism in Spanish women. *Fertility and Sterility*. 2002;77(4):666-668.
25. Vanková M, Vrbíková J, Hill M, Cinek O, Bendlová B. Association of insulin gene VNTR polymorphism with polycystic ovary syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002;967:558-565.
26. Xu Y, Wei Z, Zhang Z, Xing Q, Hu P, Zhang X, Gao G, Wang Y, Gao Q, Yi L, Cao Y. No association of the insulin gene VNTR polymorphism with polycystic ovary syndrome in a Han Chinese population. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009 Dec 1;7:141.
27. Ioannidis JPA, Trikalinos TA, Ntzani EE, Contopoulos-Ioannidis DG. Genetic associations in large versus small studies: an empirical assessment. *Lancet*. 2003;361(9357):567-571.
28. Diamanti-Kandarakis E, Piperi C. Genetics of polycystic ovary syndrome: searching for the way out of the labyrinth. *Human Reproduction Update*. 2005;11(6):631-643.
29. Sorbara LR, Tang Z, Cama A, et al. Absence of insulin receptor gene mutations in three insulin-resistant women with the polycystic ovary syndrome. *Metabolism*. 1994;43(12):1568-1574.
30. Conway GS, Avey C, Rumsby G. The tyrosine kinase domain of the insulin receptor gene is normal in women with hyperinsulinaemia and polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction*. 1994;9(9):1681-1683.
31. Talbot JA, Bicknell EJ, Rajkhowa M, Krook A, O'Rahilly S, Clayton RN. Molecular scanning of the insulin receptor gene in women with polycystic ovarian syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1996;81(5):1979-1983.
32. Siegel S, Futterweit W, Davies TF, et al. A C/T single nucleotide polymorphism at the tyrosine kinase domain of the insulin receptor gene is associated with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*. 2002;78(6):1240-1243.
33. Urbanek M, Woodroffe A, Ewens KG, et al. Candidate gene region for polycystic ovary syndrome on chromosome 19p13.2. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2005;90(12):6623-6629.
34. Goodarzi MO, Louwers YV, Taylor KD, Jones MR, Cui J, Kwon S, Chen YD, Guo X, Stolk L, Uitterlinden AG, Laven JS, Azziz R. Replication of association of a novel insulin receptor gene polymorphism with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2011 Apr;95(5):1736-41.e1-11.
35. White MF. IRS proteins and the common path to diabetes. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. 2002;283(3):E413-E422.
36. Burks DJ, White MF. IRS proteins and beta-cell function. *Diabetes*. 2001;50, supplement 1:S140-S145. [PubMed]
37. Jellema A, Zeegers MPA, Feskens EJM, Dagnelie PC, Mensink RP. Gly972Arg variant in the insulin receptor substrate-1 gene and association with type 2 diabetes: a meta-analysis of 27 studies. *Diabetologia*. 2003;46(7):990-995.
38. Sir-Petermann T, Pérez-Bravo F, Angel B, Maliqueo M, Calvillan M, Palomino A. G972R polymorphism of IRS-1 in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetologia*. 2001;44(9):1200-1201. [PubMed]
39. El Mkaem SA, Lautier C, Macari F, et al. Role of allelic variants Gly972Arg of IRS-1 and Gly1057Asp of IRS-2 in moderate-to-severe insulin resistance of women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes*. 2001;50(9):2164-2168.
40. Ehrmann DA, Tang X, Yoshiuchi I, Cox NJ, Bell GI. Relationship of insulin receptor substrate-1 and -2 genotypes to phenotypic features of polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2002;87(9):4297-4300.
41. Villuendas G, Botella-Carretero JL, Roldán B, Sancho J, Escobar-Morreale HF, San Millán JL. Polymorphisms in the insulin receptor substrate-1 (IRS-1) gene and the insulin receptor substrate-2 (IRS-2) gene influence glucose homeostasis and body mass index in women with polycystic ovary syndrome and non-hyperandrogenic controls. *Human Reproduction*. 2005;20(11):3184-3191.
42. Dilek S, Ertunc D, Tok EC, Erdal EM, Aktas A. Association of Gly972Arg variant of insulin receptor substrate-1 with metabolic features in women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*. 2005;84(2):407-412.
43. Ertunc D, Tok EC, Aktas A, Erdal EM, Dilek S. The importance of IRS-1 Gly972Arg polymorphism in evaluating the response to metformin treatment in polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction*. 2005;20(5):1207-1212.
44. Wiernsperger NF, Bailey CJ. The antihyperglycaemic effect of metformin therapeutic and cellular mechanisms. *Drugs*. 1999;58, supplement 1:31-39. discussion 75-82.
45. Horikawa Y, Oda N, Cox NJ, et al. Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nature Genetics*. 2000;26(2):163-175.
46. Ehrmann DA, Schwarz PEH, Hara M, et al. Relationship of calpain-10 genotype to phenotypic features of polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2002;87(4):1669-1673.
47. Gonzalez A, Abril E, Roca A, et al. Specific CAPN10 gene haplotypes influence the clinical profile of polycystic ovary patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2003;88(11):5529-5536.
48. Haddad L, Evans JC, Gharani N, et al. Variation within the

- type 2 diabetes susceptibility gene calpain-10 and polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2002;87(6):2606-2610.
49. Escobar-Morreale HF, Peral B, Villuendas G, Calvo RM, Sancho J, San Millán JL. Common single nucleotide polymorphisms in intron 3 of the calpain-10 gene influence hirsutism. *Fertility and Sterility*. 2002;77(3):581-587.
50. Meirhaeghe A, Amouyel P. Impact of genetic variation of PPAR γ in humans. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2004;83(1-2):93-102.
51. Hara M, Alcoser SY, Qaadir A, Beiswenger KK, Cox NJ, Ehrmann DA. Insulin resistance is attenuated in women with polycystic ovary syndrome with the Pro12Ala polymorphism in the ppar γ gene. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2002;87(2):772-775.
52. Wang Y, Wu X, Cao Y, Yi L, Fan H, Chen J. Polymorphisms of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ and its coactivator-1 α genes in Chinese women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*. 2006;85(5):1536-1540.
53. Yilmaz M, Ergün MA, Karakoç A, Yurtçu E, Çakir N, Arslan M. Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ gene in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecological Endocrinology*. 2006;22(6):336-342.
54. Seto-Young D, Paliou M, Schlosser J, et al. Direct thiazolidinedione action in the human ovary: insulin-independent and insulin-sensitizing effects on steroidogenesis and insulin-like growth factor binding protein-1 production. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2005;90(11):6099-6105.
55. Xita Nectaria, Lazaros Leandros, Georgiou Ioannis, Tsatsoulis Agathocles, The Pro12Ala polymorphism of the PPAR- γ gene is not associated with the polycystic ovary syndrome, *HORMONES* 2009;8(4):267-272.