

UCH-FC
Biotecnología
E186
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE INGENIERIA EN BIOTECNOLOGIA MOLECULAR

MEMORIA DE TITULO

**ANALISIS DEL POLIMORFISMO TRP64ARG DEL RECEPTOR
BETA 3 ADRENERGICO EN EL SINDROME DE OVARIO
POLIQUISTICO Y SU POSIBLE ASOCIACION CON OBESIDAD E
INSULINO-RESISTENCIA**

BARBARA SUSANA ECHIBURU LOPEZ

SANTIAGO - CHILE 2003

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO**

**ANALISIS DEL POLIMORFISMO TRP64ARG DEL RECEPTOR
BETA 3 ADRENERGICO EN EL SINDROME DE OVARIO
POLIQUISTICO Y SU POSIBLE ASOCIACION CON OBESIDAD E
INSULINO-RESISTENCIA**

DIRECTORES DE TESIS

**Prof. Dra. Teresa Sir-Petermann
Prof. Dr. Francisco Pérez-Bravo**

Financiado por el Proyecto Fondecyt 1000973

**MEMORIA PARA OPTAR AL TITULO DE INGENIERO EN
BIOTECNOLOGIA MOLECULAR**

**BARBARA SUSANA ECHIBURU LOPEZ
2003**



**ANALISIS DEL POLIMORFISMO TRP64 ARG DEL RECEPTOR BETA 3
ADRENERGICO EN EL SINDROME DE OVARIO POLIQUISTICO Y SU POSIBLE
ASOCIACION CON OBESIDAD E INSULINO-RESISTENCIA**

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

BARBARA SUSANA ECHIBURU LOPEZ

Directores de Memoria de Título

Dra. Teresa Sir-Petermann

Dr. Francisco Pérez Bravo

Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dra. Madeleine Lamborot Chandía
Presidente Comisión

Dra. Lucía Cifuentes Ovalle

Dra. Cecilia Albala Breubis

Firmas manuscritas de los directores y miembros de la comisión de evaluación, escritas sobre líneas horizontales.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a mis directores de tesis: a la Dra. Teresa Sir y a Francisco por haber confiado en mí durante el desarrollo de la tesis y por su apoyo y críticas que ayudan en mi formación científica- profesional. A Francisco por la confianza que deposita en sus tesis y que permite que uno desarrolle la capacidad de razonar y resolver problemas.

Gracias a mis compañeros y amigos con los que compartimos largas jornadas de estudio y discusión de distintos temas, así como otras tantas de recreación y con los cuales me alegro de haber pasado ese valioso tiempo.

Quiero agradecer a mi amiga Pabla que con su amistad y asesoría técnico-gráfica participó en el desarrollo de mi tesis.

Agradezco sobre todo y muy profundamente a mi familia: tíos, primos y abuelos, pilar fundamental de mi formación personal y profesional; que han comprendido y disfrutado todos mis logros y que me han entregado todo el apoyo y aún más .

Agradezco a mis padres Juany y Medardo por haberme dado la posibilidad de estudiar y desarrollarme, entregándome además las herramientas y valores para ser quien soy. Los cuales con su amor y apoyo incondicional me animan a cumplir mis metas en la vida. A mi hermana Tamara, que con su alegría y espíritu emprendedor me ha enseñado que todas las dificultades se pueden resolver. A Iñaki, que con su sonrisa y palabritas me entregan la fuerza y el ánimo cada día. A mi prima Pamela, de quien he recibido ayuda y cariño y que es como mi segunda hermana. Al Salva y Tiara por su alegría.

Agradezco al Coco su constante comprensión y cariño durante todo mi período de estudio y su ayuda constante que facilitaron e hicieron más gratos mis estudios.

Quiero agradecer también a mi primo Bobby, que me entregó siempre su apoyo y alegría y sé que aún lo hace desde su nuevo mundo.

INDICE DE MATERIAS

INDICE DE FIGURAS	iii
INDICE DE TABLAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	v
RESUMEN	vii
SUMMARY	ix
INTRODUCCION	1
I. OBESIDAD	1
II. MARCADORES GENETICOS EN OBESIDAD	3
III. RECEPTORES ADRENERGICOS-OBESIDAD	7
III. 1 RECEPTOR ADRENERGICO BETA 3	8
III. 2 POLIMORFISMO EN ADRB-3	12
IV. SINDROME DE OVARIO POLIQUISTICO (SOP).....	15
IV. 1 SOP Y OBESIDAD	17
OBJETIVOS	26
HIPOTESIS	27
METODOLOGIA GENERAL	28
MATERIALES	28
TAMAÑO DE LA MUESTRA	28
REACTIVOS	29
METODOS	30
DISEÑO DEL ESTUDIO	30
SUJETOS Y METODOS	30
CARACTERIZACION DE LAS PACIENTES	32
PROTOCOLO DE ESTUDIO	33
ANALISIS ESTADISTICO	37

METODOLOGIA MOLECULAR	39
I. OBTENCION DE DNA GENOMICO.....	39
II. AMPLIFICACION DE DNA POR LA TECNICA DE PCR.....	39
II. 1 OLIGONUCLEOTIDOS	39
II. 2 REACCION DE AMPLIFICACION	40
III. DIGESTION CON ENZIMA DE RESTRICCION	42
IV. ANALISIS DEL POLIMORFISMO TRP64ARG DEL GEN ADRB-3	43
RESULTADOS	45
DISCUSION	58
CONCLUSIONES	65
REFERENCIAS	66

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.- ESQUEMA DEL CROMOSOMA 8	9
FIGURA 2.- ESQUEMA DEL RECEPTOR BETA 3 ADRENERGICO	11
FIGURA 3.- ESQUEMA DE LA OBESIDAD COMO DETERMINANTE DE UN FENOTIPO OBESO EN EL SOP	25
FIGURA 4.- ANALISIS DEL PRODUCTO DE PCR ADRB-3	41
FIGURA 5.- DIAGRAMA DE LA MUTACION ADRB-3 64 Y SU PATRON DE CORTE	43
FIGURA 6.- ANALISIS DEL POLIMORFISMO ADRB-3 POR DIGESTION CON BstNI	44
FIGURA 7.- FRECUENCIA GENOTIPICA SEGUN CATEGORIA DE IMC, EN LOS GRUPOS SOP Y CONTROL.....	55

INDICE DE TABLAS

TABLA 1.- CARACTERISTICAS CLINICAS DE MUJERES CICLICAS CONTROLES Y PORTADORAS DE SOP	45
TABLA 2.- CARACTERISTICAS ENDOCRINOLOGICAS DE MUJERES PORTADORAS DE SOP	46
TABLA 3.- DISTRIBUCION PORCENTUAL DE MUJERES CONTROLES Y PORTADORAS DE SOP, DE ACUERDO A SU IMC	47
TABLA 4.- FRECUENCIA GENOTIPICA DE LA VARIANTE TRP64ARG	48
TABLA 5.- CARACTERISTICAS ANTROPOMETRICAS DE MUJERES CON SOP Y GRUPO CONTROL, SEGUN LA MUTACION	49
TABLA 6.- CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE MUJERES CON SOP Y GRUPO CONTROL, SEGUN LA MUTACION	50
TABLA 7.- PERFIL LIPIDICO DE MUJERES CON SOP Y CONTROLES, SEGUN LA MUTACION	51
TABLA 8.- PERFIL LIPIDICO Y PARAMETROS DE RI EN MUJERES CONTROLES, SEGUN INDICE DE HANNES	52
TABLA 9.- PERFIL LIPIDICO Y PARAMETROS DE RI EN MUJERES CON SOP, SEGUN INDICE DE HANNES	53

LISTA DE ABREVIATURAS

ADRB2	Beta 2 adrenérgico (Adrenergic beta 2)
ADRB3	Beta 3 adrenérgico (Adrenergic beta 3)
cAMP	Adenocín monofosfato cíclico (Adenocin monophosphate cíclic)
DHEA-SO4	Dehidroepiandrosterona sulfato
FABP-2	Proteína ligante 2 de ácidos grasos (Fatty acid binding protein 2)
FFA	Acidos grasos libres (Free fatty acids)
FPG	Glucosa plasmática en ayunas (Fasting plasmatic glucose)
FPI	Insulina plasmática en ayunas (Fasting plasmatic insulin)
HDL	Lipoproteína de alta densidad (High density lipoprotein)
HOMA	Modelo de valoración homeostática (Homeostatic model assesment)
IAL	Índice de andrógenos libres
ICC	Índice cintura-cadera
IMC	Índice de masa corporal
ISI	Índice de sensibilidad a la insulina
LDL	Lipoproteína de baja densidad (Low density lipoprotein)
LPL	Lipoproteína lipasa
NPY	Neuropeptido Y
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la DNA polimerasa (Polymerase chain reaction)

PPAR	Receptores activadores de la proliferación peroxisomal (Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma)
PTGO	Prueba de tolerancia a la glucosa oral
RFLP	Polimorfismo de largo de fragmento de restricción (Restriction fragment length polymorphism)
RI	Resistencia a la insulina
RIA	Radioinmuno-análisis
SHBG	Globulinas transportadoras de hormonas sexuales (Sex hormone binding globulin)
SNC	Sistema nervioso central
SNS	Sistema nervioso simpático
SOP	Síndrome de ovario poliquístico
TNFα	Factor de necrosis tumoral α (Tumor necrosis factor α)
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad (Very low density lipoprotein)
TE	Tris-EDTA
TAE	Tris-acetato de sodio-EDTA

RESUMEN

La obesidad representa uno de los mayores problemas de salud pública en todo el mundo. El exceso de tejido adiposo se asocia a distintas patologías crónicas, entre otras: dislipidemia, hipertensión arterial, hiperuricemia, síndrome de ovario poliquístico (SOP) y diabetes tipo 2. En el SOP, la obesidad es un fenómeno frecuente, alcanzando valores de hasta el 80%. En la actualidad se acepta que la obesidad es una patología multifactorial y se han propuesto distintos genes candidatos asociados con obesidad. En este sentido los genes involucrados en la regulación de catecolaminas podrían tener una función particularmente importante, dado su rol como proveedores de energía.

Estudios recientes han relacionado la mutación Trp64Arg del gen que codifica para el receptor ADRB-3 con cierto fenotipo de obesidad. La frecuencia reportada en la literatura para esta mutación varía entre 6% a 38%, dependiendo del origen de la población.

Esta tesis se centró en estimar la distribución de la mutación Trp64Arg en pacientes con SOP y mujeres controles chilenas, y asociarla a características antropométricas y metabólicas relacionadas con la obesidad.

Para estudiar el polimorfismo 64 del ADRB-3 se realizó análisis molecular mediante amplificación por PCR y análisis RFLP con la enzima de restricción BstNI.

Los resultados muestran que la frecuencia del heterocigoto Trp64Arg fue de 0,38 en mujeres con SOP y 0,37 en mujeres controles, encontrándose sólo dos homocigotas para la mutación, ambas mujeres con SOP. La frecuencia de la

mutación en el grupo total de mujeres (SOP y controles), fue semejante a la descrita para esquimales de Alaska. Considerando a toda la población analizada, el 65% de la población portadora de la mutación presentó sobrepeso u obesidad.

La mutación se asoció en mujeres con SOP a una mayor concentración de triglicéridos, independiente del peso corporal. Dadas las especiales características de distribución de grasa e hiperandrogenismo que presentan las mujeres con SOP, semejantes a un fenotipo masculino; sugerimos que el gen ADRB-3 interactuaría con esteroides sexuales en el desarrollo de dislipidemia.

ANALYSIS OF THE TRP64ARG POLYMORPHISM FROM THE ADRENERGIC BETA 3 RECEPTOR IN THE POLYCYSTIC OVARY SYNDROME AND IT'S POSSIBLE ASSOCIATION WITH OBESITY AND INSULIN-RESISTANCE

SUMMARY

Obesity represents one of the most important problems in public health around the world. The excess of adipose tissue is associated to different chronic pathologies, among them are: dyslipidemia, arterial hypertension, hyperuricemia, polycystic ovary syndrome (PCOS) and type 2 diabetes. In the PCOS, obesity is a frequent phenomenon, reaching values up to 80%. At the present time, it is accepted that obesity is a multifactorial pathology and they have been proposed different candidate genes associated with obesity. In this sense the genes involved in the regulation of catecholamines could have a particularly important function, given their role as energy expenditure.

Recent studies have related the Trp64Arg mutation of the gene that codifies for the ADRB-3 receptor with certain fenotype of obesity. The frequency reported in the literature for this mutation varies between 6% to 38%, depending on the origin of the population.

This thesis was centered in the valuation of the distribution of the Trp64Arg mutation in PCOS patients and chilean control women, and the association of this polymorphism with anthropometric and metabolic characteristics involved in obesity.

In order to study the 64 polymorphism of the ADRB-3 an analysis was carried out by means of amplification by PCR and RFLP analysis with the BstNI restriction enzyme.

The results show that the frequency of the Trp64Arg heterozygote was of 0.38 in women with PCOS and 0.37 in control women, being found only two homozygote carriers for the mutation, both women with PCOS. The frequency of the mutation in the entire group of women (PCOS and controls), was similar to the described for the Eskimos of Alaska. Considering the whole analyzed population, the 65% of the population, carrier of the mutation, presented overweight or obesity.

The mutation was associated, in women with PCOS, to a bigger concentration of triglycerides, independent of the body weight. Given the special characteristics of the distribution of fat and hyperandrogenism that exhibit the women with PCOS, similar to a masculine phenotype; we suggest that the ADRB-3 gene would interact with sexual steroids in the development of dyslipidemia.

INTRODUCCION

I. OBESIDAD

La obesidad es un desorden metabólico complejo que resulta de la acción de un diverso número de factores genéticos y ambientales que interactúan entre sí (Clement K, 2002).

La obesidad debe ser considerada en la actualidad como uno de los más grandes problemas de salud en el mundo. En 1999 el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades en USA reportó que la obesidad ($IMC \geq 30 \text{ Kg/m}^2$) se había incrementado desde un 12,0% en 1991 a un 17,9% en 1998. En el resto del mundo la situación es similar o peor. En Chile las actuales cifras de obesidad son alarmantes, principalmente si miramos la población infantil que se encuentra afectada (Kain J, 2002).

La prevalencia de obesidad está aumentando en forma alarmante en todo el mundo, especialmente en las sociedades occidentales. Chile no es ajeno a esta realidad, constatándose un aumento en las cifras de obesidad en todos los grupos etáreos. Diversos estudios epidemiológicos muy bien diseñados han clarificado la estrecha asociación de la obesidad con morbilidad y mortalidad por diabetes tipo 2, enfermedad coronaria, hipertensión, algunos tipos de cáncer e invalidez de origen osteomuscular, enfermedades que actualmente están entre las primeras causas de enfermedad, invalidez y muerte en Chile (Albala C, 2002) .

En el estudio de la obesidad, la investigación en el campo de la genética y su relación con los factores ambientales representan un desafío que debemos enfrentar para contribuir a clarificar su etiología y perfil de riesgo. En la mayor parte de las sociedades occidentales, la alta incidencia de obesidad ha sido atribuída a muchos factores; incluyendo herencia, disponibilidad y selección de determinado tipo de alimentos, reducción del gasto energético y estilos de vida (Hirsch J, 2002).

La noción de que las anormalidades genéticas contribuyen a la obesidad, ha ganado un importante avance en los últimos años con el hallazgo de diversos genes que, eventualmente, prestarían utilidad como marcadores genéticos de este complejo problema (Arner P, 2000).

Aunque la naturaleza de la señal que informa al sistema nervioso central (SNC) del grado de adiposidad no se conoce con certeza, existe fuerte evidencia que la insulina juega un importante rol en este proceso. La secreción de insulina es particularmente sensible a la ingesta y al ayuno, como también es secretada a la sangre en proporción a la adiposidad; llega al cerebro a través de vasos capilares actuando a ese nivel como una señal que provoca una reducción de la ingesta energética por disminución de la síntesis de neurotransmisores que aumentan el apetito y cambia el metabolismo para favorecer el consumo de grasas. La hiperinsulinemia del obeso se correlaciona con la cuantía y la topografía del tejido adiposo, siendo característico encontrar altas concentraciones de insulina plasmática asociada a obesidad severa y en obesos con una distribución de grasa corporal de tipo abdominal (Wood SC, 2000; Wilding JPH, 2002).

Los mecanismos etiológicos que influyen la topografía del tejido adiposo y consecuentemente el tamaño de la masa grasa intraabdominal son también muy complejos e incluyen factores genéticos, ambientales y neuroendocrinos. Los estudios efectuados sugieren que la mayor parte de las alteraciones metabólicas que constituyen riesgo para la salud en los obesos andróides, se acompañan de un marcado aumento de la resistencia insulínica periférica y por una secreción y captación anormal de la insulina (Summers SA, 2000).

II. MARCADORES GENETICOS EN OBESIDAD

Hay una fuerte evidencia proveniente desde estudios familiares que sugiere que el peso corporal es regulado por factores genéticos. Los genes causantes de obesidad en modelos de roedores están siendo recientemente bien definidos. Sin embargo, los genes involucrados en la obesidad animal no parecen tener la misma importancia relativa en modelos humanos, excepto en algunos casos (Clement K, 2002; Arner P, 2000).

Desde el punto de vista genético la obesidad debe entenderse como poligénica y multifactorial. Poligénica, porque son múltiples los genes involucrados y mencionados como candidatos y multifactorial, dado que la sola presencia de ciertas variantes genéticas no es una condición suficiente para desarrollar la patología; en otras palabras, en la mayoría de las veces se requiere de algún

evento ambiental que ponga de manifiesto una determinada expresión de un gen. Entre estos eventos ambientales se distinguen claramente la dieta y el estilo de vida (actividad física y sedentarismo) como reguladores de una amplia gama de variantes genéticas. Es por esta razón que la obesidad, junto a otras patologías similares (diabetes tipo 2, hipertensión, dislipidemia y síndrome de ovario poliquístico) se enmarcan dentro de aquellas enfermedades de interacción génica, claramente las más difíciles de interpretar desde el punto de vista genético, ya que carecen de un marcador molecular único y absoluto (Clement K, 2002; Arner P, 2000).

Mirando con detención algunos órganos y tejidos, uno de los más estudiados en los últimos 8 años ha sido el tejido adiposo y en él podemos mencionar importantes moléculas tales como la leptina, factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$), resistina, adiponectina y varias citoquinas relevantes. Para la leptina, la amplia investigación de la cual ha sido objeto ha revelado que es uno de los más importantes reguladores a largo plazo de la ganancia de peso. A pesar del gran impacto que generó el descubrimiento del gen *ob/ob* y los receptores de leptina; el modelo animal *ob/ob* (carente de leptina) o el modelo animal deficiente en el receptor (*db/db*), donde se puede demostrar casi en su totalidad el fenómeno de la obesidad, en el hombre se presenta una situación inversa; los obesos producen más leptina, excepto algunos casos aislados (Woods SC, 2000; Summers SA, 2000).

Resistina y adiponectina han tomado un curso parecido, las variantes genéticas que se presentan en el modelo animal (rata o ratón) no se presentan en

el hombre a pesar de tener una alta homología, siendo ambas moléculas intermedias de algunas señales generadas a partir del tejido adiposo. En el caso del $\text{TNF}\alpha$, esta molécula se encuentra aumentada en la obesidad, los obesos muestran altos niveles de $\text{TNF}\alpha$, que a nivel celular juega un papel muy importante en la expresión de glucotransportadores. El gen del $\text{TNF}\alpha$ presenta polimorfismo al igual que el gen que codifica para su receptor (Woods SC, 2000; Saad MF, 2002; Maeda N, 2002).

Centrando la atención en regulación más fina, claramente las señales que regulan la diferenciación adipocitaria tienen un grado de importancia mayor. Así factores transcripcionales como PPAR pueden ser cruciales en la maduración y conducción del estado de pre-adipocito a adipocito y por lo tanto su grado de polimorfismo o nivel de expresión adquiere una relevancia notable en el origen de la obesidad (Unger RH, 2002).

Al observar el metabolismo lipídico, varios genes han sido implicados directa o indirectamente en el proceso de obesidad. Dentro de estos tal vez la más importante de las enzimas que regula la hidrólisis de triglicéridos, la lipoproteína lipasa (LPL) la cual posee un amplio grado de polimorfismo y diversas variantes han sido asociadas en distintas razas y grupos étnicos; ya sea con obesidad, hipertrigliceridemia o insulinoresistencia (Unger RH, 2002).

La regulación de la ingesta alimentaria no sólo pasa por aquellos órganos y tejidos que nos parecen más evidentes. Existe una amplia gama de orexinas muy bien definidas que pueden jugar un papel muy relevante en esta regulación a corto plazo de la ingesta. El neuropéptido Y (NPY) es una de las moléculas que a nivel

cerebral, principalmente centros ventromediales y núcleo arcuato, regula la ingesta y antagoniza con la leptina en su función (Wilding JPH, 2002).

A nivel de estómago, recientemente se ha descrito a la GH relina, un péptido de 28 aminoácidos y un importante secretagogo generado en forma abundante por el estómago; esta molécula tiene una función orexigénica. En el modelo animal la administración periférica o intracerebro-ventricular estimula el consumo de alimentos y la utilización de carbohidratos (Saad MF, 2000).

El páncreas y el intestino son otros dos órganos que también han sido relacionados al fenómeno de la obesidad. En el intestino, FABP-2, una proteína transportadora de ácidos grasos ha sido correlacionada con incrementos en el IMC y con resistencia a la insulina (Woods SC, 2000).

Por otra parte, no debemos perder de vista aquellos genes involucrados en gasto energético; otra variable que afecta enormemente la ganancia de peso. Entre ellos, tal vez los más estudiados sean los receptores beta 2 y beta 3 adrenérgicos (ADRB-2 y ADRB-3). En el caso de ADRB-3 y su variante génica Trp64Arg, es el único marcador molecular que presenta asociación con incrementos de IMC, según los grupos étnicos analizados (Arner P, 1999).

Resulta claro que realizar un listado de los genes implicados en la patogenia de la obesidad es una tarea enorme y probablemente estéril.

La obesidad, al ser un fenómeno extremadamente complejo, corresponde a la patología que más publicaciones genera al año y que ha movilizó el mayor volumen de recursos en los últimos 10 años. No obstante, los pasos agigantados que da la biología molecular, aún no es posible encontrar un gen mayor que determine sus principales características. Bajo esta premisa, la contribución de

determinadas variantes génicas debe ser tomada con cautela, en el contexto de interacción a la cual obedece la patología y en el cual los eventos ambientales pueden ser de igual o mayor importancia que la variabilidad genética observada en cada población.

III. RECEPTORES ADRENERGICOS - OBESIDAD

Aunque la identidad de la mayoría de los genes relacionados al peso corporal y obesidad en humanos son desconocidos, genes relacionados con la regulación de catecolaminas podrían ser particularmente importantes para la obesidad humana por su rol central como disipadores de energía (Arner P, 1999; Emorine LJ, 1989). Recientemente la asociación putativa entre obesidad y polimorfismo en genes relacionados con los receptores beta adrenérgicos está siendo intensamente estudiado, debido a la importancia de esos receptores en la movilización y utilización de energía desde los depósitos de grasa y la estimulación de la termogénesis.

A pesar de la controversia que se ha generado respecto a estos receptores beta adrenérgicos, hay evidencia acumulativa de que sus genes estarían involucrados en la patogénesis de la obesidad (P Arner, 1999).

Se ha sugerido que los depósitos de grasa corporal y el balance energético son mayormente controlados por el sistema adrenérgico.

Relacionado a la función del sistema adrenérgico se encuentran las catecolaminas, las cuales estimulan la lipólisis en las células adiposas y la

termogénesis en el músculo esquelético y tejido adiposo magro, a través de receptores adrenérgicos acoplados a proteínas G, adenilato ciclasa y cAMP (Lönnqvist J, 1993).

En particular, los genes que codifican para los receptores adrenérgicos beta 2 y beta 3 son genes candidatos de gran interés (Giacobino JP, 1995; Walston J, 1995; Clément K, 1995).

III. 1 RECEPTOR ADRENERGICO BETA 3

El receptor beta 3 adrenérgico es un receptor integral de membrana que posee 7 dominios transmembrana, está acoplado a proteínas G y se expresa en el tejido adiposo visceral; este receptor contribuye a la regulación de la tasa metabólica y la lipólisis (Walston J, 1995). Además estimula la movilización de lípidos desde las células grasas blancas y aumenta la termogénesis en células grasas pardas. La administración de agonistas selectivos a animales obesos reduce efectivamente las reservas de grasa (Giacobino JP, 1995). La estimulación del receptor por agonistas beta adrenérgicos activan adenilato ciclasa, la cual aumenta la concentración intracelular de AMP cíclico (cAMP) y provoca un aumento en la lipólisis y en la termogénesis (Emorine LJ, 1989; Krief S, 1993).

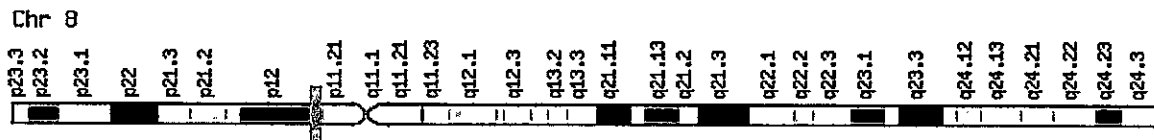
Además hay evidencias de que anomalías moleculares en el receptor beta 3 adrenérgico podrían conducir a obesidad y diabetes tipo 2.

La expresión del receptor es marcadamente disminuída en modelos de roedores de obesidad (Collins S, 1994; Muzzin P, 1991); ratones "knockout" del

gen para el receptor ADRB-3 tienen notables disminuciones en la lipólisis estimulada por agonistas beta (Susulic S, 1995); y agonistas beta 3 específicos tienen potentes efectos anti-obesidad y anti-diabético en animales (Himms-Hagen J, 1994; Connacher AA, 1992) y humanos (Connacher AA, 1992; Mitchell TH, 1989).

El gen que codifica para el receptor ADRB-3 se localiza en el brazo corto del cromosoma 8 (8p) y tiene un tamaño de 2644 pb. El receptor beta 3, por su parte, comprende 408 aminoácidos.

Figura 1: Esquema del cromosoma 8



En la figura se observa el cromosoma 8 y se indica la ubicación relativa del gen que codifica para el receptor ADRB3, ubicado en el brazo corto de este cromosoma.

El análisis de la secuencia del alelo mutado arginina 64 del receptor beta 3, describe un cambio de base de triptófano por arginina, en el aminoácido de posición 64 ubicado en el primer "loop" intracelular del receptor. Este cambio es confirmado por digestión con la enzima de restricción BstNI (Walston J, 1995).

El primer "loop" intracelular del receptor ADRB3 es de vital importancia ya que proporciona el movimiento del receptor a la superficie celular y posiblemente también para el acoplamiento de la proteína G. La expresión defectuosa en la superficie celular o el deterioro de la señal podría conducir a una lipólisis y termogénesis disminuída en el tejido graso visceral que podría contribuir a la

obesidad central, resistencia a la insulina y diabetes tipo 2, entre otros (Walston J, 1995).

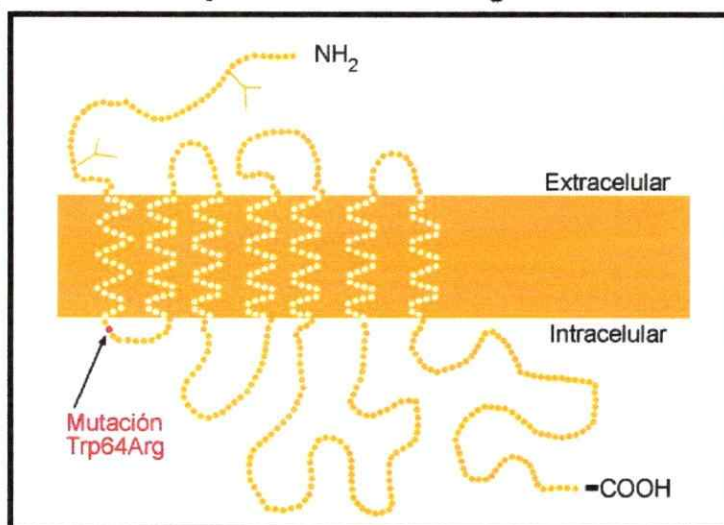
La forma en que el receptor beta 3 adrenérgico podría estar patogénicamente involucrado en el desarrollo de insulino-resistencia en el músculo, tendría relación con el aumento en los depósitos de grasa abdominal, lo cual podría proveer de más ácidos grasos para la síntesis de lipoproteína de muy baja densidad en el hígado; lo que posiblemente provocaría cambios en la composición de ácidos grasos de las membranas del músculo esquelético o mayores concentraciones de triglicéridos en el músculo (Bolkman M, 1993). En humanos, la obesidad visceral está asociada con el aumento en la sensibilidad de grasa visceral a la lipólisis inducida por catecolaminas (Lönnqvist F, 1995), mediado primariamente a través del efecto del receptor beta 3. La obesidad visceral está también asociada con la disminución en la captación de ácidos grasos libres por el músculo y con resistencia a la insulina en el músculo esquelético, en particular, en el deterioro de la síntesis de glicógeno estimulado por insulina (Colberg SR, 1995).

Numerosos estudios farmacológicos desarrollados con agonistas beta 3 altamente selectivos lo consideraron como una potente droga anti-obesidad y anti-diabética (Arch JRS, 1993) y ponen en evidencia que el receptor beta 3 está involucrado en la lipólisis de adipositos y en la actividad termogénica de varios animales de laboratorio (Lafontan M, 1993; Zaagsma J, 1990). En contraste, aunque el receptor beta 3 adrenérgico fue claramente expresado en una variedad de depósitos de grasa humano (Krief SF, 1993), su importancia fisiológica aún es motivo de controversia (Emorine LJ, 1994). Aunque los conflictos existentes se

deben principalmente a la selectividad de los componentes beta 3 analizados y a la metodología utilizada, un aumento en el ADRB-3 del tejido adiposo visceral podría ser responsable del aumento de la liberación de FFA, un fenómeno que contribuiría al desarrollo de perturbaciones metabólicas generalmente observadas en la obesidad abdominal (Lönnqvist F, 1995; Hoffstedt J, 1995)

Un defecto en el receptor beta 3 podría ser de gran importancia clínica en la fisiopatología de la obesidad porque podría conducir a alteraciones en las señales de transducción y mecanismos regulatorios; y provocar una disminución en la lipólisis del tejido adiposo y un estancamiento de la tasa metabólica debido a un exagerado crecimiento de la grasa corporal. Recientemente se ha sugerido que el alelo Arg64 del gen ADRB-3 podría ser predictivo, como una dificultad para la pérdida de peso en mujeres japonesas (Yoshida T, 1995). El rol putativo del receptor beta 3 en este escenario deberá ser aún dilucidado.

Figura 2: Esquema del receptor beta 3 adrenérgico



La figura muestra el diagrama del receptor beta 3 adrenérgico. Cada aminoácido se indica como un círculo. La mutación Trp64Arg está ubicada en el primer "loop" intracelular.

III. 2 POLIMORFISMO EN ADRB-3

Una mutación en el codón 64 del gen para el receptor beta 3 adrenérgico (ADRB-3), con reemplazo de triptófano por arginina (Trp64Arg) en el primer "loop" intracelular de la proteína receptora, se ha relacionado con obesidad, resistencia a la insulina y capacidad de ganancia de peso en varios estudios iniciales; dependiendo de los grupos étnicos (Widén E, 1995; Kawamura T, 1999). Sin embargo, se debe tener precaución respecto a la importancia de este polimorfismo en la obesidad; ya que la frecuencia de la variante arginina no ha sido mayor para los sujetos obesos en todos los estudios publicados, los cuales divergen en sus resultados para la función del polimorfismo Trp64Arg y su impacto en la obesidad.

La frecuencia reportada para la variante Arg difiere entre grupos étnicos. En la población Caucásica es de 8-10%, en la población Japonesa es cerca del 20% y la mayor frecuencia descrita es de 40% y corresponde a los grupos esquimales de Alaska (Fujisawa T, 1998).

Los individuos homocigotos (Arg64Arg) para esta mutación son poco frecuentes, pero generalmente se encuentran en una frecuencia que está de acuerdo al equilibrio de Hardy Weinberg (Arner P, 1999).

Algunos estudios en poblaciones Caucásicas y Japonesas han demostrado que hay un aumento en el índice de masa corporal (IMC) en portadores de la variante Arg 64 y que es más evidente en sujetos homocigotos para la mutación. En otros estudios no hay evidencias de un aumento del IMC en portadores del polimorfismo arginina, pero sí se ha observado que esos sujetos tienen alterada la

distribución de grasa, favoreciendo su acumulación. Se ha encontrado asociación género-específica entre la mutación Trp64Arg y fenotipos de obesidad, en una población española mediterránea; hombres portadores de la variante Arg 64 tienen mayor IMC, colesterol total y triglicéridos al compararlos con individuos normales; en mujeres se encontró una asociación entre LPL y ADRB-3 en la determinación del IMC (Corella D, 2001).

Es interesante destacar que muchos de los estudios comparativos entre individuos homocigotos y heterocigotos para la variante Arg 64 han encontrado que los sujetos homocigotos tienen una asociación mayor con obesidad que los portadores Trp64Arg. Sin embargo, esto no ocurre en la población de esquimales de Alaska, donde el 14% de la población es homocigota para la variante arginina y no presentan diferencias de IMC con portadores heterocigotos. Esto podría explicarse, en parte, debido a que la obesidad existe en diversos matices, es decir, obesidad complicada v/s una simple, en etapas tempranas v/s tardías, y muchas otras; que no son definidas en cada tipo de estudio (Arner P,1999).

Sería posible esperar una asociación con el cambio de peso, si la variante Trp64Arg fuera de importancia en el desarrollo de la obesidad (Clément K, 1995; Oksanen L, 1996; Clément K, 1996). Yoshida y colaboradores encontraron que portadores del alelo Arg 64 que son obesos reducen su peso corporal con dieta hipocalórica y ejercicio en menor proporción que portadores del alelo Trp (Yoshida T, 1995). Por otra parte, Fumeron y cols. demostraron resultados similares entre pérdida de peso y la presencia del alelo arginina 64 (Fumeron F, 1996) . Hay otros estudios que no han podido establecer relaciones de este polimorfismo con

el peso corporal (Walston J, 1995; Clément K, 1995; Oksanen L, 1996; Rissanen J, 1997).

También se ha estudiando la relación entre el polimorfismo Trp64Arg y su función metabólica basal, los resultados respecto a esta investigación han sido controversiales, y aunque parece tener alguna influencia en sistemas de células artificiales, los sistemas "*in vitro*" en células grasas humanas requieren de mayor estudio, por lo divergente de sus conclusiones.

Existen evidencias que indican que si bien la frecuencia de la variante Arg64 puede no diferir entre pacientes obesos mórbidos y un grupo control; según el estudio de Oksanen, sujetos obesos portadores del alelo Arg64 presentaban obesidad antes de los 15 años de edad, pudiendo ser un marcador de obesidad mórbida a temprana edad (Oksanen L, 1996).

Es de gran interés resaltar que muchos de los estudios comparativos entre sujetos homocigotos y heterocigotos para el alelo arginina 64 revelan que los individuos homocigotos tienen una asociación mucho más fuerte con la obesidad que los portadores Trp64Arg. Esto podría considerarse una evidencia de que la variante arginina 64 podría tener alguna asociación con obesidad (Arner P, 1999).

IV. SINDROME DE OVARIO POLIQUISTICO

El síndrome de ovario poliquístico (SOP), es uno de los desórdenes endocrinos más comunes en las mujeres premenopáusicas, caracterizado por anovulación crónica e hiperandrogenismo. Entre 50% al 80% de las mujeres con SOP presentan sobrepeso u obesidad, en la mayoría de los casos de fenotipo abdominal. En estas pacientes, la historia de la ganancia de peso frecuentemente precede a un cuadro de oligomenorrea e hiperandrogenismo; la obesidad podría jugar un rol patogénico en el desarrollo del síndrome (Knochenhaur ES, 1998).

En los últimos años, numerosos estudios han establecido una relación entre la resistencia a la insulina (RI) y el síndrome de ovario poliquístico (SOP).

La mayoría de las mujeres con SOP (60-80%) presenta RI periférica, la que afecta principalmente al músculo y al tejido adiposo, y una hiperinsulinemia compensatoria que puede manifestarse en forma independiente de la obesidad (Gambineri A., 2002). La RI, en conjunto con la disfunción de las células beta pancreáticas, constituyen una comorbilidad frecuente en estas pacientes, y juegan un papel preponderante en las consecuencias metabólicas a largo plazo del síndrome; entre las que se destacan la diabetes tipo 2 y la enfermedad cardiovascular (Ehrmann DA, 1999; Legro RS, 1999; Ehrmann DA, 1995). De hecho, más del 40% de estas pacientes desarrolla intolerancia a la glucosa y el 16% de ellas, diabetes tipo 2 al final de la cuarta década de la vida (Dahlgren E, 1992). Todo esto ha sido de tal trascendencia que llevó recientemente a Reaven a incorporar al SOP dentro del síndrome X o plurimetabólico de Reaven junto con

sus otros componentes (diabetes tipo 2, hipertensión arterial, dislipidemia, etc.), con lo cual el SOP, descrito inicialmente como un trastorno netamente reproductivo, quedó definido como un trastorno fundamentalmente endocrino-metabólico. Por lo tanto, es evidente, según todos estos argumentos, que el SOP debe considerarse un problema de salud pública que afecta a la mujer más allá de su esfera reproductiva, pero que, no obstante, la lleva a consultar a edades tempranas y ofrece justamente la oportunidad de detectar las anormalidades metabólicas asociadas en forma precoz (Carmina E, 1999).

Aunque este síndrome fue descrito en 1935 por Stein y Leventhal (Stein IF, 1935), sigue siendo un tema de gran controversia e interés debido a su heterogeneidad y a su compleja fisiopatología, lo que ha abierto el debate de si se trata de un trastorno único o múltiple. En la actualidad, la definición más ampliamente aceptada es la propuesta por la conferencia de consenso de la National Institute of Health (NIHD, 1990), que lo define como la presencia de hiperandrogenismo y oligo-ovulación en ausencia de otra causa específica de enfermedad de origen ovárico, adrenal o hipofisario (Zawadzki JK, 1992).

El cuadro clínico es muy polimorfo y varía de acuerdo a la edad de la paciente. Por lo general las manifestaciones clínicas se inician en el período perimenárquico con la aparición de alteraciones menstruales (oligomenorrea, amenorrea secundaria y metrorragia disfuncional por hiperplasia endometrial), manifestaciones de hiperandrogenismo (acné, seborrea, hirsutismo y alopecia androgénica) y obesidad por lo general de tipo androide (Dunaif, 1997). El aumento de la prevalencia de SOP en miembros de la familia de los casos con SOP en comparación a la población general permite plantear la hipótesis que el

SOP tiene un componente genético cuya ausencia es aún motivo de interés.

El diagnóstico del SOP se basa en la combinación de sus características clínicas (anovulación crónica hiperandrogénica), ultrasonográficas (presencia de múltiples imágenes quísticas pequeñas 2-4 mm, asociadas a un incremento del estroma en un ovario de tamaño normal o aumentado) y bioquímicas (aumento moderado de testosterona, androstenediona, e índice de andrógenos libres (IAL)). El diagnóstico del SOP debe ser planteado clínicamente y confirmado bioquímicamente.

Considerando que desde un punto de vista epidemiológico, el diagnóstico de SOP es extremadamente importante; el futuro de este síndrome estará en la identificación de subfenotipos y marcadores genéticos que permitan instaurar medidas preventivas precoces (Sir-Petermann, 2001).

IV.1 SOP Y OBESIDAD

Se ha sugerido que la obesidad, particularmente de fenotipo abdominal, podría ser parcialmente responsable de la resistencia a la insulina e hiperinsulinemia en mujeres con SOP. Además, la obesidad a través de la hiperinsulinemia podría jugar un papel en favorecer el hiperandrogenismo en esas mujeres. Otros factores, como la elevada tasa de producción de estrógenos, el aumento de la actividad del sistema opioide y del eje hipotalámico-pituitario-adrenal, la disminución de la síntesis de la globulinas transportadoras de hormonas sexuales (SHBG) y, posiblemente una alta ingesta de lípidos en la dieta, podrían ser mecanismos adicionales por los cuales la obesidad favorecería el

desarrollo de hiperandrogenismo en el SOP. Existen además evidencias que la pérdida de peso corporal se asocia con efectos beneficiosos a nivel hormonal, en el metabolismo y en las características clínicas (Gambineri A, 2002).

Se ha establecido que las mujeres obesas con SOP además presentarían un perfil hormonal distinto al de las mujeres con SOP de peso normal. Las principales diferencias son hiperinsulinemia y resistencia a la insulina más severas y menores niveles de SHBG al compararlas con mujeres con SOP de peso normal o con mujeres controles normo-peso. Más aún, la presencia de obesidad (principalmente de fenotipo abdominal) en mujeres con SOP, aumentaría la disponibilidad de andrógenos activos y agravaría el hirsutismo y, disminuiría la ciclicidad menstrual y la tasa de fertilidad.

El mecanismo por el cual la obesidad podría agravar un estado de insulino-resistencia sería principalmente el aumento del tejido adiposo, en particular en el depósito de grasa visceral, aumentando la disponibilidad de varios metabolitos (ácidos grasos libres, leptina, $TNF\alpha$, y otros), los cuales son capaces de afectar la secreción y metabolismo de la insulina, como también su acción periférica (Gambineri A.,2002).

Por lo tanto, las mujeres con SOP y obesidad de tipo abdominal tendrían una mayor predisposición a desarrollar enfermedades metabólicas y cardiovasculares, además de un cuadro más crítico respecto a las manifestaciones propias del SOP; en comparación a mujeres con SOP de peso normal.

Además de los efectos anteriormente descritos, la obesidad tiende a amplificar el grado de hiperandrogenismo y de insulino-resistencia (Pasquali R, 1993; Ciaraldi TP, 1997) en el SOP. Estudios previos muestran que mujeres obesas con SOP tienen mayores niveles de testosterona total y testosterona libre respecto a mujeres con SOP no obesas (Holte J, 1994; Kiddy DS, 1990). La obesidad abdominal podría ser un factor adicional que deteriora el estado de hiperandrogenismo en mujeres con SOP (Pasquali R, 1993_a; Pasquali R, 1994). Este no es un descubrimiento inesperado, ya que el aumento de peso corporal y de tejido graso en mujeres está asociado con varias anomalías en el balance de esteroides sexuales. Algunos cambios afectan a los andrógenos y SHBG, su principal proteína transportadora.

Mujeres obesas presentan un aumento en la producción de andrógenos, asociado a una acrecentada tasa metabólica; aunque el balance de esas alteraciones permite el mantenimiento de un nivel normal de andrógeno circulante (Pasquali R, 1993; Pasquali R, 1997). Sin embargo, el porcentaje de la fracción de andrógenos libres tiende a ser mayor en la obesidad, particularmente en la de fenotipo abdominal, debido a la reducción en la concentración de SHBG (Barr VA, 1997). La obesidad abdominal podría ser definida como una condición de un relativo "hiperandrogenismo funcional" (Pasquali R, 1993).

Por otro lado, hiperandrogenismo "per se" podría jugar un rol en favorecer el estado de insulino resistencia y estimulación en el desarrollo de la obesidad de fenotipo abdominal en mujeres con SOP. De hecho, los andrógenos podrían inducir un estado de insulino-resistencia a través de la activación de la cascada lipolítica, llevando a un aumento en la liberación de ácidos grasos libres (FFA), los

cuales al depositarse en el músculo modifican su estructura histológica. Se ha descrito que la estimulación local en el flujo de FFA estaría ocurriendo principalmente en los depósitos de grasa visceral, debido a la alta densidad de los receptores de andrógenos presentes a ese nivel (Björntorp P, 1996).

Podría sugerirse una especie de círculo vicioso entre hiperandrogenismo e hiperinsulinemia para representar las bases biológicas específicas en el desarrollo de mujeres con SOP de fenotipo obeso.

En resumen, una obesidad adicional, aumenta el grado de hiperandrogenismo en mujeres con SOP. Consecuentemente, mujeres obesas con SOP tienden a ser más hiperandrogénicas que su contraparte de peso normal. Mecanismos específicos de acción de la obesidad incluyen hiperinsulinismo severo, concentraciones de SHBG más reducidas y, probablemente, alteraciones en las vías metabólicas del cortisol-cortisona. El rol de la leptina en este contexto está aun bajo debate (Sir-Petermann, 2001). De hecho, la leptina estaría estimulando directamente la actividad 17α - hidroxilasa ovárica (Zamorano PL, 1997). Sin embargo, si un exceso de leptina pudiera jugar un rol en el desarrollo de hiperandrogenismo en mujeres obesas con SOP, deberá ser dilucidado en estudios futuros.

Se ha observado además, que el grupo de mujeres con SOP podría representar un grupo de alto riesgo en el desarrollo temprano de un cuadro de enfermedades cardiovasculares (Lobo RA, 2000).

En 1985 Wild y cols. encontraron que mujeres con SOP tenían niveles más bajos de lipoproteína de alta densidad (HDL), altas relaciones entre LDL/HDL, y

mayores niveles de triglicéridos que las mujeres con regularidad menstrual (Wild S, 1985). Subsecuentemente, Slowinska-Srzednicka y cols. pusieron énfasis en el rol que cumpliría la insulina en las anormalidades observadas en los lípidos en mujeres hiperandrogénicas con SOP (Slowinska-Srzednicka J, 1983). Al comparar mujeres con SOP y un grupo control estratificados por peso, encontraron que las mujeres con SOP tenían niveles significativamente menores de HDL (Airaksinen KE, 1993), niveles mayores de apolipoproteína B, y mayores niveles de triglicéridos. Luego de ajustar los datos por distintas variables y múltiples análisis de regresión, los resultados revelaron que en el grupo de mujeres con SOP, la insulina en ayuno era una variable significativa, que podría explicar los niveles de los triglicéridos totales y apolipoproteína A-1. Esos resultados sugieren, por lo tanto, que la hiperinsulinemia, independiente de obesidad, podría tener un rol en la alteración de los lípidos en el SOP (David S. Guzick, 2001).

La resistencia a la insulina afecta comúnmente el perfil lipídico de las lipoproteínas, por reducción en la concentración del colesterol HDL y alza en la concentración circulante de triglicéridos. En pacientes no obesas con SOP se observa resistencia a la insulina, bajo colesterol HDL y altos niveles de triglicéridos, y la obesidad tiende a agravar precozmente el alterado perfil lipídico, por un efecto aditivo (Azziz R., 1997).

Talbott y cols evaluaron el perfil de riesgo en mujeres con SOP y un grupo control; luego de los ajustes para IMC, uso de hormonas y niveles de insulina; determinaron que las mujeres con SOP tienen niveles sustancialmente mayores de LDL y colesterol total en los grupo menores de 45 años. Después de los 45 años, se encontraron sólo pequeñas diferencias en cuanto a factores de riesgo

entre los grupos (Guzick DS, 2001). Esos resultados fueron confirmados también por Cibula y colaboradores en un estudio de factores de riesgo cardiovascular en mujeres mayores con SOP (Cibula D, 2000).

En la mayoría de los estudios sobre alteraciones del metabolismo lipídico en mujeres con SOP se ha observado mayores concentraciones de triglicéridos y menores concentraciones de HDL en estas mujeres, al igual que cuando las pacientes fueron estratificadas por el peso corporal; lo que sería agravado por una dieta con alto contenido de grasas saturadas y por hábitos sedentarios (Kasperk CH, 1989).

El perfil de apolipoproteínas en mujeres hirsutas refleja el conocido efecto de la resistencia a la insulina en el metabolismo lipídico de las lipoproteínas. Mujeres con SOP tienen mayor predisposición a desarrollar resistencia a la insulina, y ellas son frecuentemente hiperandrogénicas e hiperestrogénicas. Cada uno de esos elevados esteroides sexuales pueden afectar el metabolismo lipídico de las proteínas y los perfiles de las lipoproteínas circulantes; y consecuentemente aumentarían el riesgo de daño cardiovascular.

En el paso hacia la menopausia el aparato folicular del ovario desaparece, pero el estroma ovárico continúa produciendo androgénos; este hecho podría ser de importancia considerable en algunas pacientes. El desbalance normal entre androgénos y estrogénos que ocurre en la transición hacia la menopausia podría ser exagerado en pacientes con SOP. En este contexto se ha podido establecer que el estrógeno causa disminución en la acumulación de LDL. Este es un antioxidante y además previene la inflamación, la deposición de lípidos y la coagulación de componentes de aterogénesis (Azziz, R., 1997). Sin embargo, es

difícil predecir este efecto individual en los pacientes, debido a múltiples factores que podrían tener un rol: inactividad, aumento en la acumulación de grasa abdominal, un aumento en la adiposidad periférica con la edad y una disminución en la insulina circulante, si hubiera un agotamiento de las células beta pancreáticas y un deterioro en la intolerancia a la glucosa (Azziz R., 1997).

La resistencia a la insulina es caracterizada por la alteración en la acción insulínica sobre el metabolismo de la glucosa en el músculo esquelético, tejido adiposo e hígado. Hay también activación anormal de la insulina de antilipólisis, lipoproteína lipasa y lipasa hepática. Las actividades de esos dos mayores sistemas enzimáticos influyen en la circulación y concentración de lipoproteínas lipídicas en forma opuesta. Las respuestas de cada sistema son heterogéneas; factores genéticos y medioambientales son importantes en la acción y desarrollo de ambos sistemas. Muchas mujeres con una significativa resistencia a la insulina, incluyendo aquellas con SOP, tienen mayor presión sanguínea o hipertensión (Kasperk CH, 1989), un mayor porcentaje de LDL pequeñas y densas; y alteraciones de la fibrinólisis. La hiperinsulinemia frecuentemente acompaña a la resistencia insulínica y está asociada con mortalidad por enfermedades coronarias. Un estudio a gran escala está demostrando que bajo colesterol HDL, en consideración con elevados triglicéridos, resulta en una incidencia mucho mayor de este tipo de enfermedades (Azziz R, 1997).

La prevalencia de resistencia a la insulina depende de la edad, etnia, método de estimación, y la manera en la cual ésta es medida. La prevalencia de resistencia a la insulina en la población no diabética es aproximadamente igual a la frecuencia de diabetes no insulino dependiente (mayor a 25% en algunas

poblaciones). Resistencia a la insulina es un acelerador de diabetes y enfermedades coronarias prematuras. Cuando una mujer llega a ser diabética, su ventaja selectiva contra la muerte prematura por enfermedades cardiovasculares desaparece (Azziz R, 1997).

En resumen, podríamos decir que evidencias preliminares sugerirían que las mujeres con SOP podrían tener un riesgo aumentado de sufrir eventos vasculares coronarios, debido a las múltiples alteraciones lipídicas.

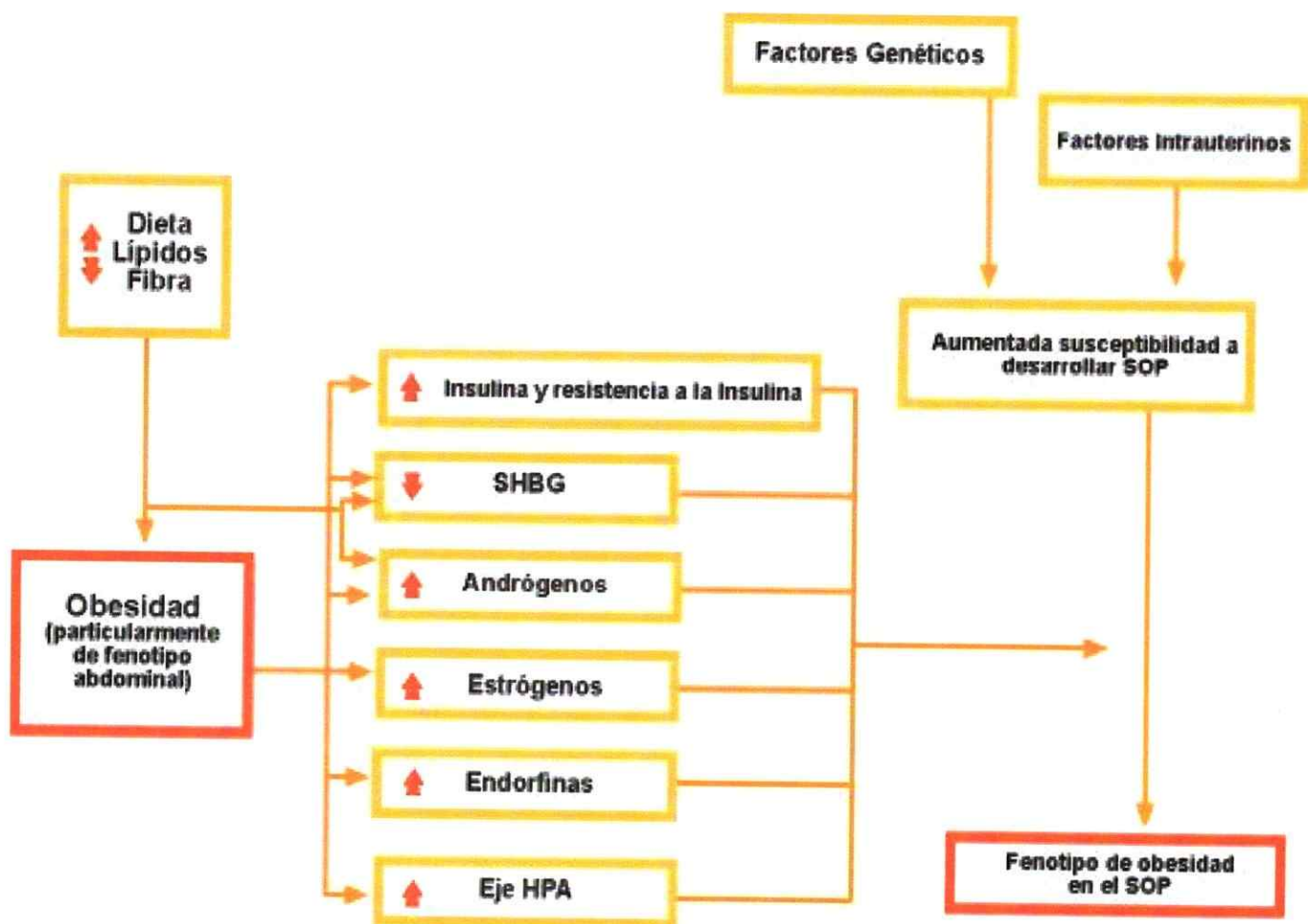
Uno de los eventos centrales y que podría tener relación con gran parte de los desordenes presentes en este síndrome, es la alta prevalencia de insulino resistencia o hiperinsulinemia en mujeres con SOP; los cuales han sido implicados en la patogénesis de algunas formas de hipertensión y dislipidemia.

Existen varias evidencias que establecen que las mujeres con SOP tienen una alta prevalencia de distribución de grasa corporal de tipo abdominal, aunque se trate de mujeres de peso normal (Kirchengast S, 2001). El impacto de la obesidad abdominal en el SOP podría ser mayor de lo que se cree, por lo tanto, este fenotipo ha sido asociado a un hiperandrogenismo y resistencia a la insulina más severos. Se ha demostrado en algunos estudios, que el perfil de andrógenos y los niveles de insulina basal, como también la respuesta de la insulina a una carga de glucosa son significativamente mayores en un grupo con distribución abdominal de grasa que en un grupo con distribución periférica; independiente del IMC (Pasquali R, 1993_a; Pasquali R, 1994).

Se ha demostrado una alta correlación entre concentraciones de ácidos grasos libres y resistencia a la insulina, lo cual supone el concepto de que un aumento en el flujo de FFA desde la grasa abdominal altamente lipolítica hacia el

hígado y los músculos podría representar la conexión más importante entre obesidad abdominal y el estado de insulino-resistencia (Holte J, 1995).

Figura 3: Esquema de la obesidad como determinante de un fenotipo obeso en el SOP



OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la frecuencia de la variante génica Trp64Arg del receptor adrenérgico beta 3 (ADRB-3), en mujeres chilenas normales y portadoras del síndrome de ovario poliquístico .

Objetivos Específicos

1.- Asociar el polimorfismo Trp64Arg con características antropométricas de distribución de grasa como índice de masa corporal (IMC), índice cintura-cadera (ICC), y circunferencia de cintura.

2.- Asociar el polimorfismo Trp64Arg con variables bioquímicas relacionadas con obesidad (perfil lipídico: colesterol total, HDL, triglicéridos).

3.- Relacionar el polimorfismo citado con parámetros de insulino resistencia (ISI, SHBG, HOMA).

HIPOTESIS

El SOP es un trastorno endocrino-metabólico frecuente en mujeres premenopáusicas, el cual se asocia con resistencia a la insulina (RI) y una mayor predisposición a presentar obesidad de tipo abdominal y desarrollar diabetes tipo 2.

Una de las causas de la obesidad podría deberse a alguna anomalía en los receptores adrenérgicos.

Considerando que la variante genética 64 del ADRB-3 es más frecuente en la obesidad de tipo androide, la hipótesis de trabajo es:

“ El patrón de la variante genética 64 del ADRB-3 es más frecuente en mujeres con síndrome de ovario poliquístico, que en mujeres controles”.

METODOLOGIA GENERAL

MATERIALES

TAMAÑO DE LA MUESTRA:

Una muestra superior a 50 personas en cada uno de los grupos descritos sería suficiente para encontrar diferencias significativas entre los dos grupos, con respecto al polimorfismo Trp64Arg, con un nivel de confianza de 95% y una amplitud del intervalo de confianza de 0,25 (Hulley 1988).

Se analizaron 123 muestras de DNA, de mujeres con síndrome de ovario poliquístico y 90 muestras de DNA de mujeres controles, para el cálculo de frecuencias.

En el análisis de las variables antropométricas y bioquímicas se incluyeron 103 mujeres con SOP y 77 mujeres controles.

El universo de pacientes con SOP se obtuvo de mujeres que se encontraban en control en el policlínico de Endocrinología del Hospital San Juan de Dios y en el consultorio de Infertilidad del Hospital San Borja-Arriarán. Las mujeres controles sanas, fueron reclutadas de las mismas áreas geográficas.

REACTIVOS Y ENZIMAS:

Los reactivos y enzimas utilizadas en este trabajo se obtuvieron de los siguientes proveedores:

- **New England Biolabs:** la enzima de restricción BstNI (10.000 U/ml), con su respectivo tampón.
- **Invitrogen:** Taq DNA polimerasa (5U/ μ L) y su respectivo tampón; desoxinucleótidos dATP, dTTP, dCTP, dGTP; marcador de peso molecular 100 bp ladder (1.0 μ g/ μ l); oligonucleótidos utilizados como partidores para la amplificación por PCR; agarosa ultra pura y bromuro de Etidio.
- **Winkler LTDA:** Solución tampón TAE 50X.
- **PROMEGA:** "kit" comercial de extracción de DNA.
- **DPC:** "Kit" de insulina, testosterona, SHBG, 17-OHP y DHEA-SO₄.
- **GIBCO:** Azul de bromofenol

METODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO:

El presente estudio está planteado como un estudio de caso y control, con SOP como variable dependiente y la variante Trp64Arg como variable independiente.

El estudio se encuentra dentro del proyecto FONDECYT 1000973 "Prevalencia y significado clínico de la variante genética Gly 972 Arg del sustrato-1 del receptor de insulina en el síndrome de ovario poliquístico", aprobado por el comité de ética del Hospital San Juan de Dios y del Hospital Clínico San Borja-Arriarán.

SUJETOS Y METODO:

Se estudiaron pacientes de sexo femenino, entre 13 y 38 años, portadoras de SOP, previa información detallada y consentimiento escrito. Las pacientes fueron catalogadas como portadoras de SOP según los criterios internacionalmente descritos :

- ◆ Alteraciones del ciclo menstrual (amenorrea u oligomenorrea) con anovulación crónica (Progesterona día 22 < 4 ng/ml en oligomenorreicas).

- ◆ Signos clínicos de hiperandrogenismo (hirsutismo, acné y/o seborrea).

- ◆ Criterios bioquímicos de hiperandrogenismo: Testosterona > 0.6 ng/ml y/o índice de andrógenos libres (IAL) >5.

$$\text{IAL} = \frac{\text{Testosterona total nmol/l}}{\text{SHBG nmol/l}} \times 100$$

Las mujeres del grupo control correspondieron a mujeres con ciclos menstruales regulares, con un examen físico y ginecológico normal, sin anticonceptivos orales y otros medicamentos que modifiquen la función hormonal (6 meses antes), las mujeres no debieron presentar hirsutismo.

Se excluyeron las mujeres cuyo estado hormonal basal incluido en el proyecto mostró alguna deficiencia como hiperprolactinemia, presencia de tumores secretores de andrógenos, síndrome de cushing`s, bloqueo de la 21-hidroxilasa, de expresión tardía y enfermedades tiroideas determinadas por exámenes específicos.

En ambos grupos de mujeres se evaluó tolerancia a la glucosa, RI y secreción de insulina.

ETAPAS DEL ESTUDIO

CARACTERIZACION DE LAS PACIENTES:

Las pacientes y las mujeres del grupo control que cumplieron con los criterios de inclusión fueron entrevistadas. Durante la entrevista se les informó con respecto a la naturaleza del estudio. En aquellas que desearon ingresar en forma voluntaria al estudio, se les efectuó una anamnesis dirigida, examen físico general y ginecológico; se llenó una ficha especialmente diseñada y se les dio información para firmar el consentimiento informado correspondiente al Proyecto Fondecyt 1000973.

PROTOCOLO DE ESTUDIO:

El estudio se llevó a cabo en forma ambulatoria, las mujeres de ambos grupos se presentaron en ayunas para realizar la Prueba de Tolerancia a la Glucosa Oral (PTGO). Un universo de 123 pacientes portadoras de SOP y 90 mujeres controles fueron reclutadas.

MEDICIONES ANTROPOMETRICAS

◆ INDICE DE MASA CORPORAL:

El IMC es un índice para la relación peso-tamaño, que es comúnmente utilizado para clasificar el sobrepeso y obesidad en adultos. Este se calcula como el peso (kilogramos) dividido por el tamaño al cuadrado (metros), (Kg/m²).

La clasificación del sobrepeso y obesidad, de acuerdo al IMC es mostrado en la siguiente tabla. La obesidad está clasificada como un IMC=30. Esta clasificación corresponde a la recomendación de la OMS como criterio de obesidad (WHO Physical status, 1995), y está basada, principalmente, en la asociación entre IMC y mortalidad (WHO, 1997).

Clasificación	IMC (Kg/m ²)	Riesgo de enfermedades asociadas
Bajo peso	< 18.5	Bajo (pero el riesgo de otras enfermedades aumenta)
Normopeso	18.5 - 24.9	Promedio
Sobrepeso	>25	
Pre-obeso	25 – 29.9	Aumentado
Obeso clase I	30 – 34.9	Moderado
Obeso clase II	35 – 39.9	Severo
Obeso clase III	>40	Muy severo

Un IMC de 30 o más puede ser débilmente aceptado para denotar la clasificación de obesidad en algunas poblaciones, de manera que algunos estudios usan alternativamente el punto de corte de IMC como sobre y bajo 27. En EE.UU. , la obesidad es principalmente clasificada en base a la distribución del IMC en el National Health and Nutrition Examination Survey (HANNES), que utiliza como punto de corte un IMC sobre o bajo 27. Las diferencias en el punto de corte

tienen un gran impacto en estimar la prevalencia de obesidad en las distintas poblaciones.

◆ **INDICE CINTURA-CADERA:**

El ICC corresponde al diámetro de cintura mínimo dividido por el diámetro de cadera máximo. Permite una estimación del tipo de obesidad. En la mujer, ginoide < 0.85 y androide ≥ 0.85 .

MEDICIONES BIOQUIMICAS

◆ **PRUEBA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA ORAL (PTGO):**

Esta prueba se realizó en la mañana, posterior a un ayuno de 10 horas. Después de tomar una muestra de sangre de 5 ml en ayunas (basal), se le dio a ingerir en un plazo de 5 minutos una solución de 75grs. de glucosa disuelta en 250-300 ml de agua fría; posteriormente, se tomaron muestras de 5 ml de sangre a los 30, 60 y 120 minutos postcarga de glucosa. En cada muestra se determinó glucosa por el método de glucosa oxidasa e insulina por RIA. En la muestra basal se midió además: SHBG por (RIA).

◆ **CRITERIOS PARA DIABETES 2 E INTOLERANCIA A LA GLUCOSA:**

Se utilizaron los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS 1999).

INTOLERANCIA A LA GLUCOSA:

Glicemia en ayunas > 110 mg/dl y/o glicemia a las 2 h post-carga > 140 mg/dl < 200 mg/dl.

DIABETES :

Glicemia en ayunas > 126 mg/dl (valor confirmado) y/o glicemia a las 2 h post-carga de glucosa \geq 200 mg/dl.

◆ EL ESTUDIO DE INSULINO RESISTENCIA SE REALIZO MEDIANTE:

- a) ***Cuociente glicemia/insulinemia*** en ayunas < de 4.5 (Legro 1998), insulinemia a las 2 hrs post-carga de glucosa > 60 uU/ml.
- b) ***Concentración sérica de SHBG*** entre 10 a 30 nmol/l (Sir-Petermann 1997).
- c) ***Modelo de valoración homeostática*** (HOMA_{IR}): es un método para la valoración de la resistencia insulínica, determinado en la condición homeostática del ayuno, que se ha aplicado principalmente a estudios poblacionales; además, posee una buena correlación con el "clamp" euglicémico-hiperinsulinémico, teniendo un costo y una complejidad menor, lo que favorece su aplicación en estudios de prevalencia. Para su determinación se utiliza la concentración de insulina basal y la glicemia basal a través de la siguiente fórmula (Matthews 1985):

HOMA_{IR} : Insulina en ayunas (μ U/ml) x Glicemia en ayunas (mmol/l)

d) **Indice de sensibilidad a la insulina (ISI)**: corresponde a un método desarrollado por Matsuda y DeFronzo en 1999, el cual permite evaluar sensibilidad a la insulina desde datos obtenidos por un test de tolerancia a la glucosa oral, su importancia radica en que con este test es posible utilizar todos los puntos de la curva de la glucosa e insulina, lo que no considera el método $HOMA_{IR}$. Este test ha sido rigurosamente evaluado por comparación con mediciones directas de insulino sensibilidad obtenidas con la técnica de "clamp" euglicémico-hiperinsulinémico.

10000

ISI:

$$\frac{10000}{\sqrt{(FPG \times FPI) \times (\text{media [glucosa PTGO]} \times [\text{insulina PTGO}])}}$$

FPG: glucosa plasmática en ayunas (mg/dl)

FPI: insulina plasmática en ayunas (μ U/ml).

DETERMINACIONES HORMONALES

1. RIA de SHBG: KIT comercial (DPC, Los Angeles CA, USA) El coeficiente de variación intra e interensayo para nuestro laboratorio corresponde a 3.8 y 7.9 % respectivamente.
2. RIA Insulina: KIT comercial (DPC, Los Angeles CA, USA) EL coeficiente de variación intra e interensayo para nuestro laboratorio corresponde a 5 y 8 % respectivamente.
3. RIA Testosterona, DHEA-SO₄ y 17-OHP: KIT comercial (DPC, Los Angeles CA, USA) EL coeficiente de variación intra e interensayo para nuestro laboratorio corresponde a 7 y 11 % para testosterona, 6.6 y 4.9 % para DHEA-SO₄ y; 7.1 y 7.3 % para 17-OHP; respectivamente.

ANALISIS ESTADISTICO

Se estimó la frecuencia genotípica de la mutación en cada grupo de estudio. Para establecer diferencias, se utilizó la prueba de Chi-cuadrado o test exacto de Fisher. Además se realizó una estratificación de la mutación, de acuerdo al IMC de ambos grupos de mujeres, con análisis de Odds Ratio mediante el test de Breslow-Day. La descripción referente a los datos de exámenes clínicos y bioquímicos que siguieron una distribución normal se expresaron como promedio \pm desviación estándar, y se usó el test de análisis de la varianza con un nivel de significación de $\alpha= 0.05$.

Para las variables cuya distribución en la población no fue normal, la comparación entre grupos se efectuó mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Con el fin de analizar la asociación entre los factores categóricos estudiados, se construyeron tablas de contingencia cuya verosimilitud bajo la hipótesis de no-asociación será evaluada mediante la prueba de Chi- cuadrado.

Se realizó el test de equilibrio exacto de Hardy-Weinberg (implementado en STATA 7.0), con el fin de establecer si la frecuencia genotípica de los individuos analizados en el estudio se encontraban en equilibrio según el parámetro aplicado.

Grupo de mujeres controles:

Genotipo	Observado	Esperado
Trp/Trp	57	60.02
Trp/Arg	33	26.95
Arg/Arg	0	3.02
Total	90	90.00

Alelo	Observado	Frecuencia	Error estándar
Trp	147	0.8167	0.0254
Arg	33	0.1833	0.0254
Total	180	1.0000	

Coficiente estimado de desequilibrio (D)= -0.0336

P=0.0359

Grupo de mujeres con SOP:

Genotipo	Observado	Esperado
Trp/Trp	74	77.29
Trp/Arg	47	40.43
Arg/Arg	2	5.29
Total	123	123.00

Alelo	Observado	Frecuencia	Error estándar
Trp	195	0.7927	0.0237
Arg	51	0.2073	0.0237
Total	246	1.0000	

Coficiente estimado de desequilibrio (D)= -0.0267

P=0.0992

Los resultados del test de equilibrio de Hardy-Weinberg sugieren que los grupos incluidos en el estudio (tanto Sop como control) no estarían en equilibrio; lo que podría explicarse por fluctuaciones debidas al error aleatorio de muestreo.

METODOLOGIA MOLECULAR

I. OBTENCION DE DNA GENOMICO

El DNA genómico de las 213 muestras fue obtenido a partir de linfocitos de sangre periférica. Este DNA había sido previamente extraído en otros trabajos experimentales desarrollados por el laboratorio y que se enmarcan dentro del proyecto Fondecyt en curso. El DNA se mantuvo suspendido en una solución tampón (TE pH 8) y almacenado a 4°C.

II. AMPLIFICACION DE DNA POR LA TECNICA DE PCR

II. 1 OLIGONUCLEOTIDOS

Se utilizó un par de oligonucleótidos descritos en la literatura para amplificar un "loci" polimórfico del receptor beta 3 adrenérgico, el cual comprende la mutación Trp64Arg.

Los partidores utilizados en nuestro estudio se detallan a continuación.

ADRB1: CGC CCA ATA CCG CCA ACA C (5' a 3')

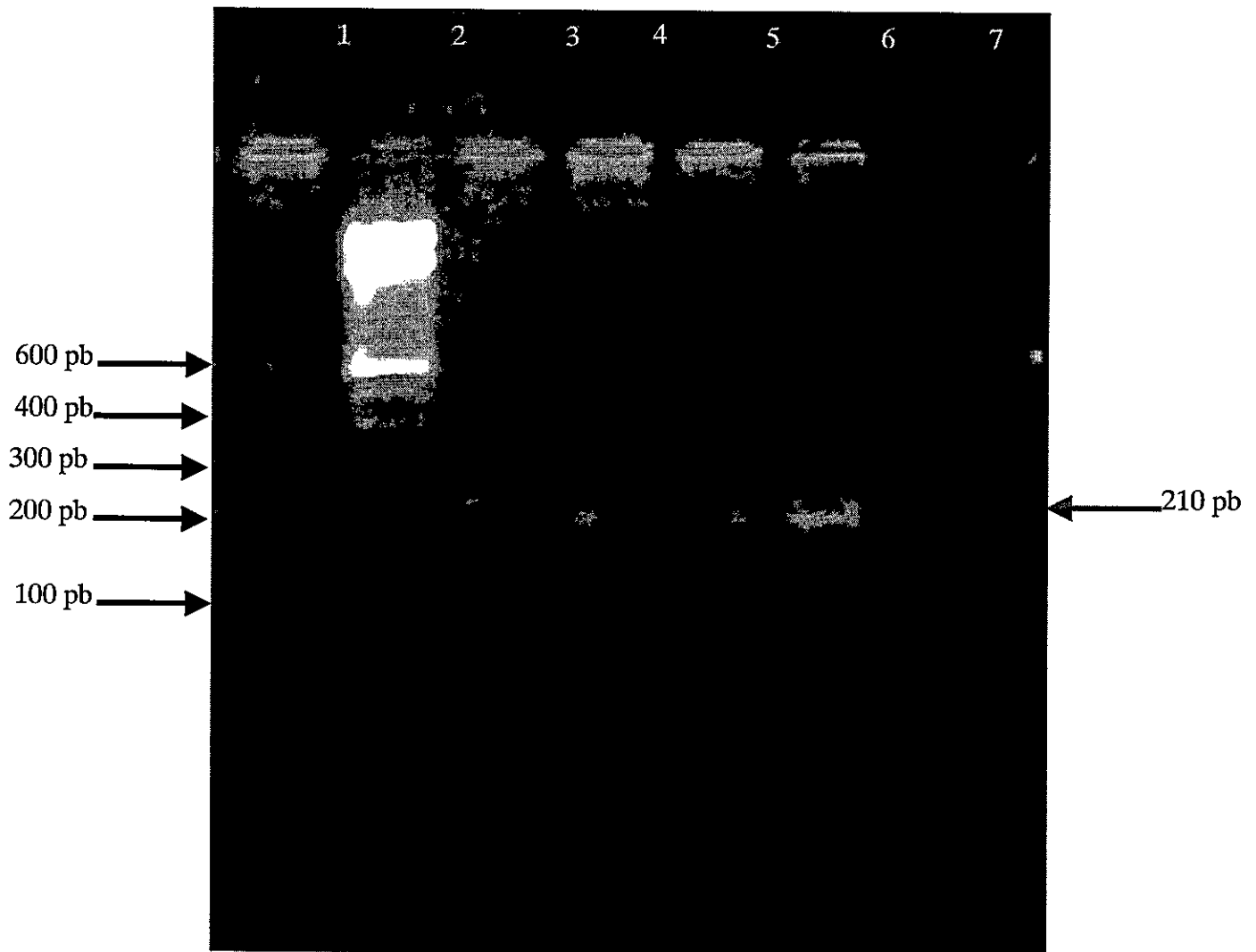
ADRB2: CCA CCA GGA GTC CCA TCA CC (5' a 3')

II. 2 REACCION DE AMPLIFICACION

Para amplificar la región polimórfica en estudio del receptor beta 3 adrenérgico se utilizó 150 a 300 ng de DNA total, aproximadamente; 1 unidad de Taq DNA polimerasa con su tampón específico; 0,5 μ M de cada partidor; 3 mM de MgCl₂, 200 μ M de mezcla de deoxinucleótidos y componentes tampón adicionales, en un volumen final de 30 μ l de reacción.

El programa de PCR (termociclador Biometra) consistió en una denaturación inicial a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de: 30 seg a 94°C (denaturación), 30 seg a 66°C (alineamiento) y 30 seg a 72°C (extensión). Finalmente, 10 minutos de extensión final a 72°C. Para confirmar los productos de la reacción de amplificación se tomaron 8 μ l de producto de PCR, lo cual se tiñó con 2 μ l de azul de bromofenol y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio (4ml/100 ml agarosa). Posteriormente, se observó la emisión de fluorescencia en un transiluminador de luz ultravioleta. Se utilizó un marcador de peso molecular 100 bp para reconocer el amplificado de 210 pares de bases (que comprende desde la base 259 a la 468).

Figura 4: Análisis del producto de PCR ADRB-3



La figura 4 muestra un gel de agarosa al 2%. El carril 2 corresponde a un marcador de peso molecular (100 pb). Los carriles 3 al 7 muestran la banda característica de 210 pb para el amplificado, producto del PCR, del receptor beta 3.

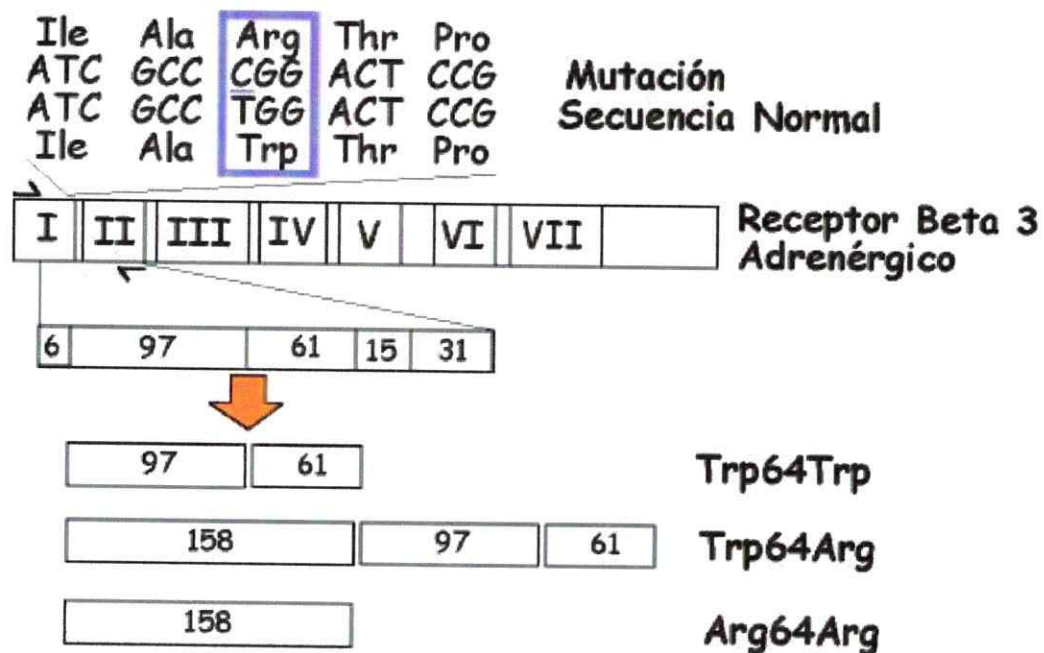
III. DIGESTION CON ENZIMA DE RESTRICCIÓN

Luego de la reacción de amplificación que comprende el sector de la variante Trp64Arg, el producto resultante fue digerido con la endonucleasa de restricción BstNI (el partidador más cercano al sitio de corte tiene un cambio nucleotídico que completa la secuencia reconocida por esta enzima CC[↓](A/T)GG).

La digestión, se realizó en un tubo de 0,2 ml que contenía: 22 µl del producto de PCR, 0.6 unidades de la enzima de restricción BstNI, el tampón correspondiente, y agua esterilizada a un volumen final de corte de 26,3 µl. El tubo de corte se incubó a 60°C por 18 horas. Los fragmentos obtenidos se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 4% con bromuro de etidio (4ml/100 ml agarosa). Para la resolución de los distintos fragmentos de corte, la electroforesis se realizó a un voltaje constante de 80 volts, hasta que el marcador de peso molecular (100 bp) recorriera aproximadamente $\frac{3}{4}$ partes de la cámara, finalmente se observó el patrón de bandeo de cada muestra en un transiluminador de luz ultravioleta.

Con análisis de este tipo como es RFLP (restriction fragment length polimorfism) se determinó la presencia o ausencia de los sitios de restricción y permitió caracterizar el alelo mutado definiendo el polimorfismo de los fragmentos de restricción según su tamaño, dependiendo del patrón de migración en geles de agarosa.

Figura 5: Diagrama de la mutación ADRB-3 64 y su patrón de corte

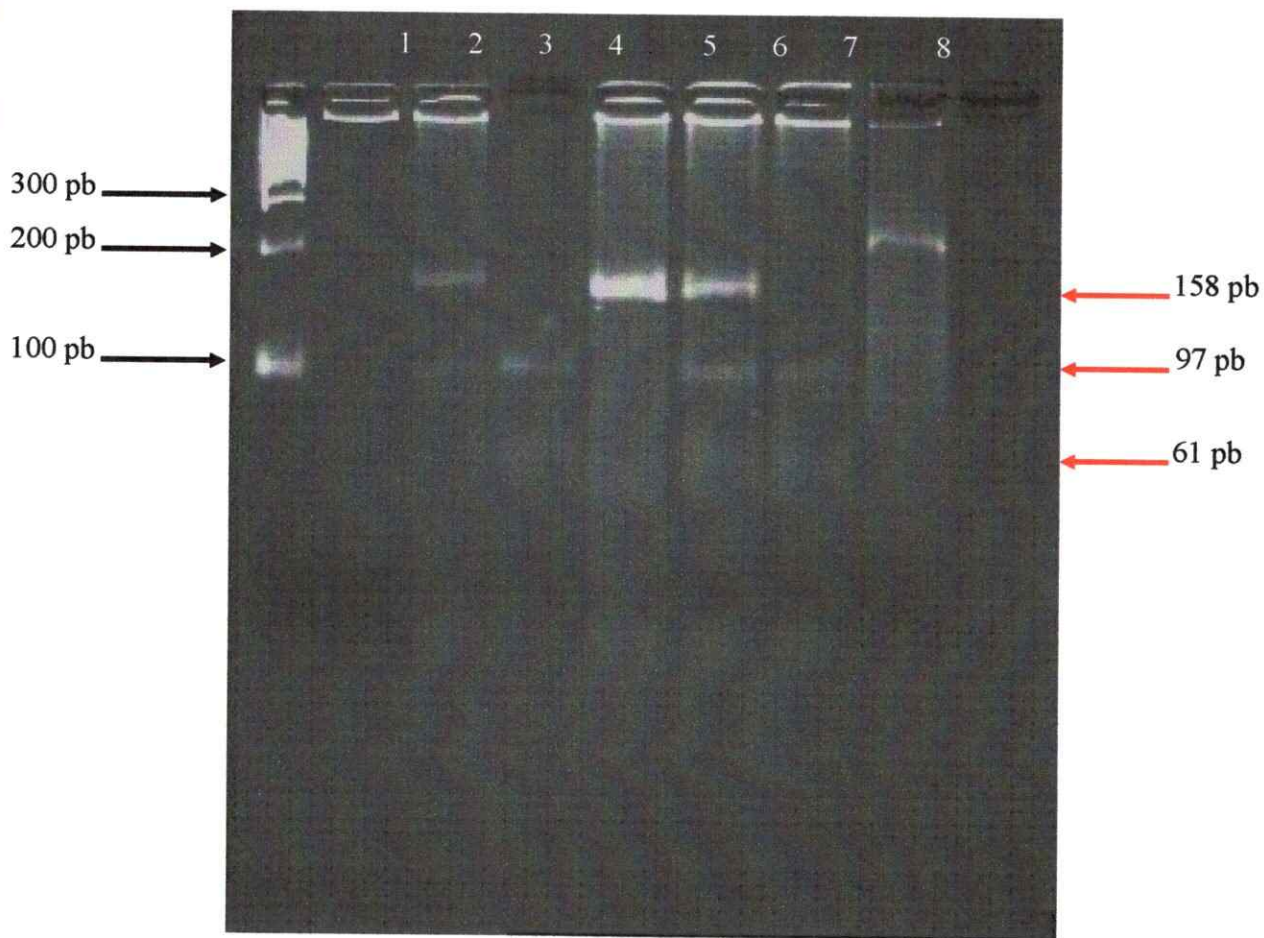


En la figura 5 se muestra el receptor beta 3 adrenérgico con sus siete dominios de transmembrana. Se observa la región del polimorfismo Trp64Arg y el patrón de bandeo según el genotipo.

IV. ANALISIS DEL POLIMORFISMO TRP64ARG DEL GEN ADRB-3

Luego de amplificar esta región por la técnica de PCR y digerir el producto amplificado con la enzima de restricción BstNI, según las condiciones descritas en el punto III, los fragmentos obtenidos para el corte de restricción tienen los siguientes tamaños de bandas fácilmente observables: 97 y 61 pb para el Trp64Trp; 158, 97 y 61 pb para el Trp64Arg y 158 pb para el homocigoto Arg64Arg. Además, cada uno de los polimorfismos presenta bandas de 31, 15 y 6 pb, fragmentos que logran poca resolución y no se observan fácilmente, pero que no son relevantes para el análisis del mutante.

Figura 6: Análisis del polimorfismo Trp64Arg del gen ADRB-3 por digestión con BstNI



La figura 6 corresponde a un gel de agarosa al 4%. El carril 1 muestra un marcador de peso molecular de 100 pb. Los carriles 3 y 6 muestran las bandas obtenidas para los portadores heterocigotos (Trp/Arg). Los carriles 4 y 7 corresponden a individuos homocigotos (Trp/Trp) normales. El carril 5, presenta una banda única, característica de los homocigotos (Arg/Arg) para la variante génica. El carril 8 tiene el amplificado de 210 pb.

RESULTADOS

Tabla 1.- Características clínicas de mujeres cíclicas controles y portadoras de SOP.

Grupo	Edad (años)	IMC (Kg/m ²)	Diametro Cintura (cm)	ICC
Controles (n=90)	25.2±6.3	25.8±3.9	82.2±11.4	0.83±0.06
SOP (n=123)	22.7±5.8	29.3±6.1	89.5±14.1	0.85±0.07

p=0.003

p=0.0001

p=0.0001

p=0.03

Los valores se expresan como promedio ± DE. p< 0.05.

La tabla 1 muestra las características clínicas del grupo de pacientes con SOP y mujeres controles. Como se desprende de la tabla, el grupo de mujeres con SOP presentaron un IMC mayor al del grupo control (p=0.0001). Respecto a la distribución por edad, el grupo de mujeres con SOP fue comparativamente menor. El ICC y el diámetro cintura en el grupo de mujeres con SOP fue significativamente mayor (p=0.03 y 0.0001, respectivamente) a lo observado en el grupo control. Dicha diferencia se debería, principalmente, a que las mujeres portadoras de este síndrome, en su mayoría, presentaron una distribución de grasa corporal de tipo androide.

Tabla 2.- Características endocrinológicas de mujeres portadoras de SOP

Testosterona (ng/ml)	SHBG (nmol/L)	IAL	DHEA-SO4 (µg/dl)	17-OH- progesterona (ng/ml)	Volumen Ovárico (cm³)
0.84±0.46	27.8±18.3	14.2±11.5	250.5±22.5	1.8±0.4	11.6±9.6

VN <0.6

>30

<5.0

<305

0.4 – 4.5

<6.0

Los valores se expresan como promedio ± DE. p< 0.05.

La tabla 2 resume los datos relacionados a las características endocrinológicas del grupo SOP, bajo ella se detallan los valores promedios normales (VN). Los valores obtenidos para el IAL y el volumen ovárico fueron comparables a lo descrito en la literatura en mujeres portadoras de SOP. Los valores de 17-OH progesterona y DHEA-SO4 fueron normales lo que permitió descartar otros trastornos endocrinológicos, principalmente de naturaleza adrenal.

Tabla 3.- Distribución porcentual de mujeres controles y portadoras de SOP de acuerdo a su IMC.

Variables	Controles (n=77)		SOP (n=103)		P
	%	n	%	n	
Normopeso	45.4	35	30.1	31	0.051
Sobrepeso	41.6	32	28.2	29	0.086
Obesidad	13.0	10	41.7	43	0.0001
Intolerancia a la glucosa	2.6	2	7.8	8	0.240
Diabetes tipo 2	0.0	0	1.9	2	-

En la tabla 3 se muestra la distribución de ambos grupos de acuerdo con el IMC y tolerancia a la glucosa. El sobrepeso (IMC=25.0-29.9 kg/m²) fue más frecuente de observar en el grupo control (41.6%) comparado con el grupo SOP (28.2%). Mientras que la obesidad (IMC ≥ 30 kg/m²), se presentó en mayor porcentaje en el grupo SOP (41,7%) que en el grupo control (13,0%), (p=0.0001); diferencia que alcanzó significancia estadística. Cabe destacar que la intolerancia a la glucosa y la diabetes tipo 2 se observaron con mayor frecuencia en las mujeres con SOP que en el grupo control, lo que concuerda con lo descrito en la literatura.

Tabla 4.- Frecuencia genotípica de la variante Trp64Arg.

Genotipo mutación 64	SOP(n=123)		Controles (n=90)		p-value Test exacto Fisher
	n	frec.	n	frec.	
Trp/Trp	74	0.60	57	0.63	0.590
Trp/Arg	47	0.38	33	0.37	
Arg/Arg	2	0.02	0	0	

La tabla 4 resume la información relacionada a la distribución de los genotipos de la variante Arg 64, de acuerdo a la característica de portador o no portador. Como se desprende de la tabla, en el grupo SOP la condición heterocigota (Trp/Arg) se encuentra con la misma frecuencia que en el grupo de mujeres controles.

Cabe destacar que sólo en el grupo de mujeres SOP se encontraron dos homocigotas Arg/Arg, con una frecuencia de 0.02

Tabla 5.- Características antropométricas de mujeres con SOP y grupo control, según la mutación.

Variables	Controles		SOP		
	Trp/Trp (n=57)	Trp/Arg (n=33)	Trp/Trp (n=74)	Trp/Arg (n=47)	Arg/Arg (n=2)
Edad (años)	25.5±6.5	24.8±6.0	22.0±5.9	23.8±5.5	22.5
IMC (Kg/m ²)	25.7±4.3	25.9±3.2	28.7±6.0	30.0±6.4	31.3
ICC	0.83±0.06	0.82±0.06	0.85±0.07	0.85±0.08	0.90
Diámetro Cintura (cm)	82.1±11.8	82.4±10.7	89.1±13.7	90.0±15.2	95.0

Los valores se expresan como promedio ± DE. p< 0.05.

En la tabla 5 se resumen las características antropométricas de ambos grupos, de acuerdo a la presencia del alelo mutado. Observamos que en el grupo control el alelo arginina no tendría relación con el IMC. En el grupo SOP, las mujeres portadoras de la mutación tienen un IMC promedio mayor que las mujeres que no portan la variante alélica, aunque esta diferencia no alcanzó significancia estadística.

Se podría inferir además, que la mutación no tendría un efecto directamente significativo en el ICC o en el diámetro de cintura; ya que en ambos grupos (SOP y control), portadoras y no portadoras de la mutación tienen valores comparables.

Cabe destacar que las dos mujeres homocigotas (Arg/Arg) que se encontraron en el grupo de mujeres con SOP; presentaron un ICC significativamente más elevado (0.91 y 0.89, respectivamente) que el ICC promedio de las mujeres con SOP (0.85); también presentaron IMC y diámetro de cintura aumentados.

Tabla 6.- Características bioquímicas de mujeres con SOP y grupo control, según la mutación.

Variables	Controles		SOP		
	Trp/Trp (n=52)	Trp/Arg (n=25)	Trp/Trp (n=62)	Trp/Arg (n=39)	Arg/Arg (n=2)
Insulina Basal (μ UI/ml)	12.0 \pm 7.9	10.2 \pm 5.0	19.2 \pm 12.9	22.3 \pm 17.1	28.4
Glicemia Basal (mg/dl)	79.0 \pm 13.4	80.2 \pm 10.1	88.1 \pm 13.9	86.0 \pm 14.5	94.5
HOMA _{IR}	2.4 \pm 1.8	2.1 \pm 1.1	4.4 \pm 3.7	4.9 \pm 4.1	6.67
ISI	7.3 \pm 5.6	8.5 \pm 5.7	3.9 \pm 3.3	4.0 \pm 2.8	1.81

Los valores se expresan como promedio \pm DE. $p < 0.05$.

Si analizamos la tabla 6, podemos observar que aparentemente la mutación no tendría relación directa con las características bioquímicas analizadas, tanto en el grupo control como en el grupo de mujeres con SOP.

En el grupo SOP las mujeres portadoras de la mutación presentan una leve alza de la insulina basal y del valor de HOMA, pero estos valores no alcanzaron significancia estadística. Las mediciones de glicemia en ayuna e ISI no presentaron diferencias comparativas.

En el grupo control no se aprecian diferencias en las características bioquímicas analizadas al comparar a las mujeres portadoras o no de la mutación.

Podemos mencionar que las dos portadoras homocigotas tuvieron valores de HOMA (5.2 y 8.1) comparativamente superiores al HOMA promedio del grupo con SOP, y valores de ISI (2.3 y 1.3) notablemente disminuídos. Sólo una de ellas presentó características de intolerancia a la glucosa, según los parámetros aplicados en el estudio.

Tabla 7.- Perfil lipídico de mujeres con SOP y controles , según la mutación

Variables	Controles		SOP		
	Trp/Trp (n=52)	Trp/Arg (n=25)	Trp/Trp (n=62)	Trp/Arg (n=39)	Arg/Arg (n=2)
Colesterol Total (mg/dl)	177.1±34.9	179.7±40.4	180.0±44.3	179.6±53.3	222.0
HDL (mg/dl)	41.7±10.6	44.2±13.0	33.4±15.3	33.1±12.3	38.0
Triglicéridos (mg/dl)	124.3±50.2	102.6±61.4	117.3±59.3	170.1±90.8^a	134.5

Los valores se expresan como promedio \pm DE. $p < 0.05$. (a) $p < 0.0001$ entre SOP Trp/Trp y SOP Trp/Arg

La tabla 7 muestra el perfil lipídico de ambos grupos de mujeres. Podemos apreciar que en el grupo de mujeres controles no hay diferencias significativas en los parámetros analizados al comparar portadoras y no portadoras del alelo arginina. Solo se observa una disminución en la concentración de triglicéridos en las mujeres controles portadoras del alelo mutado, valor que no alcanzó significancia estadística.

En el grupo de mujeres con SOP, las portadoras heterocigotas del alelo arginina presentaron un nivel de triglicéridos significativamente mayor ($p < 0.0001$) al de las mujeres sin este alelo. En cuanto a los valores de colesterol total y HDL no se observaron diferencias.

Las 2 mujeres homocigotas del grupo SOP presentaron elevados niveles de colesterol total; cuyos valores son superiores a las mujeres con SOP heterocigotas y normales; sin embargo tuvieron menor contenido de triglicéridos que el promedio de las mujeres con SOP heterocigotas.

Tabla 8.- Perfil lipídico y parámetros de RI en mujeres controles, según índice de HANNES

Variables	Trp/Trp		Trp/Arg	
	IMC < 27	IMC ≥ 27	IMC < 27	IMC ≥ 27
	n=35	n=17	n=16	n=9
HDL (mg/dl)	43.4±10.8	37.6±9.2	45.2±15.4	42.3±6.6
Triglicéridos (mg/dl)	113.2±41.1	149.5±60.7 ^a	98.4±69.9	111.0±42.6
Insulina Basal (μUI/ml)	10.3±7.7	15.5±7.1 ^b	9.1±5.4	12.0±3.8
HOMA _{IR}	2.0±1.6	3.2±1.9 ^b	1.9±1.2	1.9±1.2
ISI	8.6±6.1	4.4±2.3 ^c	9.9±6.2	5.6±3.2

Los valores se expresan como promedio ± DE. p< 0.05. Comparaciones IMC<27 v/s IMC ≥ 27 de mujeres no portadoras de la mutación. (a) p=0.014; (b) p=0.02; (c) p=0.009.

La tabla 8 muestra que al separar el grupo de mujeres controles según el índice de HANNES en normopeso (IMC≤27) y sobrepeso (IMC≥27), y la presencia o ausencia del alelo arginina 64; podemos observar que la presencia de este alelo no confiere diferencias estadísticamente significativas en cuanto a las concentraciones de colesterol HDL, insulina en ayunas, HOMA e ISI.

Si analizamos el contenido de triglicéridos, podemos apreciar que las mujeres portadoras del alelo arginina presentan valores disminuídos en la concentración de triglicéridos, al compararlos con mujeres no portadoras para un mismo grupo de obesidad; sin embargo estas diferencias no alcanzaron significancia estadística.

Para el grupo de mujeres controles normales (Trp64Trp) se observa que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de obesidad,

en cuanto a los niveles de triglicéridos, insulina basal, HOMA e ISI; probablemente por efecto del peso corporal.

Al comparar entre grupos de obesidad para mujeres portadoras del alelo Arg 64 podemos notar que las mujeres de $IMC \geq 27$ presentan menor valor de ISI y mayor contenido de triglicéridos e insulina basal, aunque no alcanzaron significancia estadística.

Tabla 9.- Perfil lipídico y parámetros de RI en mujeres con SOP, según índice de HANNES

Variables	Trp/Trp		Trp/Arg		Arg/Arg
	IMC < 27	IMC \geq 27	IMC < 27	IMC \geq 27	IMC \geq 27
	n=26	n=36	n=17	n=22	n=2
HDL (mg/dl)	36,3 \pm 16,7	31,4 \pm 14,2	37,3 \pm 17,1	31,6 \pm 8,0	38,0
Triglicéridos (mg/dl)	92,0 \pm 34,1	135,9 \pm 67,1 _a	115,3 \pm 30,7 ^c	192,4 \pm 95,4 _b ^d	134,5
Insulina Basal (μ UI/ml)	12,4 \pm 6,4	24,1 \pm 14,2 _a	12,03 \pm 6,20	30,0 \pm 18,0 _b	28,4
HOMA _{IR}	2,6 \pm 1,4	5,6 \pm 4,2 _a	2,5 \pm 1,4	6,8 \pm 4,4 _b	6,7
ISI	5,5 \pm 4,1	2,8 \pm 2,0 _a	6,4 \pm 2,5	2,2 \pm 1,2 _b	1,8

Los valores se expresan como promedio \pm DE. $p < 0.05$.

(a) $p < 0.03$, entre $IMC < 27$ v/s $IMC \geq 27$ de mujeres no portadoras del alelo mutado. (b) $p < 0.001$, entre $IMC < 27$ v/s $IMC \geq 27$ de mujeres portadoras del alelo mutado. (c) $p = 0.025$, entre portadoras y no portadoras del alelo Arg con $IMC < 27$. (d) $p = 0.004$, entre portadoras y no portadoras del alelo Arg con $IMC \geq 27$.

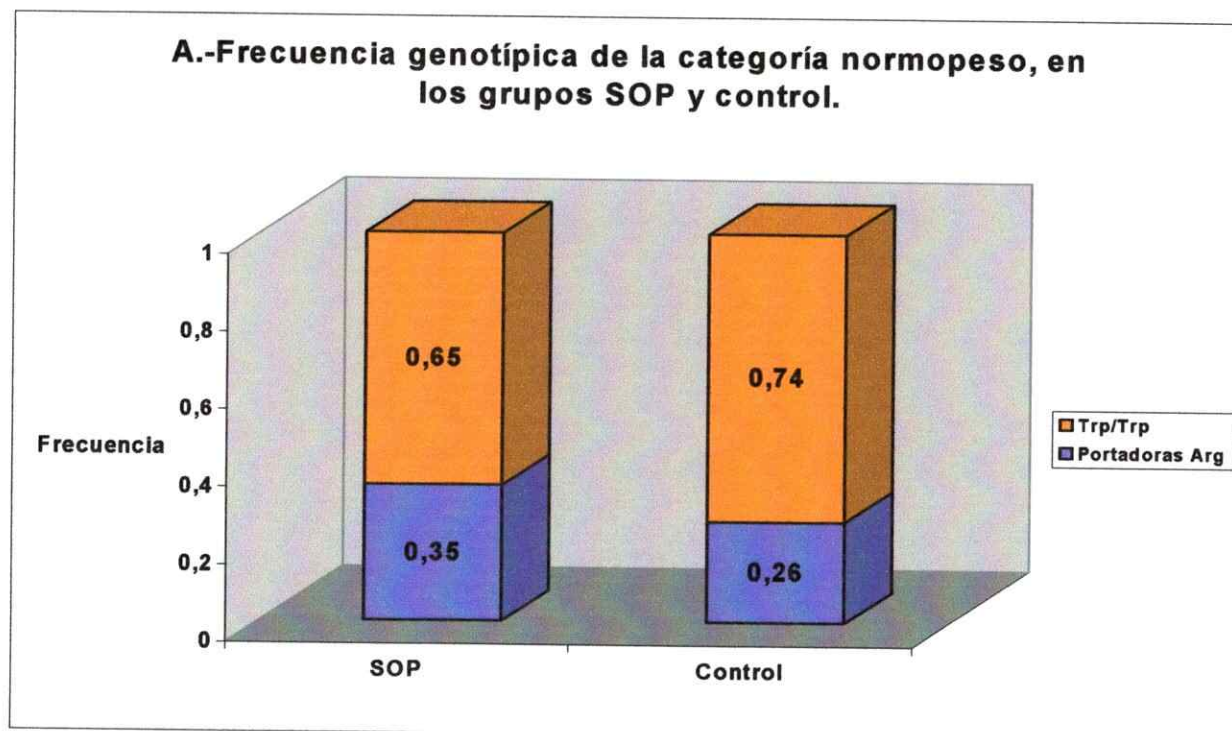
La tabla 9 muestra que al separar a las mujeres con SOP según el índice de HANNES, la presencia del alelo Arg 64 no otorga diferencias estadísticamente significativas en cuanto al contenido de colesterol HDL, insulina basal, HOMA e ISI. Sin embargo, si comparamos el grupo de sobrepeso ($IMC \geq 27$) entre portadoras y no portadoras del alelo arginina, podemos notar que a pesar de que no tienen diferencias comparables estadísticamente, las mujeres portadoras heterocigotas presentaron valores de insulina basal y HOMA aumentados y un menor valor de ISI.

A diferencia de lo que se observó en el grupo de mujeres controles, en las mujeres con SOP la presencia del alelo Arg 64 podría estar asociado a un mayor contenido de triglicéridos, independiente del grado de obesidad; alcanzando una diferencia estadísticamente significativa.

Si comparamos entre los grupos de obesidad, tanto en las mujeres normales como en las portadoras heterocigotas, podemos apreciar diferencias estadísticamente significativas para los valores de triglicéridos, insulina basal, HOMA e ISI; debido probablemente a un efecto del peso corporal.

Las 2 mujeres homocigotas para el alelo Arg 64 presentaron valores de HDL e insulina basal dentro del promedio para mujeres con $IMC \geq 27$. Una de ellas presentó un elevado valor de HOMA (8.1) y un bajo valor de ISI (1.3). Los triglicéridos de estas mujeres estuvieron bajo el promedio de las portadoras heterocigotas con SOP.

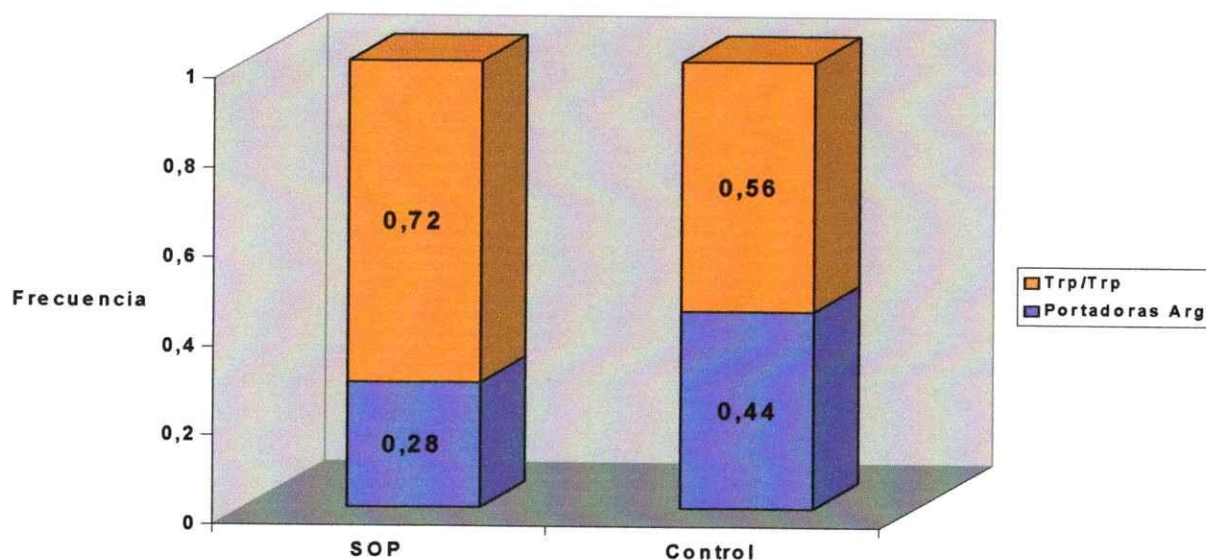
Figura 7: Frecuencia genotípica según categoría de IMC, en los grupos SOP y control



Genotipo	SOP (n=31)		Control (n=35)		Odds ratio
	f	n	f	n	
Portadoras Arg	0.35	11	0.26	9	1.59
Trp/Trp	0.65	20	0.74	26	

Si observamos la frecuencia genotípica en los grupos SOP y control con normopeso (Fig.7.-A), podemos apreciar que la frecuencia de mujeres portadoras del alelo arginina es similar entre ambos grupos; aunque levemente superior en el caso de mujeres con SOP.

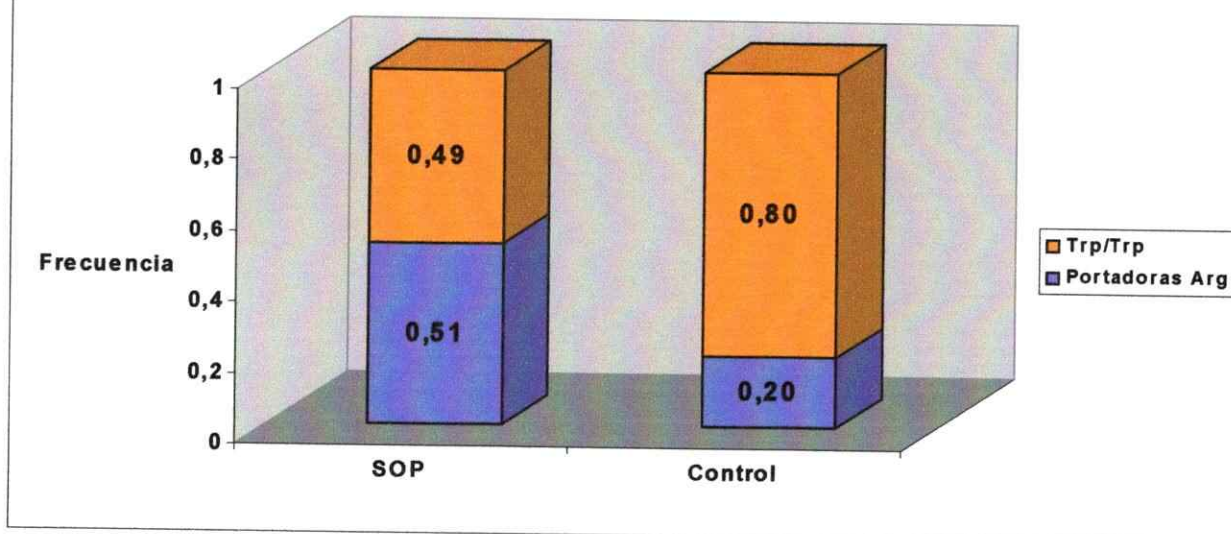
B.-Frecuencia genotípica de la categoría sobrepeso, en los grupos SOP y control.



Genotipo	SOP (n=29)		Control (n=32)		Odds ratio
	f	n	f	n	
Portadoras Arg	0.28	8	0.44	14	0.49
Trp/Trp	0.72	21	0.56	18	

Al analizar las frecuencias genotípicas en el grupo con sobrepeso, podemos apreciar que las portadoras del alelo arginina se encuentran con mayor frecuencia en el grupo de mujeres controles.

C.-Frecuencia genotípica de la categoría obesas, en los grupos SOP y control.



Genotipo	SOP (n=43)		Control (n=10)		Odds ratio
	f	n	f	n	
Portadoras Arg	0.51	22	0.2	2	4.19
Trp/Trp	0.49	21	0.8	8	

Si comparamos entre los grupos SOP y control de mujeres obesas, se observa que la frecuencia de portadoras del alelo arginina es estadísticamente mayor en el grupo de mujeres con SOP que en el grupo control. Esto podría dar cuenta de algún tipo de interacción o sinergismo entre obesidad y síndrome de ovario poliquístico, lo que se confirma con el análisis de Odds ratio (4,19) que podría sugerir que la presencia del alelo arginina potencia la probabilidad de ser

obeso o la desregulación del peso corporal (principalmente en mujeres obesas) en las mujeres con SOP.

Podemos apreciar que en las mujeres con SOP la mayor frecuencia del alelo mutado se encuentra en mujeres obesas. En el grupo de mujeres controles éste se distribuye principalmente en mujeres normopeso y sobrepeso.

DISCUSION

El polimorfismo Trp64Arg del receptor beta 3 adrenérgico ha sido estudiado en un gran número de poblaciones, y varía ampliamente alrededor del mundo; los nauruanos sería la única población en la cual esta mutación no ha sido descrita (Silver K, 1996).

El presente estudio es el primero que evalúa la frecuencia del alelo mutado Trp64Arg del gen del receptor ADRB-3 en población chilena, comparando un grupo de mujeres control y con SOP; y asociándolo a variables bioquímicas y antropométricas.

La similitud en la frecuencia genotípica de la mutación Trp64Arg en ambos grupos, mujeres con SOP (0,38) y mujeres controles (0.37), podría sugerir que el gen ADRB-3 no sería un determinante mayor de obesidad en el síndrome de ovario poliquístico en el grupo de mujeres chilenas estudiadas.

A partir de los datos anteriores, se podría inferir una frecuencia genotípica de la condición heterocigotade Trp64Arg en la población de mujeres chilenas cercana a 0.37; valor que es muy similar a la frecuencia descrita para poblaciones

de esquimales de Alaska, de 0.38 (Biery AJ,1997) y superior al descrito para la mayoría de las poblaciones evaluadas.

Algunas investigaciones han encontrado que el porcentaje de mujeres portadoras del alelo arginina 64 no cambia en los diferentes grupos de obesidad (12.0; 13.1 y 10.0%; en normopeso, sobrepeso y obesos; respectivamente) para una población española (Corella D, 2001). A diferencia de lo que se ha encontrado en estudios sobre la población española (Corella D, 2001), nuestros resultados indican que las mujeres portadoras del alelo arginina 64 se distribuyen de manera diferente de acuerdo al grupo de obesidad, y que además difieren en su comportamiento entre el grupo control y el de mujeres con SOP.

Observamos que en las mujeres con SOP, la mutación se encuentra mayoritariamente (51%) en el grupo de obesas, mientras que en el grupo control sólo el 20% de las portadoras presentan obesidad.

En hombres españoles, se ha observado que portadores de la variante arginina 64 tienen mayor IMC y colesterol total en comparación con individuos no portadores; lo que no se observó en mujeres. Estos antecedentes podrían explicar algunas semejanzas entre nuestros resultados obtenidos para las mujeres con SOP y un grupo de hombres españoles; ya que las mujeres con SOP al tener un acentuado hiperandrogenismo y otras características que podrían ser similares a un perfil masculino, su comportamiento asociado a la mutación debiera considerar estos antecedentes.

Se debe tener presente que los resultados de este tipo de estudios muestran una asociación género-específica entre la mutación ADRB3 y el fenotipo

relacionado con obesidad. Sin embargo, no se pudo descartar otro tipo de interacción del tipo epistática (gen-gen) o gen-ambiente.

En resumen, respecto de la distribución de frecuencias, nuestro estudio se asemeja a los valores obtenidos para frecuencia en esquimales de Alaska. Además, no difiere la frecuencia genotípica entre mujeres con SOP y controles. Se demostró que la variante heterocigota (Trp64Arg) del receptor ADRB3 está presente con una frecuencia de 0.38 en una muestra de mujeres con SOP y de 0.37 en mujeres controles. Se encontraron sólo 2 homocigotas Arg/Arg; ambas mujeres pertenecientes al grupo de mujeres con SOP y obesas, lo que representa una frecuencia de 0.02.

Al separar las mujeres con SOP en portadoras o no portadoras del alelo Arg64, se observó que el IMC promedio de las mujeres con SOP sin este alelo fue característico de mujeres con sobrepeso; mientras que las mujeres con SOP que portan la variante génica están en el límite de la obesidad ($IMC \geq 30$). A pesar de que esa diferencia entre los IMC no es estadísticamente significativa, se podría pensar que el alelo arginina 64 tiende a aumentar el grado de obesidad en mujeres con SOP.

Nuestros datos sobre el análisis de la variante Trp64Arg concuerdan con lo descrito para población japonesa, en la cual la mutación otorga a los individuos homocigotos un valor de IMC mayor que el IMC de los heterocigotos o normales; los datos sugieren que esta variante no sólo contribuye a la ganancia de peso (Fujisawa T, 1996). Podemos mencionar que tal como reportan esos resultados; las dos mujeres homocigotas (Arg/Arg) encontradas en nuestro estudio, presentaron

un IMC promedio superior al del grupo con SOP; lo que las caracteriza claramente como mujeres obesas, además tienen valores de ICC que las clasifica como mujeres con distribución de grasa de tipo androide.

Algunos resultados sugieren que la asociación de alelo arginina 64 con peso corporal podría ser altamente dependiente del género, edad, exposición a otros factores ambientales y presencia de genes susceptibles, entre los cuales se ha sugerido LPL (Strazzullo P, 2001; Hsueh W, 2001).

Aún no existe consenso entre el efecto de la variante ADRB3 en el peso corporal. Aunque estudios preliminares muestran una asociación entre el alelo arginina 64 y fenotipos relacionados a obesidad en indios Pima, Japoneses y finlandeses (Widén E, 1995; Kadowaki H, 1995; Walston J, 1995).

En mujeres australianas postmenopáusicas, una asociación estadísticamente significativa entre el alelo arginina 64 y mayor IMC fue encontrada (Kurabayashi T, 1996); esto podría explicar algunos resultados controversiales obtenidos en mujeres, según el rango de edades estudiadas y el ambiente esteroideal.

Otros estudios han evaluado la relación entre la mutación y obesidad mórbida, y han descrito que la frecuencia del alelo Arg 64 no difiere significativamente en pacientes con obesidad mórbida y un grupo control; tampoco presentaron asociación con IMC, colesterol, triglicéridos, glucosa o insulina; aunque este receptor no cumpliría un rol como marcador de obesidad mórbida, podría tener relación con un desarrollo temprano de este tipo de obesidad (Oksanen L, 1996).

En base a lo anteriormente planteado, el alelo arginina 64 no representaría una causa genética primaria en la obesidad, pero podría actuar exacerbando la obesidad en individuos susceptibles (Clément K, 1995)., como sería el grupo de mujeres con SOP, que presentan un ambiente esteroideal diferente al de las mujeres normales.

En conclusión, la presencia del alelo arginina 64 en el gen del receptor beta 3 adrenérgico podría predisponer a los pacientes con SOP a la obesidad abdominal, la cual podría además predisponer a insulino-resistencia, dislipidemia y eventualmente, a un desarrollo temprano de diabetes tipo 2. La determinación de los mecanismos moleculares por los cuales este cambio aminoacídico en el receptor beta 3 ejerce su acción podría proveer importantes avances en las bases genéticas de la obesidad abdominal e insulino-resistencia; y el uso de agonistas beta 3 como estrategia terapéutica.

Al analizar nuestros resultados, estratificando por peso (según HANNES), podemos observar que al aislar el efecto del IMC, la mutación no confiere mayores diferencias en el grupo de mujeres controles según sean o no portadoras de la mutación; sólo se observa que en mujeres portadoras del alelo mutado con $IMC \geq 27$, hay tendencia a menores niveles de triglicéridos, HOMA e insulina basal.

Al hacer el mismo análisis aislando el efecto del peso en las mujeres con SOP, pudimos observar que el aumento de triglicéridos en las portadoras de la mutación fue un patrón de comportamiento independiente del grado de obesidad. Los valores de insulina en ayuna y de HOMA se encontraron levemente aumentados en las portadoras de la mutación con $IMC \geq 27$. los valores de HDL

aparentemente no estarían relacionados en forma directa con la presencia de la variante arginina 64.

Dado que los hombres tienden a tener mayor masa grasa intraabdominal y menor masa grasa periférica que las mujeres, se ha sugerido que la expresión fenotípica del ADRB3 podría ser mayor en hombres (Arner P, 1999). Aparte de los efectos en el peso corporal, se ha encontrado evidencia que supone que la variante genética Trp64Arg estaría relacionada en la modulación del perfil lipídico en poblaciones mediterráneas, con el alelo arginina 64 asociado con mayor contenido de colesterol total y triglicéridos en hombres.

Otros estudios experimentales muestran diferencias sexuales en la lipólisis de grasa visceral siendo la sensibilidad lipolítica ADRB-3 12 veces mayor en hombres en comparación con mujeres (Lonnqvist F, 1997). Esta diferencia en la lipólisis podría explicar, en parte, los resultados obtenidos respecto al perfil lipídico en mujeres con SOP, ya que su obesidad de tipo androide y su alterado perfil hormonal (hiperandrogenismo) podrían sugerir un comportamiento metabólico similar a un hombre.

En un estudio de mujeres jóvenes danesas se observó que las mujeres homocigotas para la mutación tenían niveles significativamente mayores de triglicéridos y colesterol LDL, y que esto se asociaba con obesidad (Urhammer SA, 1996). Nuestros resultados mostraron que las dos mujeres homocigotas para la mutación Trp64Arg se encontraron en el grupo de mujeres obesas (IMC sobre 30) y presentaron una distribución de grasa asociado a fenotipos de obesidad abdominal. Aunque ambas tenían elevados valores de HOMA y bajos valores de

ISI; sólo una de ellas presento intolerancia a la glucosa y elevados niveles de triglicéridos al momento del estudio.

Resultados conflictivos han sido publicados en relación a los efectos en la concentración de lípidos y la variante Trp64Arg. Aunque un estudio en jóvenes daneses sanos (Urhammer SA, 1996) encontró un aumento en triglicéridos y LDL en homocigotos para arginina 64, y un estudio en chinos (Thomas GN, 2000) informó de la disminución en HDL en los portadores del alelo Arg64; otros autores no encontraron asociaciones (Widén E, 1995; Proenza AM, 2000; Ukkola O, 2000; Moriarty M, 1997).

En resumen, el perfil lipídico de las mujeres con SOP, permite que nuestros resultados sean comparables a los obtenidos por Corella (1995) en su estudio en población mediterránea española, respecto a una asociación del alelo arginina 64 con una mayor concentración de triglicéridos.

Nuestros resultados apoyan el concepto de una interacción de la mutación con esteroides sexuales en la expresión fenotípica; particularmente relacionada al metabolismo de los lípidos (principalmente triglicéridos), lo que en un ambiente hiperandrogénico condiciona una alteración del perfil lipídico.

CONCLUSIONES

Finalmente, podríamos decir que la presencia del alelo arginina 64 estaría asociado en las mujeres con SOP a un aumento significativo en la concentración de triglicéridos en el plasma; alcanzando incluso valores superiores a los rangos normales, en las mujeres con mayor grado de obesidad.

Se podría esperar algún tipo de interacción entre la presencia del alelo arginina 64 en el gen ADRB-3 y una acentuada desregulación del peso corporal; aumentando el grado de obesidad en mujeres con SOP, principalmente en las de IMC sobre 30. Se observó además una tendencia al aumento de IMC, insulina basal y HOMA en mujeres con SOP portadoras del alelo mutado. Esta caracterización podría acentuar las condiciones propias de este síndrome y podría así, constituir un posible factor de riesgo que debiera ser considerado respecto a la edad y su asociación con el ambiente esteroideal.

Más estudios deberán ser considerados en mujeres con SOP para evaluar el efecto de la mutación en mujeres de distintas edades, y asociarlas con riesgos relativos de enfermedades o ciertas características fenotípicas.

REFERENCIAS

- Albala C, Vio F, Uauy R. Nutrition transition in Chile: determinants and consequences 2002; 5(1A): 123-8.
- Arch JRS, and AJ Kaumann 1993 β_3 and atypical B-adrenoceptors. Med. Res. Rev. 13:663-729.
- Arner P & Hoffstedt J. Adrenoceptor genes in human obesity. Journal of Internal Medicine 1999; 245: 667-672.
- Arner P. Catecholamine-Induced lipolysis in obesity. Int. J Obes Relat Metab Disord 1999; 23:10S-13-S.
- Arner P. Hunting for human obesity genes? Look in the adipose tissue! International Journal of Obesity 2000; 24(4):S57-S62).
- Austin MA. Small dense low-density lipoprotein as a risk factor for coronary heart disease. Clin Lab Res 1994, 24: 187-192.
- Azziz R, Nestler JE, Dewailly D. Androgen excess disorders in women, 1997.
- Barr VA, Malide D, Zarnowski MJ, Taylor S, Cushman SW. Insulin stimulates both leptin secretion and production by rat white adipose tissue. Endocrinology 1997; 138: 4463-4472.
- Biery AJ, Ebbesson SOE, Boyer BB. The β_3 -adrenergic receptorTRP64ARG polymorphism and obesity in Alaskan Eskimos Int J Obes Relat Metab Disord 1997; 21: 1176-9.
- Björntorp P. The regulation of adipose tissue distribution in humans. Int J Obes Relat Metab Disord 1996; 20:291-302.
- Borkman M, Storlien LH, Pan DA, Jenkins AB, Chisholm DJ, Campbell LV. The relationship between insulin sensitivity and the fatty-acid composition of skeletal-muscle phospholipids. N Engl J Med 1993; 328: 238-44.

- Carmina E, Lobo RA. Polycystic ovary syndrome (PCOS): Arguably the most common endocrinopathy is associated with significant morbidity in women. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 1897 - 1899.
- Chang RJ, Nakamura RM, Judd HL et al. Insulin resistance in nonobese patients with polycystic ovarian disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1983, 57: 356-359.
- Ciaraldi TP, Morales AJ, Hickman MG, Odom-Ford R, Olefsky JM, Yen SSC. Cellular insulin resistance in adipocytes from obese polycystic ovary syndrome subjects involves adenosine modulation of insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 1421-1425.
- Cibula D, Cifkova R, Fanta M et al. Increased risk of non-insulin dependent diabetes mellitus, arterial hypertension and coronary artery disease in perimenopausal women with a history of the polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2000, 15: 785-789.
- Clément K, Boutin P, Froguel P. Genetics of obesity. *Am J Pharmacogenomics* 2002; 2(3): 177-87.
- Clément K, Ruiz J, Cassard-Doulcier A-M, Bouillaud F, Riicquier D, Basderant A, et al. Additive effect of Agr;G(-3826) variant of the uncoupling protein gene and the Trp64Arg mutation of the β_3 -adrenergic receptor gene or weight gain in morbid obesity. *Int J Obesity* 1996; 20: 1062-6.
- Clément K, Vaisse C, Manning BSJ, Basdevant A, Guy-Grand B, Ruis J, Silver KD, Shuldiner AR, Froguel P, and Strosberg AD: Genetic variation in the β_3 -adrenergic receptor and an increased capacity to gain weight in patients with morbid obesity. *N Engl J Med* 1995; 333: 352-354.
- Colberg SR, Simoneau JA, Thaete FL, Kelley DE. Skeletal muscle utilization of free fatty acids in women with visceral obesity. *J Clin Invest* 1995;95:1846-53.
- Collins S, Daniel KW, Rohlf EM, Ramkuman V, Taylor H, Gettys TW. Impaired expression and functional activity of the β_3 - and B1-adrenergic receptors in adipose tissue of congenitally obese (C557BL/6J ob/ob) mice. *Mol Endocrinol* 1994; 8: 518-27.
- Connacher AA, Bennet WM, Jung RT. Clinical studies with the B-adrenoreceptor agonist BRL 26830 A *Am J Clin Nutr* 1992;55:Supl258S-261S

- Corella D, Guillén M, Portolés O, Sorlí JV, Alonso V, Folch J & Sáiz C. Gender specific association of the Trp64Arg mutation in the β_3 -adrenergic receptor gene with obesity-related phenotypes in a Mediterranean population: interaction with a common lipoprotein lipase gene variation. *Journal of Internal Medicine* 2001; 250: 348-360.
- Dahlgren E, Johansson S, Lindstedt G, Knutsson F. Women with polycystic ovary syndrome wedge resected in 1956-1965: a long-term follow-up focusing on natural history and circulating hormones. *Fertil Steril* 1992; 57: 505-513.
- 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.
- Ehrmann DA, Sturis J, Byrne MM, Karrison T, Rosenfield RL, Polonsky. Insulin secretory defects in polycystic ovary syndrome. Relationship to insulin sensitivity and family history of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1995; 96: 520 - 527.
- Emorine Lj, Marullo S, Briend-Sutren M-M et al. Molecular characterization of the human β_3 - adrenergic receptor. *Science* 1989; 245: 1118-21.
- Emorine LJ, N Blin, and AD Strosberg. The human β_3 -adrenoceptor: the search for a physiological function. *Trends Pharmacol. Sci* 1994 ; 15: 3-7.
- Fujisawa, T, Ikegami H, Kawaguchi Y, and Ogihara T. Meta-analysis of the association of Trp64Arg polymorphism of β_3 -adrenergic receptor gene with body mass index. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998;83: 2441-44.
- Fumeron F, Durack-Brown I, Betoulle D, Cassard-Doulicier A-M, Tuzet S, Bouillaud F et al. Polymorphisms of uncoupling protein (UCP) and β_3 adrenoreceptor genes in obese people submitted to a low caloric diet. *Int J Obesity* 1996; 20: 1051-4.
- Gagnon J, Mauriège P, Roy S et al. The Trp64Arg mutation of the beta3 adrenergic receptor gene has no effect on obesity phenotypes in the Québec Family Study and Swedish obese subjects cohorts. *J Clin Invest* 1996; 98 (9): 2086-93.
- Gambineri A, Pelusi C, Vicennati V, Pagotto U and Pasquali R. Obesity and the polycystic ovary syndrome. *International Journal of Obesity* 2002;26: 883-896

- Giacobino JP. Beta3-adrenoceptor:an update. *Eur J Endocrinol* 1995; 132: 377-85.
- Guzick DS. *Obstetrics and gynecology clinics of north America* 2001, 28 (1).
- Hamann A, Flier JS, Lowell BB. Decreased Brown Fat Markedly Enhances Susceptibility to Diet-induced Obesity, Diabetes, and Hyperlipidemia. *Endocrinology* 1996; 137: 21-29.
- Himms-Hagen J, Cui J, Danforth E Jr et al. Effect of CL-316,243, a thermogenic β_3 -agonist, on energy balance and brown and white adipose tissues in rats. *Am J Physiol* 1994;266:R1371-R1382.
- Hirsch Jules. The search for new ways to treat obesity. *PNAS* 2002; 99(14): 9096-7.
- Hoffstedt, JM Shimizu, S Sjöstedt and F. Lönnqvist. 1995. Determination of β_3 -adrenoceptor mediated lipolysis in human fat dells. *Obes. Res.* 3:447-457.
- Hokanson JE. DNA polymorphisms at the lipoprotein lipase gene and their association with quantitative variation in plasma high-density lipoproteins and triacylglycerides. *Hum Biol* 1994; 66: 383-97.
- Hokanson JE. Functional variants in the lipoprotein lipase gene and risk of cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 1999; 10: 393-9.
- Holte J, Bergh T, Gennarelli G, Wilde L. The independent effects of polycystic ovary syndrome and obesity on serum concentrations of gonadotrophins and sex steroids in premenopausal women. *Clin Endocrinol* 1994; 41: 473-481.
- Holte J, Berghh T, Berne C, Wide L, Lithell H. Restored insulin sensitivity but persistently increased early insulin secretion after weight loss in obese women with polycystic ovary syndrome.. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:2586-2593.
- Hsueh W, Cole SA, Shuldiner AR et al. Interactions between variants in the β_3 -adrenergic receptor and peroxisome proliferator-activated receptor- γ 3 genes and obesity. *Diabetes Care* 2001; 24: 672-7.
- Hulley S, Cummings S. *Designing Clinical Research and Epidemiologic approach* 1998, 220: 75-86.
- Humpphries SE, Nicaud V, Margalef J, Tiret L, Talmud PJ. Lipoprotein lipase gene variation is associated with a paternal history of premature coronary artery disease and

- fasting and postprandial plasma triglycerides: The European Atherosclerosis Research Study (EARS). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 526-34.
- Janssen JA, Koper JW, Stolk RP et al. Lack of association between serum leptin, a polymorphism in the gene for the β_3 -adrenergic receptor and glucose tolerance in the Dutch population. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998; 49: 229-34.
 - Jemaa R, Tuzot S, Portos C, Betoulle D, Apfelbaum M, Fumeron F. Lipoprotein lipase gene polymorphisms: associations with hypertriglyceridemia and body mass index in obese people. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995; 199: 270-4.
 - Kadowaki H, Yasuda K, Iwamoto K et al. A mutation in the β_3 -adrenergic receptor gene is associated with obesity and hyperinsulinemia in Japanese subjects. *Biochem Biophys Res Comm* 1995; 215: 555-60.
 - Kain J, Uauy R, Vio F, Albala C. Trends in overweight and obesity prevalence in Chilean children: comparison of three definitions. *Eur J Clin Nutr* 2002; 56(3): 200-4.
 - Kawamura T, Egusa G, Okubo M, Imazu M, Yamakido M. Association of beta3-adrenergic receptor gene polymorphism with insulin resistance in Japanese-American men. *Metabolism* 1999; 48: 1367-70.
 - Kiddy DS, Sharp PS, White DM, Scanlon MF, Mason HDE, Bray CS, Polson DW, Reed MJ, Franks S. Differences in clinical and endocrine features between obese and non-obese subjects with polycystic ovary syndrome: an analysis of 263 consecutive cases. *Clin Endocrinol* 1990; 32: 213-220.
 - Kirchengast S, Huber J. Body composition characteristics and body fat distribution in lean women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2001; 16:1255-1260.
 - Knochenhauer ES, Key TJ, Kahsar-Miller M, Waggoner W, Boots LR, Azziz R. Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the southeastern United States: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 3078 - 3082.
 - Krief S, Lönnqvist S, Raimbault B, Baude A, Van Sproonsen P, Arner AD, Strosberg D, Ricquier and LJ Emorine. Tissue distribution of β_3 -adrenergic receptor mRNA in man. *J. Clin. Invest* 1993 ; 91: 344-349.

- Kuczmarski RJ et al. Increasing prevalence of overweight among US adult. The National Health and Nutrition Examination Surveys, 1960 to 1991. *Journal of the American Medical Association* 1994, 272: 205-211.
- Kurabayashi T, Carey DGP, Morrison NA. The beta3-adrenergic receptor gene Trp64 Arg mutation is overrepresented in obese women. Effects on weight, BMI, abdominal fat, blood pressure and reproductive history in an elderly Australian population. *Diabetes* 1996; 45: 1358-63.
- Lafontan M, Langin D. Régulation neuro-humorale de la lipolyse: aspects physiologiques et physiopathologiques. *Médecine sciences* 1998;14:865-876..
- Lafontan M, and M Berlan. 1993. Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J. Lipid Res.* 34;10577-1091.
- Legro RS, Finegood D and Dunaif A. A fasting glucose to insuline ratio is a useful measure of insuline sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1998, 83:2694-2698.
- Legro RS, Kunselman AR, Dodson WC, Dunaif A. Prevalence and predictors of risk for Type II diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 165 – 169.
- Lemieux S et al. Sex differences in the relation of visceral adipose tissue accumulation to total body fatness. *American Journal of Clinical Nutrition* 1993, 58: 463-467.
- Lobo RA, Carmina E. The importance of diagnosing the polycystic ovary syndrome. *Ann Intern Med* 2000, 132: 989-993.
- Lonnqvist F, Thorne A, Large V, Arner P. Sex differences in visceral fat lipolysis and metabolic complications of obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1472-80.
- Lönqvist F, Thörne A, NilzellK, Hoffsstedt J, Arner P. A pathogenetic role of visceral fat β_3 -adrenoreceptors in obesity. *J Clin Invest* 1995; 95:1109-16.
- Lönqvist J, Krief S, Strosberg AD, Nyberg B, Emorine LJ, Arner P. Evidence for a functional β_3 -adrenoceptor in man. *Br J. Pharmacol* 1993;110:929-936

- Lowe WL, Rotimi CN, Luke A, Guo X, Zhu X, Comuzzie AG, Schuuuh TS, Hallbach S, Kotlar, TJ and Cooper RS. The β_3 -adrenergic receptor gene and obesity in a population sample of African Americans. *International Journal of Obesity* 2001;25: 54-60.
- Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, Furuyama N, Kondo H et al. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nature Medicine* 2002; 8(7): 731-737.
- Matthews DR, Hoskre JP, Rudenski AS, Naylor BA. Homeostasis model assessment: insuline resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration ons in man. *Diabetologia* 1985, 28(7): 412-419.
- Matsuda M, Defronzo R. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing. *Diabetes Care* 1999, 22(9): 1462-1470.
- Mead JR, Cryer A, Ramji DP. Lipoprotein lipase, a key role in artherosclerosis? *FEBS Lett* 2000; 462: 1-6.
- Mitchell BD, Cole SA, Comuzzie AG, et al. A quantitative trait locus influencing BMI maps to the region of the β_3 -adrenergic receptor. *Diabetes* 1999;48::1863-7.
- Mitchell TH, Ellis RD, Smith SA, Robb G, Cawthorne MA. Effects of BRL 35135, a B-adrenoreceptor agonist with novel selectivity on glucose tolerance and insulin sensitivity in obese subjects. *Int J Obes* 1989;13:757-66.
- Mohamed-Ali V, Flower L, Sethi J, Hotamisligil G, Gray Rosaire, Humphries SE, York DA, and Pinkney J. B-Adrenergic Regulation of IL-6 Release from Adipose Tissue:: In Vivo and in Vitro Studies *The J of Clin Endocrinology & Metab* 2001;86(12):5864-5869.
- Morales AJ, Laughlin GA, Bützow T, Maheshwari H, Baumann G, Yen SSC. Insulin, somatotropic, and luteinizing hormone axes in lean and obese women with polycystic ovary syndrome:common and distinct features. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81: 2854-2864.
- Moriarty M, Wing RR, Kuller LH, Ferrel RE. Trp64Arg substitution in the β_3 -adrenergic receptor does not relate to body weight in healthy, premenopausal women. *Int J Obes* 1997; 21: 829.
- Muzzin P, Revelli J-P, Kuhne F, et al. An adipose tissue-specific B-adrenergic receptor

- molecular cloning and down-regulation in obesity. *J Biol Chem* 1991;266:2453-8.
- Oksanen L, Mustajoki P, Kaprio Jm Kainulainen K, Jänne O, Peltonen L, and Kontula K. Polymorphism of the β_3 -adrenergic receptor gene in morbid obesity. *International Journal of Obesity* 1996; 20: 1055-61.
 - Pasquali R, Casimirri F, Cantobelli S, Labate Morselli AM, Venturoli S, Paradisi R, Zannarini L. Insulin and androgen relationships with abdominal body fat distribution in women with and without hyperandrogenism. *Horm Res* 1993;39: 179-187.
 - Pasquali R, Casimirri F, The impact of obesity on hyperandrogenism and polycystic ovary syndrome in premenopausal women. *Clin Endocrinol* 1993;3999: 1-16.
 - Pasquali R, Casimirri F, Venturoli S, Labate Morselli AM, Reho S, Pezzoli A, Paradisi R.. Body fat distribution has weight-independent effects on clinical, hormonal and metabolic features of women with polycystic ovary syndrome. *Metabolism* 1994; 43:706-713.
 - Pasquali R, The endocrine impact of obesity in eumenorrheic women. In: Azziz R, Nestler JE, Dewailly D (eds). *Androgen excess disorders in women*. Lippincott-Raven: Philadelphia, PA:1997:455-461.
 - Poorretsky L, Cataldo NA, Rosenwaks Z, Giudice LC. The insulin related ovarian regulatory system in health and disease. *Endocr Rev* 1999; 20: 535-582
 - Proenza AM, Poissonnet CM, Ozata M et al. Association of sets of alleles of genes encoding β_3 -adrenoreceptor, uncoupling protein I and lipoprotein lipase with increased risk of metabolic complications in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24: 93-100.
 - Rissanen J, Kuopusjärvi M, Pihlajamäki J, Sipiläinen R, Heikkinen S, Vanhala M et al. The Trp64Arg polymorphism of the β_3 -adrenergic receptor gene. *Diabetes Care* 1997; 20: 1319-23.
 - Rodriguez M et al. Evidence for the Presence of β_3 -adrenergic Receptor mRNA in the Human Brain *Res* 1994; 29: 369-375.
 - Saad MF, Bernaba B, Hwu Chii-Min, Jinagouda S, Fahmi S, Kogosov E and Boyadjian R. Insulin regulates plasma Ghrelin concentration. *The Journal of Clinical & Metabolism* 2002; 87(8): 3997-4000.

- Silver K, Mitchell BD, Walston J, Sorkin JD, Stern MP, Roth J, et al. Trp64Arg β_3 -adrenergic receptor and obesity in Mexican Americans. *Hum Genet* 1997; 101:306-11.
- Silver K, Walston J, Wang Y, Dowse G, Zimmet P, Shuldiner AR. Molecular scanning for mutation in the beta 3-adrenergic receptor gene in Nauruans with obesity and noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 4155-4158.
- Sir-Petermann T, López G, Castillo T, Muñoz S, Durruty P and Calvillán M. Biochemical markers and methods to assess insulin resistance in normal, obese and hyperandrogenic women. *Rev Med Chile* 1997, 125: 977-985.
- Sir-Petermann T, Maliqueo M, Pérez-Bravo F, Angel B, Carvajal P, Del Solar MP, Benítez R. Síndrome de ovario poliquístico: la importancia de establecer su diagnóstico. *Rev Med Chile*, 2001
- Slowinska-Srzednicka J, Zgliczynski S, Wierzbicki M et al. The role of hyperinsulinemia in the development of lipid disturbances in nonobese and obese women with the polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest* 1991, 14: 569-575.
- Strazzullo P, Iacone R, Sinai A et al. Relationship of the Trp64Arg polymorphism of the β_3 -adrenoceptor gene to central adiposity and high blood pressure: interaction with age. Cross sectional and longitudinal findings of the Olivetti Prospective Heart Study. *J Hypertens* 2001; 19: 399-406.
- Summers SA, Whiteman EL and Birnbaum MJ. Insulin signaling in the adipocyte. *International Journal of Obesity* 2000; 24(4): S67-S70.
- Susulic S, Frederich RC, Lawitts JA, et al. Knockout of the β_3 -adrenergic receptor gene. In: Program and abstracts of the 77th annual meeting of the Endocrine Society. June 14-17, 1995. Bethesda. Md Endocrine Society. 1995;36, abstract.
- Stein IF, Leventhal ML. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am J Obstet Gynecol* 1935; 29: 181-191.
- Talbott E, Guzick D, Clerici A et al. Coronary heart disease risk factors in women with polycystic ovary syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc* 1995, 15: 821-826.
- Thomas GN, Tomlinson B, Chan JCM, Young RP, Critchley JAJH. The Trp64Arg

- polymorphism of the β_3 -adrenergic receptor gene and obesity in Chinese subjects with components of the metabolic syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24: 545-51.
- Ukkola O, Rankinen T, Weisnagel SJ et al. Interaction among the α_2 -, β_2 -, and β_3 -adrenergic receptor genes and obesity-related phenotypes in the Quebec Family Study. *Metabolism* 2000; 49: 1063-70.
 - Unger RH and Orci L. Diseases of liporegulation: new perspective on obesity and related disorders. *The FASEB Journal* 2001; 15: 3
 - Urhammer SA, Clausen JO, Hansen T, Pedersen O. Insulin sensitivity and body weight changes in young white carriers of the codon 64 amino acid polymorphism of the β_3 -adrenergic receptor gene. *Diabetes* 1996; 45: 1115-20.
 - Walston J, Silver K, Bogardus C, Knowler WC, Celi FS, Austin S, Manning B, Strosberg AD, Stern MP, Raben N, Sorkin JD, Roth J, and Shuldiner AR: Time of onset of non-insulin-dependent diabetes mellitus and genetic variation in the β_3 -adrenergic receptor gene. *N Engl J Med* 1995; 333: 343-347.
 - WHO: Obesity preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity. Geneva, World Health Organization 1997.
 - WHO Physical status: The use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. Geneva, World Health Organization 1995, 854: 368-369.
 - Widén E, Lehto M, Kanninen T, Walston J, Shuldiner A, Groop LC. Association of a polymorphism in the β_3 -adrenergic-receptor gene with features of the insulin resistance syndrome in Finns. *N Engl J Med* 1995; 333:351.
 - Widén E, Lehto M, Kanninen T, Walston J, Shuldiner A, and Groop LC..Association of a polymorphism in the β_3 -adrenergic-receptor gene with features of the insulin resistance syndrome in finns . *The new england journal of medicine* 1995;10: 348-351.
 - Wild RA, Painter PC, Coulson PB et al. Lipoprotein lipid concentrations and cardiovascular risk in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1985, 61: 946-951.
 - Wilding JPH. Neuropeptides and appetite control. *Diabetes Medicine* 2002; 19: 619-627.

- Witchel Selma F, Fagerli Julian, Siegel Jessica, Smith Rhonda, Mitwally Mohamed Farouk, Lewy Vered, Arslanian Silva, and Lee Peter A. No association between body mass index and β_3 -adrenergic receptor variant (W64R) in children with premature pubarche and adolescent girls with hyperandrogenism. *Fertility and Sterility* 2000; 73: 509-515.
- Woods SC, Seeley RJ. Adiposity signals and the control of energy homeostasis. *Nutrition* 2000; 16: 894-902.
- Yoshida T, Sakane N, Unckawa T, Sakai M, Takahashi T, Kondo M. Mutation of β_3 -adrenergic receptor gene and response to treatment of obesity. *Lancet* 1995; 346: 1433-4.
- Zaagsma J, and SR Nahorski. 1990. Is the adipocyte B-adrenoreceptor a prototype for the recently cloned atypical β_3 -adrenoceptor? *Trends Pharmacol. Sci.* 11:3-7.
- Zamorano PL, Maheesh VB, De Sevilla LM, Chorich LP, Bhat GK, Brann DW. Expression and localization of the leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissues of the rat. *Neuroendocrinology* 1997; 65:223-228.
- Zawadzki JK, Dunaif A. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: towards a rational approach. In: Dunaif A, Givens J, Haseltine F, Merrian G, eds. *Current issue in endocrinology and metabolism: polycystic ovary syndrome*. New York: Blackwell 1992; 377-384.