

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“VICTOR BABEȘ” TIMIȘOARA
MEDICINA GENERALĂ
DEPARTMENTUL DE GENETICĂ MEDICALĂ**

JURCA-SIMINA IULIA-ELENA



TEZA DE DOCTORAT

**STRATEGII DE EVALUARE ALE PATOLOGIEI
GENETICE CORELATE PROGRESULUI
TEHNOLOGIC SI INFORMATIC**

Coordonator științific
PROF. UNIV. DR. PUIU MARIA

**Timișoara
2019**

CUPRINS

Lista publicațiilor	VII
Abrevieri	VIII
Indexul tabelelor	IX
Indexul figurilor	X
Dedicatie	XII
Mulțumiri.....	XIII
Declarația autorilor	XV
INTRODUCERE	XVI

PARTEA GENERALA

1. GENETICA MEDICALA- PREZENTARE GENERALA.....	1
1.1 De la Mendel la genomica moleculară	2
1.1.1 Genetica clasică.....	2
1.1.2 Genetica moleculară	8
1.1.3 Genomica moleculară	10
1.2 Definiția și clasificarea bolilor genetice.....	12
1.3 Actualități în bolile rare	13
1.3.1 Definiție.....	13
1.3.2 Prevalența.....	13
1.3.3 Odissea diagnostică în bolile genetice rare.....	17
1.3.4 Abordarea globală a dificultății de management în bolile rare	19
1.3.5 Profilul românesc al bolilor rare.....	20
1.3.5.1. Planul National	21

1.3.5.2. Organizarea asistenței sanitare și sociale în bolile rare	23
1.3.5.3. Registre de boli rare	25
1.3.5.4. Testarea genetică și screening-ul neonatal	25
1.3.5.5. Ghiduri și activități educaționale	27
1.3.5.6. Resurse informative pentru bolile rare	28
1.3.5.7. Activități de cercetare în bolile rare	29
1.3.5.8. Integrarea bolilor rare în politicile și serviciile sociale.....	30
1.3.5.9. Medicamente orfane.....	32
1.4 Diabetul tip 2 (T2DM) ca și boală genetică multifactorială.....	32
1.4.1 Definiție.....	32
1.4.2 Prevalență.....	33
1.4.3 Factori cheie în dezvoltarea diabetului de tip 2.....	35
1.4.4 Supraponderea și obezitatea în relație cu T2DM.....	36
1.4.5 Ereditatea și genetica T2DM	37
1.4.6 Scorul FINDRISC – un instrument simplu și sensibil în evaluarea predispoziției pentru T2DM	39

PARTEA SPECIALA – CONTRIBUTII PROPRII

2. TEMELE CERCETARII	40
2.1 Strategii de evaluare a patologiei genetice corelate progresului tehnologic și informatic în România	40
2.2 Evaluarea riscului de dezvoltare a diabetului zaharat de tip 2, tulburare multifactorială cu o componentă genetică complexă.....	42
3. STRATEGII DE EVALUARE A PATOLOGIEI GENETICE CORELATE PROGRESULUI TEHNOLOGIC ȘI INFORMATIC ÎN ROMÂNIA	44
3.1 Obiective	44

IV

3.2 Material si metode	45
3.2.1 Demografie.....	45
3.2.2 Populația studiului	46
3.2.3 Evaluarea clinică și investigațiile.....	46
3.2.4 Testarea genetică.....	47
3.2.5 Analiza datelor.....	53
3.3 Rezultate	54
3.3.1 Adresabilitatea pacienților și proveniența geografică a acestora în Centrul Regional de Genetică Medicală în România pe perioada a 4 ani de activitate.....	54
3.3.2 Contribuția la datele epidemiologice ale bolilor genetice în România.....	57
3.3.3 Prevalența diferitelor categorii de boli genetice (în concordanță cu ICD-11)	60
3.3.4 Rata de diagnostic a testărilor genetice realizate în cadrul Centrului de Medicina Genomica a Universitatii de Medicina si Farmacie “Victor Babes” din Timișoara.....	63
3.3.5 Strategii de evaluare a patologiei genetice corelate progresului tehnologic și informatic, aplicabile în România.....	63
3.4 Discuții.....	70
3.4.1 Adresabilitatea pacienților și proveniența geografică a acestora în Centrul Regional de Genetică Medicală în Romania pe perioada a 4 ani de activitate.....	70
3.4.2 Contribuția la datele epidemiologice ale bolilor genetice în Romania.....	70
3.4.3 Prevalența diferitelor categorii de boli genetice (în concordanta cu ICD-11)	71
3.4.4 Rata de diagnostic a testărilor genetice realizate în cadrul Centrului de Medicina Genomica a Universitatii de Medicina si Farmacie “Victor Babes” din Timișoara.....	72

3.4.5 Strategii de evaluare a patologiei genetice corelate progresului tehnologic și informatic, aplicabile în România.....	73
3.4.6 Sumarul poziției Romaniei in ceea ce priveste implementarea nevoilor cheie ale comunitatii bolilor rare	86
3.5 Limitări.....	88
3.6 Concluzii.....	89
4. EVALUAREA RISCULUI DE DEZVOLTARE A DIABETULUI ZAHARAT DE TIP 2, TULBURARE MULTIFACTORIALA CU O COMPONENTA GENETICA COMPLEXA.....	90
4.1 Obiective	90
4.2 Materiale si metode	90
4.2.1 Criterii de excludere	91
4.2.2 Condiții pentru includere	91
4.2.3 Antropometrie	91
4.2.4. Estimarea procentului de țesut adipos (PBF) prin bioimpedanță electrică	92
4.2.5. Modelul de predicție FINDRISC	93
4.2.6. Analiza datelor	95
4.3 Rezultate	95
4.3.1 Date epidemiologice din România privind excesul ponderal și obezitatea la adulți tineri aparent sănătoși .	95
4.3.2 Utilitatea aplicării chestionarului FINDRISC unei populații de indivizi tineri, sănătoși, din România.....	96
4.3.3 Asocierea procentului de țesut adipos corporal obținut prin bioimpedanță electrică cu modelul de predicție FINDRISC în vederea unei analize mai eficiente a riscului de a dezvolta diabet zaharat de tip 2.....	98
4.4 Discuții.....	99

4.4.1 Date epidemiologice din România privind excesul ponderal și obezitatea la adulți tineri aparent sănătoși .	99
4.4.2 Utilitatea aplicării chestionarului FINDRISC unei populații de indivizi tineri, sănătoși, din România.....	101
4.4.3 Asocierea procentului de țesut adipos corporal obținut prin bioimpedanță electrică cu modelul de predicție FINDRISC în vederea unei analize mai eficiente a riscului de a dezvolta diabet zaharat de tip 2.....	101
4.5 Limitări.....	104
4.6 Concluzii.....	104
5. REMARCI FINALE	106
5.1 Concluzii generale	106
5.2 Evaluare critică a cercetării.....	112
5.3 Perspective de cercetare	113
REFERINȚE	114
ANEXE	I

INTRODUCERE

O boală genetică este orice patologie cauzată de o anomalie în genomul unui individ, de la modificări cromozomiale la scară largă până la mutații punctiforme (variante).

Bolile genetice pot fi cauzate de o variantă patogenă sau probabil patogenă într-o genă (boli monogenice cu transmitere Mendeliană, prezente încă de la concepție), în mai multe gene (boală cu transmitere poligenică sau multifactorială), printr-o combinație de variante genice și factori de mediu (mutații dobândite într-o genă sau un grup de gene care apar întâmplător în timpul vieții unei persoane sau din cauza unei expuneri unui mediu toxic sau iradiant), prin modificări cromozomiale (ex. numărul sau structura unui cromozom, unitatea care poartă genele; pierderea numărului de copii (sau microdelețiile) și câștigul în numărul de copii (sau sindroame de microduplicație), sau disomii uniparentale (UPD) sau prin transmitere mitocondrială (4).

Aproximativ 3-4% dintre toți indivizii născuți sunt afectați de tulburări congenitale sau cu debut precoce, care generează, în general, dizabilități cronice cu influență critică asupra vieții persoanelor afectate și a familiilor lor, precum și asupra sistemului de sănătate. În ciuda progreselor remarcabile în politici, tehnologie și bioinformatică, povara bolilor genetice rare este resimțită la nivel mondial, ridicând probleme specifice în raport cu raritatea lor. În prezent, există aproximativ 8.000 de astfel de boli genice, catalogate în bazele de date OMIM (9), Orphanet (10) și DECIPHER (11). Pentru aproximativ 5856 dintre aceste boli a fost descoperită o genă asociată, dintre care 3.573 sunt caracterizate ca "acționabile" clinic într-un anumit grad (10,12). Bolile rare reprezintă un grup larg și heterogen, dar cu spectru fenotipic larg, de aceea acestea vor reprezenta prima direcție către care i se va adresa această lucrare, un accent deosebit fiind oferit aspectelor epidemiologice și de diagnostic din vestul României și către stadiul actual al tehnologiei și informației bolilor genetice rare în România.

Pe de altă parte, o direcție particulară a tezei va fi abordarea unei boli multifactoriale, diabetul zaharat de tip 2 (T2DM). În ciuda eforturilor globale în medicină și cercetare pentru prevenirea T2DM, a fost estimat un număr total de 422 milioane de adulți diagnosticați cu diabet în 2014 (90% cu T2DM), comparativ cu 108 milioane în 1980, reflectând o creștere a factorilor de risc asociați, cum ar fi obezitatea și factorii de mediu și de stil de viață (21,22). Ca și tulburare multifactorială cu prevalență critică și în creștere, și deoarece testarea genetică pentru a confirma o predispoziție în a dezvolta T2DM nu este posibilă actualmente, T2DM ar trebui să beneficieze de o abordare preventivă riguroasă

și instrumente pentru a obține scăderea factorilor de risc modificabili cum sunt greutatea excesivă și obezitatea.

După cum s-a demonstrat deja, acumularea de grăsime viscerală sau procentul de țesut adipos corporal (VFA) contribuie la disfuncția țesutului adipos și T2DM (24-26). VFA poate reprezenta un indice simplu măsurabil prin analiza impedanței bioelectrice (BIA), chiar dacă utilitatea acestei tehnologii în practica medicală este controversată. Poate acesta este motivul pentru care nu a fost luat în considerare faptul că VFA poate fi un element de încredere în evaluarea riscului de dezvoltare a T2DM. Scorul FINDRISC este unul dintre cei mai folosiți algoritmi de evaluare a riscului pentru T2DM în multe țări din Europa și nu numai și cuprinde 8 itemi: vârsta, IMC, circumferința taliei măsurată sub coaste, activitatea fizică zilnică, frecvența consumului de legume, fructe sau fructe de pădure, frecvența administrării medicamentelor pentru hipertensiune arterială, istoric de hiperglicemie, istoric familial de diabet (tip 1 sau tip 2) (27,28). Studiul nostru își propune să stabilească dacă asocierea procentului de grăsime corporală cu scorul FINDRISC duce la o mai bună predicție a diabetului zaharat tip 2.

RESEARCH QUESTIONS AND SPECIFIC OBJECTIVES

Astfel, teza prezintă două direcții principale de cercetare:

- I. Strategii de evaluare a patologiei genetice corelate progresului tehnologic și informatic în România
- II. Evaluarea riscului de dezvoltare a diabetului zaharat de tip 2, tulburare multifactorială cu o componentă genetică complexă

Obiectivele specifice pentru susținerea principalelor direcții de cercetare sunt următoarele:

- I.1. Determinarea adresabilității pacienților și proveniența lor geografică la un centru regional de genetică medicală din România pe parcursul a aproape 4 ani de activitate
- I.2. Contribuția la datele epidemiologice privind bolile genetice din România, prin descrierea grupului de pacienți având un diagnostic de suspiciune
- I.3. Estimarea prevalențelor diferitelor categorii de tulburări genetice din întreaga cohortă de pacienți, conform noului ICD-11 privind statistica mortalității și morbidității
- I.4. Furnizarea ratei de diagnostic a testărilor genetice în Centrul Regional de Genetică Medicală Timiș împreună cu Centrul de Medicină Genomică din cadrul Universității de Medicină și Farmacie „Victor Babeș” Timișoara

- I.5. Propunerea strategiilor de evaluare a bolilor genetice corelate cu progresul tehnologic și informatic, aplicabile în România
 - I.6. Sumarul poziției României în ceea ce privește implementarea nevoilor-cheie ale comunității de boli rare, din punctul de vedere al Centrului Regional de Genetică Medicală Timiș și al Centrului pentru Medicină Genomică din cadrul Universității de Medicină și Farmacie „Victor Babeș” Timișoara
-
- II.1. Să contribuie la datele epidemiologice privind excesul de greutate și obezitatea la populația tânără sănătoasă din România, ca factor de risc important pentru dezvoltarea diabetului zaharat de tip 2
 - II.2. Să ofere sumarul aplicării chestionarului FINDRISC unei populații de indivizi tineri, sănătoși, din România
 - II.3. Să investigheze dacă procentul de țesut adipos corporal obținut prin bioimpedanță electrică poate fi asociat modelului de predicție FINDRISC în vederea unei analize mai eficiente a riscului de a dezvolta diabet zaharat de tip 2.

STRATEGII DE EVALUARE A PATOLOGIEI GENETICE CORELATE PROGRESULUI TEHNOLOGIC ȘI INFORMATIC ÎN ROMÂNIA

MATERIALE ȘI METODE

Studiul retrospectiv de cohortă a evaluat 1038 pacienți referiți pentru evaluare genetică la Centrul Regional de Genetică Medicală Timiș (RCMGT), afiliat Spitalului de Urgență pentru copii „Louis Turcanu”, între 2015 și noiembrie 2018.

Toți pacienții referiți au fost incluși în grupul de evaluare, dar nu și în analiza datelor din cauza informațiilor insuficiente.

Au fost colectate date de evaluare clinică cuprinzătoare pentru fiecare persoană, așa cum se solicită în fișa de consult a geneticii medicale a RCMGT, inclusiv: demografia și informațiile generale ale pacientului, istoricul familial al bolilor, date despre perioada antenatală și perinatală, istoricul fiziologic personal, simptomele și istoricul medical patologic, constatări clinice ale examinării fizice, documentația rezultatelor investigației relevante, medicamente, alte informații.

Pacienților care prezintă caracteristici dismorfice li s-a solicitat să completeze un acord pentru a permite fotografii și a facilita diagnosticul.

Planul de investigații pentru fiecare pacient este personalizat, urmând unul dintre cele cinci scenarii posibile:

- 1) recomandarea testelor suplimentare și a evaluărilor experților necesare înainte de testarea genetică pentru a susține diagnosticul suspectat;
- 2) când se prezintă cu un fenotip specific pentru o boală genetică ce poate fi confirmată prin testare genetică, pacienții sunt rugați să completeze consimțământul informat pentru testarea genetică și este prelevat un eșantion biologic,
- 3) când un test genetic nu este disponibil pentru moment, ADN-ul pacientului poate fi păstrat pentru cercetări ulterioare, cu consimțământul informat,
- 4) necesitatea reevaluării clinice genetice într-o perioadă determinată, dacă se suspectează o tulburare, dar fără caracteristici suficiente pentru a fi supus procesului de diagnostic,
- 5) o boală genetică este exclusă după o evaluare completă.

Pacienții au efectuat teste specifice la decizia medicul genetician clinic. Serviciile de testare genetică din România sunt comandate și furnizate în conformitate cu politica națională actuală, gratuită atât pentru copii, cât și pentru adulții înscrși în Programul Național de Sănătate a Femeilor și Copilului, Subprogramul VI.3, Prevenirea malformațiilor congenitale prin diagnostic pre și postnatal (69). Testele genetice au fost efectuate la Centrul de Medicină Genomică de la Universitatea de Medicină și Farmacie „Victor Babes” din Timișoara, ID-ul POSCCE ID: 1854, cod SMIS: 48749, contract 677 / 09.04.2015 (cariotip clasic; FISH (10 regiuni specifice), PCR (50 de variante), sindromul X fragil; SNP array (cariotip molecular); paneluri de secvențiere de nouă generație (NGS): panel TruSight Cardio (174 gene) și panel TruSight One (4813 gene)). Testele care indisponibile în Centrul nostru au fost efectuate în colaborare cu alte centre regionale românești de genetică medicală (Dolj, Iași, București, Cluj).

Un consimțământ scris standard a fost semnat de părinții/ tutorii copiilor sau de pacienții înșiși dacă aceștia prezentau peste 18 ani.

Dacă a fost confirmat un diagnostic, pacientul sau părinții/ tutorii lui au fost rugați să se prezinte pentru o altă consultație în ambulatoriu pentru a fi informați despre managementul global al bolii, despre evaluarea clinică inițială, abordările posibile cu privire la tratament, prevenirea complicațiilor, monitorizare periodică și pentru consiliere genetică.

Statistica descriptivă pentru acest studiu retrospectiv de cohortă a fost efectuată folosind IBM SPSS Statistics v23, pe variabile selective de grup și prezentate ca procente și medii.

Prevalența diferitelor categorii de boli genetice a fost calculată din grupul de pacienți și în conformitate cu ICD-11 pentru Statistica Mortalității și Morbidității (ICD-11 MMS), versiunea 2018 (99).

Rata de diagnostic (valoarea predictivă pozitivă pentru diferite teste genetice) a fost calculată ca proporția rezultatelor pozitive a fiecărui test pentru toți pacienții testați pentru acel test specific.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Registrul de pacienți local al RCMGT include aproape 1000 de pacienți unici care au beneficiat de o consultație genetică în ultimii 4 ani de activitate, având un număr triplat de pacienți în 2018, comparativ cu 2015. Pacienți din întreaga Românie s-au prezentat pentru consultație genetică, majoritatea dintre ei aparținând celor 4 județe alocate RCMGT (TM-45%, AR-11,8%, CS-9,9%, HD-7,7%), dar și 6,2% din județul Mehedinți și 19,5% din alte 30 de județe românești. Deși RCMGT servește locuitori din 4 județe, 25,6% dintre pacienții vizati sunt din restul țării. Având în vedere numărul de pacienți cu diagnostic de suspiciune de boli genetice, prevalența acestora în cele 4 județe alocate RCMGT a fost estimată la 0,0436%, iar pentru județul Timiș la 0,0668%. Acest fapt demonstrează o îmbunătățire la nivel național a accesului la informații atât pentru specialiști, cât și pentru pacienți, precum și pentru serviciile medicale privind bolile genetice rare.

În ceea ce privește forma de prezentare în clinică, 429 de pacienți unici au fost internați în secția Clinică de Genetică Medicală, 411 au fost consultați în ambulatoriu, 140 au fost referiți pentru consultare de către alte unități spitalicești și 58 de pacienți au fost adresați din București, Cluj-Napoca, Craiova, Iași și Oradea, având examinarea clinică și paraclinică completă, numai pentru efectuarea NGS.

60% dintre pacienți sunt stabiliți în mediul urban, în timp ce 40% în mediul rural. 467 persoane au fost examinate din județul Timiș, 58% provenind din zone urbane și 42% din sate și comune.

Un număr din ce în ce mai mare de pacienți au fost evaluați în RCMGT în cei 4 ani de activitate 2015-2018. În 2018, numărul de noi pacienți unici care au beneficiat de un consult genetic lunar a fost în medie de 35.

S-a estimat o prevalență foarte scăzută a populației afectate de boli genetice în comparație cu datele epidemiologice internaționale, cu siguranță

datorate subdiagnosticării și agregării în centrul nostru a unui număr mic de pacienți care prezintă anomalii de dezvoltare și/ sau deficiență intelectuală datorită calității de membru a rețelei europene ITHACA. De exemplu, domeniul oncologic și, din păcate, altele nu sunt încă acoperite de expertiza noastră. Cohorta noastră este dominată de pacienți de sex masculin și de cei stabiliți în zona urbană, distribuții menținute mai ridicate în toate caracteristicile examinate ulterior. Predominanța masculină s-ar putea datora unui număr mai mare de pacienți cu dizabilități intelectuale la sexul masculin datorită sindroamelor legate de X. În ceea ce privește vârsta la prima prezentare pentru diagnostic, copiii și adolescenții au fost majoritari, majoritatea de la 1 la 7 ani (32%), urmați de subgrupul de 7-14 ani și sugari, dar și de 16% pacienți adulți. Aceste prezentări tardive susțin „odiseea diagnosticului” recunoscută pe scară largă în domeniul bolilor rare, împreună cu o rată de morbiditate crescută, impunând referirea anterioară la specialiști (17,18).

Cele mai frecvente au fost anomaliile cromozomiale, incluzând sindroame de microdeleție / microduplicație (203 pacienți, de asemenea cu trisomie 21), urmate de afecțiuni cu întârziere a dezvoltării intelectuale ca trăsătură clinică relevantă (195 de pacienți), anomalii sau sindroame de dezvoltare multiple (179 de pacienți)) și anomalii de dezvoltare nespecificate (172 de pacienți). 5,5% dintre pacienți au fost referiți cu suspiciunea de cardiomiopatie hipertrofică de etiologie genetică, majoritatea la vârsta adultă, iar acest procent ridicat se datorează unei coroborări strânse a RCGMT cu Centrul de expertiză pentru bolile rare în domeniul bolilor cardiovasculare rare din Secția III de Cardiologie, structura Institutului de Urgență pentru Boli Cardiovasculare „Prof. C.C. Iliescu” București.

De asemenea, am analizat prevalența unor boli specifice în grupul nostru de pacienți. Sindromul Down a avut o prevalență de 7,7% în cohorta noastră și una de 39,8% în grupul anomaliilor cromozomiale. Sindromul Down a fost urmat de sindromul X Fragil, Noonan și Marfan.

În cohorta noastră, ceea ce am observat în primul rând a fost o scădere constantă a cariotipării de-a lungul anilor și o creștere a ratelor de diagnostic (17,9% în 2016 și 26,4% în 2018), deoarece SNP array oferă șanse mai mari de a diagnostica deleții și duplicații cromozomiale. Pacienții cu dizabilități intelectuale, cu sau fără malformații, au avut o rată de diagnosticare de 20,5% prin analiza SNP array, comparativ cu literatura (8-12% (103)). În ceea ce privește panelurile NGS, ratele de diagnostic molecular au fost ridicate atât pentru panelurile Cardio, cât și pentru cele de „exom clinic” extins, comparativ cu literatura de specialitate (11,3% (104), 26% (105)), demonstrând, de asemenea, o evaluare clinică adecvată. Au fost descoperite și noi variante

asociate bolii (date care nu sunt detaliate în această lucrare), necesitând investigații suplimentare care trebuie confirmate și stabilirea unei fenotipuri și a unei strategii de gestionare mai bune pentru acești pacienți.

Rata de diagnosticare ridicată arată o corelație fenotip-genotip bună atât în clinici cât și în laborator, precizie și interpretare sistematică a datelor, conform tendințelor actuale de cercetare. Aceste rate oferă mai multă certitudine și curaj în munca privind bolile genetice rare. De asemenea, oferă pacienților români, șanse similare pentru un diagnostic acasă, și nu în străinătate. În prezent, RCGMT dispune și de secvențializarea întregului exom pentru o acoperire mai largă a patologiei, dar lipsa resurselor umane și bugetare restricționează alocarea testului / pacient. Secvențializarea întregului genom ar trebui să îmbunătățească rata de diagnostic la pacienții pentru care toate genetice anterioare nu au fost concludente.

Strategia de evaluare pentru fiecare patologie și pentru fiecare caz clinic în special este deosebită: un fenotip clar permite un diagnostic de suspiciune rapid, dar cele nespecifice necesită o abordare minuțioasă și investigații clinice suplimentare, în colaborare cu diferiți specialiști, cum ar fi pediatri, cardiologi, neurologi, specialiști în metabolism, nefrologi, gastroenterologi, endocrinologi, imunologi, oncologi și alții.

În unele cazuri, evaluările clinice / dismorfologice și de dezvoltare în dinamică sunt mai informative decât evaluările unice în investigarea planificării și gestionării. Resursele online și accesul la ele este un instrument important pentru fenotiparea dificilă (106). De asemenea, pentru că discutăm despre boli rare, chiar și după epuizarea tuturor testelor genetice disponibile, este posibil să întâlnim diagnostice genetice nesoluționate.

Prioritățile viitoare pentru RCMGT sunt reducerea timpului de transformare prin suplimentarea resurselor umane și financiare, extinderea testelor oferite secvențierii întregului genom (WGS), întrucât WES tocmai a fost adăugat listei noastre de disponibilități și îmbunătățirea cercetării în boli rare în colaborare cu ERN ITHACA.

Este important să se țină seama de mai multe limitări ale studiului. Zona geografică a populației studiate a fost restrânsă, iar rezultatele nu pot fi generalizate pentru întreaga țară, dar cu toate acestea, acesta ar putea fi începutul unui studiu la nivel național.

Testarea genetică nu a fost efectuată pentru toți pacienții care s-au adresat centrului din cauza finanțării limitate. S-a acordat prioritate pacienților cu suspiciune de boală și nu verificării statusului de purtător

decât dacă a fost nevoie. Pentru acești pacienți, criteriile de diagnostic clinic și evaluarea ulterioară au rămas o posibilitate.

De asemenea, întrucât WES nu a fost efectuat la niciunul dintre acești pacienți, procentul bolilor încă nediagnosticate a fost mai mare decât cel prezent.

Limitările cu rezonanță națională sunt legate de rețelele naționale care nu funcționează încă așa cum s-a propus: fiecare județ ar trebui să aibă cel puțin o persoană de contact pentru domeniul geneticii, cel puțin până când un medic genetician își va avea locul în fiecare spital județean. În prezent, doar un județ are un genetician, în afară de centrele universitare. Legătura cu studiul nostru este că nu am avut termeni de comparație naționali cu privire la abordarea unui centru și a cohorței de pacienți, mulți pacienți sunt încă tratați pentru alte boli decât cauza reală a problemelor de sănătate și, de asemenea, că pacienții din toată țara vin la RCGMT sau unul dintre celelalte cinci centre genetice regionale pentru diagnostic și management.

CONCLUZII

În ciuda progreselor remarcabile în politici, tehnologie și bioinformatică, povara bolilor rare este răspândită la nivel mondial, ridicând probleme specifice în raport cu raritatea acestora. În zilele noastre, evaluarea clinică amănunțită nu mai este singurul instrument disponibil pentru diagnostic, dar este crucială în orientarea către diferite investigații genetice, restrângându-ne accentul la un anumit organ, sistem sau componentă fenotip.

În cohorta noastră, sa estimat o prevalență foarte scăzută a populației afectate de tulburări genetice, comparativ cu datele epidemiologice internaționale, fapt cu siguranță datorat persoanelor subdiagnosticate și agregării din centrul nostru a unui număr mic de pacienți care prezintă malformații de dezvoltare și / sau handicap intelectual din cauza apartenenței noastre la ERN-ITHACA. Cea mai mare prevalență estimată pentru grupul nostru de pacienți a fost pentru anomaliile de dezvoltare nespecificate, urmate de anomaliile cromozomiale, incluzând sindroame de microdeletie / microduplicare, condiții cu dezvoltarea intelectuală ca trăsătură clinică relevantă, anomalii sau sindromuri de dezvoltare multiple și tulburări neuromusculare.

RCMGT a reușit să ajungă la un diagnostic (uneori folosind mai mult de un tip de test / per pacient), cu randamente mai mari în comparație cu cele din literatură, cu toate acestea, cu o perioadă de timp mai mare, datorită resurselor umane și financiare limitate.

Sunt necesare îmbunătățiri suplimentare pentru a promova strategiile de asistență medicală pentru pacienții cu boli rare genetice din România, în final pentru îmbunătățirea calității vieții lor. În prezent, RCGMT dispune pentru secvențializarea Whole Exome pentru o acoperire mai largă a patologiei, dar lipsa resurselor umane și bugetare coordonează alocarea testului / pacientului. Secvențializarea întregului genom ar trebui să îmbunătățească rata de diagnostic la pacienții pentru care toate testele genetice anterioare nu au fost concludente.

EVALUAREA RISCULUI DE DEZVOLTARE A DIABETULUI ZAHARAT DE TIP 2, TULBURARE MULTIFACTORIALĂ CU O COMPONENTĂ GENETICĂ COMPLEXĂ

MATERIALE ȘI METODE

Acest studiu transversal realizat în 2016, realizat în cadrul Departamentului de Cardiologie/ Medicină Preventivă și Reabilitare Cardiovasculară, Centrul de Cercetare Angiogeneză, Universitatea de Medicină și Farmacie Victor Babeș din Timișoara, a înscris 341 de tineri studenți medicali voluntari sănătoși de la Universitatea de Medicină „Victor Babes” și Farmacie, Timișoara, România, care au acceptat să se alăture studiului și și-au dat consimțământul în scris. Toate procedurile au fost aprobate de comitetul de etică al Universității „Victor Babes” și au respectat Declarația de la Helsinki.

Criteriile de excludere au fost reprezentate de gravide, participanții care au avut un istoric de intervenții chirurgicale majore la extremități, malignități, boala renală cronică stadiul IV sau terapia de substituție renală, ciroza hepatică cu ascită, insuficiență cardiacă cu edem periferic sau hipotiroidism sever, febră rezultată din o infecție activă sau inflamație, cei care primesc tratament sistemic cu steroizi, cei care suferă de deshidratare severă și cei care au medicație cronică (de exemplu, statine, diuretice și alte medicamente care ar putea afecta distribuția apei în organism). Deoarece există contraindicații legate de măsurarea procentului de grăsime corporală și combinația cu alte dispozitive medicale (stimulator cardiac, electrocardiograf portabil, etc.), pentru fiecare persoană măsurată aceste aspecte au fost verificate cu atenție.

Măsurătorile antropometrice au fost efectuate de un singur examinator. Greutatea, înălțimea, circumferința taliei și circumferința șoldului au fost măsurate fără încălțăminte și cu îmbrăcăminte ușoară, folosind aceleași

dispozitive. Circumferința taliei a fost măsurată la punctul mijlociu dintre creasta iliacă și coaste. IMC-ul a fost calculat ca și greutatea (kg) împărțită la înălțimea la pătrat (m²) și WHR ca circumferința taliei împărțită la circumferința șoldului ($W \div H$) (125). Toate măsurătorile au îndeplinit criteriile de control al calității.

VFA abdominală a fost măsurată pentru fiecare individ folosind un aparat multifrecvență tetrapolară BIA (Bioelectrical Impedance Analysis) (InBody720®). Aparatul folosește frecvențe de 1, 5, 50, 250, 500 kHz și 1 MHz pentru a analiza valorile fluidului intracelular și extracelular și conținutul de apă. Au fost obținute trei citiri consecutive pentru fiecare individ, cu media celor 3 utilizate pentru analiza statistică. Au fost aplicate cele mai frecvent utilizate puncte de limită a PBF pentru definirea excesului de greutate (20,1-24,9% pentru bărbați și 30,1-34,9% pentru femei) și obezitate ($\geq 25\%$ pentru bărbați și $\geq 35\%$ pentru femei) (128,129).

Participanții au fost invitați să completeze chestionarul de evaluare a scorului FINDRISC după ce le-au fost explicate toate elementele. Elementele (8) au fost cele clasice din formularul de evaluare a riscului FINDRISC T2DM: vârstă, IMC, circumferința taliei măsurată sub coaste, activitate fizică zilnică, frecvența consumului de legume, fructe sau fructe de pădure, frecvența de a lua medicamente pentru hipertensiunea arterială, istoric de hiperglicemie, istoric familial de diabet (tip 1 sau tip 2). Scorul final este suma scorurilor de la 8 întrebări și variază de la 0 la 26. Interpretarea chestionarului de evaluare a fost efectuată după cumularea numărului total de puncte corespunzător fiecărui element, punctajul FINDRISC fiind considerat o variabilă continuă și categorică, ca următorul:

- mai mic de 7: scăzut, estimat că 1 persoană din 100 va dezvolta boală
- 7–11: puțin crescut, estimat că 1 persoană din 25 va dezvolta boala
- 12–14: moderat, estimat că 1 persoană din 6 va dezvolta boala
- 15–20: crescut, estimat că 1 persoană din 3 va dezvolta boala
- Mai mare de 20: foarte crescut, estimat că 1 persoană din 2 va dezvolta boala (27).

Analiza statistică a fost realizată folosind programul IBM SPSS Statistics 23 și o valoare p two-tailed cu <0.05 a fost considerată semnificativă. Pentru a descrie cohorta, datele au fost testate pentru o distribuție normală. Rezultatele au fost comparate între femei și bărbați folosind teste t independente. Valoarea așteptată a fost calculată și a fost luat în considerare un punct de cut-off de 5. Coeficienții de corelație ai lui Spearman au fost aplicați pentru a stabili corelațiile dintre variabile.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Un total de 341 studenți sănătoși, adulți, 143 de femei și 198 de bărbați, cu vârste cuprinse între 18 și 44 de ani au fost recrutați în studiu.

Variabilele măsurătorilor antropometrice care nu au avut o distribuție normală au fost prezentate folosind mediane și quartile. Nu au existat diferențe între bărbați și femei cu privire la vârsta medie (20 de ani). 27,6% din întreaga cohortă au fost determinați ca fiind supraponderali și 12% cu obezitate (prevalența semnificativ mai mică în comparație cu prevalența globală).

Distribuția pe sexe a fost următoarea: 13,9% din grupul de femei au prezentat suprapondere și 7% obezitate, în timp ce 37,4% dintre bărbați au prezentat suprapondere și 15,7% obezitate. Mediana IMC a fost de 25,18 kg/m² pentru bărbați și 21,04 kg/m² pentru femei, valoarea p 0,002. În general, bărbații au avut și un WHR mai mare: WHR median calculat pentru bărbați a fost 0,86, în timp ce la femei a fost 0,79, valoarea p 0,015. Femeile au avut PBF mai mare (29% comparativ cu 20,9%). O cercetare în subgrupul populației românești cu vârste cuprinse între 20 și 39 de ani, publicată în 2016, a constatat o prevalență de 27,20% pentru suprapondere și 20,90% pentru obezitate în general. Bărbații aveau o prevalență de suprapondere de 40,20% și obezitate de 20,70%, iar supraponderea la femei a fost mai mică, 14,80%, dar obezitatea mai mare, 21,10%. Rezultatele noastre au fost similare cu celelalte cohorte tinere românești doar în ceea ce privește supraponderea masculină și feminină, dar mai mici în ceea ce privește obezitatea. Aceste diferențe pot fi totuși explicate prin extinderea grupului de vârstă la 39 de ani și prin numărul mai mare de subiecți (131).

Scorul FINDRISC a fost în medie 5,05 pentru întreaga cohortă; 76,2% dintre studenți au un risc scăzut (se estimează că 1 din 100 vor dezvolta boală), 18,8% au un risc ușor crescut (1 din 25 vor dezvolta boală), 2,9% au un risc moderat (1 din 6 vor dezvolta boală), 1,8% au un risc ridicat (1 din 3 se va dezvolta boală) și 0,3% au un risc foarte mare de a dezvolta T2DM în următorii 10 ani (estimat că 1 din 2 vor dezvolta boală), în conformitate cu criteriile formularului de evaluare. Persoanele găsite cu risc moderat și ridicat au fost sfătuite să-și măsoare glicemia ajeun și să fie reevaluați ulterior.

De asemenea, am atribuit scorul FINDRISC IMC-ului și am putut demonstra că numărul persoanelor cu risc ușor ridicat de a dezvolta T2DM a fost distribuit în egală măsură între toate categoriile de status nutrițional, cu excepția subponderalilor. Dar dacă luăm în considerare faptul că un procent de 5,86% din întreaga cohortă, reprezentând indivizii cu subpondere și IMC normal, au un risc estimat că 1 din 25 va dezvolta boala, acest procent devine destul de

important, deoarece este adresat populației țintă a acestui studiu specific. În ceea ce privește scorul FINDRISC moderat și ridicat în rândul persoanelor obeze era de așteptat ca aceștia să domine (14 persoane obeze din 18 cu scor FINDRISC moderat și ridicat).

Într-un studiu transversal realizat la Universitatea Hashemite din Zarqa din Iordania în 2014, a fost raportat un procent de 66,9% studenți cu risc scăzut, 26,2% corespunzând unui risc ușor ridicat, 5,2% indicând un risc moderat și 1,8% risc ridicat de a dezvolta diabet zaharat tip 2. Diferențele minime dintre datele noastre și studiul comparat se pot datora cohorței noastre relativ mici comparativ cu cea din Iordania, precum și particularităților etnice (133).

Prin urmare, această limitare a aplicabilității scorului FINDRISC este discutabilă din cauza prevalenței crescânde a T2DM la tineri. De asemenea, literatura de specialitate nu a furnizat încă multe studii privind calculul noninvaziv al scorului de risc la tineri.

Am analizat corelația dintre scorul FINDRISC și WTR pentru întreaga cohortă ca și control și am găsit o corelație statistică și pozitivă - 0,477, $p < 0,001$ (WTR este un item parțial al scorului FINDRISC). În continuare, am analizat corelația dintre scorul FINDRISC și procentul de țesut adipos corporal (VFA) pentru întregul grup de studenți și am decelat o corelație statistică mai mare și pozitivă decât cea cu WTR (0,561, $p < 0,001$). În ceea ce privește subgrupul ambelor sexe, corelația dintre scorul FINDRISC, WTR și PBF a fost directă, foarte puternică și semnificativă statistic ($p < 0,001$). Interesant, studiul nostru a găsit o corelație mai puternică între scorul FINDRISC și PBF, comparativ cu scorul FINDRISC și WHR pentru întreaga cohortă, dar și pentru bărbați și femei.

O limitare acestui studiu este legată de validarea punctajului FINDRISC în rândul persoanelor sub 34 de ani și peste 64 de ani. Această problemă rezultă din proiectarea studiului primar al scorului FINDRISC, care a fost aplicată acestei categorii de vârstă și, chiar dacă a fost utilizată la nivel mondial în diferite lucrări de cercetare, nu a fost extinsă tinerilor (27,28,132).

De asemenea, o limitare este aceea că măsurarea prin BIA a PBF este încă controversată, prin urmare, aceste rezultate ar putea să nu valoreze prea mult pentru cei care cred că nu este o metodă fiabilă de estimare.

O limitare importantă a acestui studiu din punct de vedere genetic a fost că obiectivul inițial a fost să propună gene candidate pentru T2DM pentru cohorta de pacienți sau să testeze pe cei cu un scor FINDRISC

ridicat. Acest lucru nu a fost posibil din cauza limitărilor de fonduri și de timp.

CONCLUZII

Având în vedere prevalența din ce în ce mai mare la nivel mondial a diabetului zaharat de tip 2, împreună cu supraponderea și obezitatea, în ciuda eforturilor globale pentru prevenirea acestuia, ar trebui luate în considerare toate măsurile suplimentare care ar putea îmbunătăți rezultatele.

Datele epidemiologice din cohorta tânără și sănătoasă analizată demonstrează o prevalență mai mică a principalului factor de risc modificabil, obezitatea, comparativ cu studiile naționale și internaționale, pentru ambele sexe, dar încă dublu la bărbați, comparativ cu femeile. Prevalența scăzută a supraponderiei și a obezității se poate datora mediei de vârstă de 20 de ani în cohorta noastră, comparativ cu studii mai ample și nu ar trebui luată ca factor de risc favorabil pentru a nu dezvolta T2DM.

Acest studiu subliniază fiabilitatea estimării procentului de țesut adipos corporal prin analiza impedanței bioelectrice simple atunci când se evaluează riscul T2DM. Rezultatele noastre susțin o corelație semnificativă între modelul de predicție de evaluare FINDRISC și PBF, chiar mai puternic decât între FINDRISC și raportul talie-șold (WTR), unul dintre elementele sale parțiale. Astfel, recomandăm PBF estimat prin BIA (respectarea procedurilor de control al calității) ca un parametru potențial care trebuie luat în considerare în modelul de predicție a riscului pentru T2DM, deoarece este un instrument accesibil pentru utilizarea în nivelul primar de asistență medicală și, de asemenea, pentru că ar putea îmbunătăți evaluarea riscului la populația tânără.

EVALUAREA CRITICĂ A CERCETĂRII

Această teză tratează principalele abordări internaționale și naționale privind bolile genetice. Coroborarea standardelor globale în domeniul bolilor rare cu „stadiul național actual al tehnicii” ghidează pentru ajustarea politicilor și elaborarea în trepte a strategiilor. Deoarece nu există nicio altă lucrare națională sau publicație științifică care să adune toate punctele cheie în ceea ce privește evaluarea cuprinzătoare a bolilor genetice rare, contribuția adusă de această lucrare este importantă.

Autorul prezintă rezultate privind prevalența bolilor genetice din județul Timiș și grupul de 4 județe alocate Centrului Regional de Genetică Medicală Timiș (TM, HD, CS, AR) și arată o prevalență aparentă foarte scăzută în comparație cu cea presupusă, date neraportate anterior.

Autorul prezintă prevalența principalelor categorii de boli genetice și, de asemenea, pentru unele sindroame specifice, oferind procente de referință cu aplicabilitate la pacienții români și, în special, la cei care provin dintr-unul din cele 4 județe alocate.

În ceea ce privește diabetul zaharat de tip 2, ca o tulburare multifactorială cu prevalență globală și națională în continuă creștere în rândul populației tinere, comunitatea noastră solicită eficacitate în prevenirea sa. Autorul aplică chestionarul de evaluare FINDRISC pentru a determina riscul de dezvoltare a T2DM la o populație tânără sănătoasă și este primul care propune procentul de țesut adipos corporal estimat prin analiza impedanței bioelectrice ca parametru potențial ce trebuie luat în considerare în modelul de risc pentru predicțiile T2DM, deoarece este un instrument accesibil în utilizarea la nivel primar de asistență medicală.

PERSPECTIVE DE CERCETARE

Perspectivile pentru completarea și îmbunătățirea rezultatelor din teza prezentată ar putea viza extinderea analizei bolilor genetice rare utilizând o bază de date mai cuprinzătoare. Clasificarea afecțiunilor ar putea fi prezentată mai detaliat și aplicată pentru o prevalență clară în rândul unei populații extinse de pacienți studiați la nivel național. De asemenea, planificăm o sumarizare a datelor înregistrate de toate centrele genetice regionale și analize similare sau mai complexe, care să ofere prevalența națională a bolilor.

Un chestionar pentru calitatea vieții și unul cu privire la odiseea diagnosticului și nevoile speciale ale pacienților sunt planificate să fie utilizate în RCGMT începând de anul viitor, iar aceste date vor servi la o mai bună acordare în îngrijirea pacienților noștri.

Acest tip de lucrări este potrivit pentru a pune bazele elaborării Ghidurilor naționale pentru testare și diagnostic genetic în practica medicală.

Noile variante asociate bolilor, prezente și în populația noastră de studiu, dar care nu sunt detaliate în această lucrare, au nevoie de investigații suplimentare pentru a fi confirmate și pentru a stabili o mai bună fenotip și strategie de management pentru acești pacienți.

În ceea ce privește afecțiunile multifactoriale și în special diabetul zaharat de tip 2, o contribuție la descoperirea genelor candidate prezente în populația românească, împreună cu măsurarea PBF, de asemenea prin alte

metode și includerea acestuia în scorul FINDRISC ar putea fi obiective suplimentare pentru finalizarea lucrării prezente.

REFERINȚE SELECTIVE

4. Germain DP, Jurca-Simina IE. Principles of Human Genetics and Mendelian Inheritance, Neurometabolic Hereditary Diseases of Adults Textbook, Springer International Publishing AG, part of Springer Nature 2018, (I):1-28.
9. Hamosh A, Scott AF, Amberger J, Valle D, McKusick VA. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). Hum Mutat. 2000;15(1):57–61.
10. Orphanet: an online database of rare diseases and orphan drugs. Copyright with INSERM 1997. Available from: <http://www.orpha.net/consor/www/cgi-bin/index.php?lng=EN>
11. Firth HV, Richards SM, Bevan AP, Clayton S, Corpas M, Rajan D, et al. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. Am J Hum Genet. 2009 Apr 10;84(4):524–33.
12. Solomon BD, Nguyen A-D, Bear KA, Wolfsberg TG. Clinical genomic database. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Jun 11;110(24):9851–5.
17. Mueller T, Jerrentrup A, Bauer MJ, Fritsch HW, Schaefer JR. Characteristics of patients contacting a center for undiagnosed and rare diseases. Orphanet J Rare Dis. 2016 21;11(1):81.
18. Blöß S, Klemann C, Rother A-K, Mehmecke S, Schumacher U, Mücke U, et al. Diagnostic needs for rare diseases and shared prediagnostic phenomena: Results of a German-wide expert Delphi survey. PloS One. 2017;12(2):e0172532.
21. Mayer-Davis EJ, et al. The many faces of diabetes in American youth: type 1 and type 2 diabetes in five race and ethnic populations: the SEARCH for Diabetes in Youth Study. Diabetes Care. 2009. 32(2):99–101.
22. Ibrahim M. Global status of diabetes prevention and prospects for action: A consensus statement. Diabetes Metab Res Rev. Vol. 34. 2018. 3021 p.
24. Boyko EJ, Leonetti DL, Bergstrom RW, Newell-Morris L, Fujimoto WY. Visceral adiposity, fasting plasma insulin, and lipid and lipoprotein levels in Japanese Americans. Int J Obes Relat Metab Disord J Int Assoc Study Obes. 1996 Sep;20(9):801–8.
25. Bjorntorp P. Metabolic implications of body fat distribution. Diabetes Care. Vol. 14. 1991. 1132–1143 p.
26. Hanley AJG, Wagenknecht LE, Norris JM, Bryer-Ash M, Chen YI, Anderson AM, et al. Insulin resistance, beta cell dysfunction and visceral adiposity as predictors of incident diabetes: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS) Family study. Diabetologia. 2009 Oct;52(10):2079–86.
27. Lindström J, Tuomilehto J. The diabetes risk score: a practical tool to predict type 2 diabetes risk. Diabetes Care. 2003 Mar;26(3):725–31.
28. Tanamas SK, Magliano DJ, Balkau B, Tuomilehto J, Kowlessur S, Söderberg S, et al. The performance of diabetes risk prediction models in new populations: the role of ethnicity of the development cohort. Acta Diabetol. 2015 Feb;52(1):91–101.

69. State of the Art of Rare Diseases – Activities in EU Member States and Other European Countries Romania Report [Internet]. 2017. Available from: <http://www.rd-action.eu/wp-content/uploads/2017/10/Romania-Report-15.12.2017.pdf>.
99. ICD-11 - Mortality and Morbidity Statistics [cited 2019 June 10]. Available from: <https://icd.who.int/browse11/l-m/en>
103. Sagoo GS, Butterworth AS, Sanderson S, Shaw-Smith C, Higgins JPT, Burton H. Array CGH in patients with learning disability (mental retardation) and congenital anomalies: updated systematic review and meta-analysis of 19 studies and 13,926 subjects. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. 2009 Mar;11(3):139–46.
104. Reale C, Panteghini C, Carecchio M, Garavaglia B. The relevance of gene panels in movement disorders diagnosis: A lab perspective. *Eur J Paediatr Neurol EJPN Off J Eur Paediatr Neurol Soc*. 2018 Mar;22(2):285–91.
105. Lee H, Deignan JL, Dorrani N, Strom SP, Kantarci S, Quintero-Rivera F, et al. Clinical exome sequencing for genetic identification of rare Mendelian disorders. *JAMA*. 2014 Nov 12;312(18):1880–7.
106. Pogue RE. Rare genetic diseases: update on diagnosis, treatment and online resources, *Drug Discovery. Today*. 2018;23:1.
125. Heyward VH SL. *Applied Body Composition Assessment*. Champaign IL, Human Kinetics. 1996. 82 p.
128. Romero-Corral A, Somers VK, Sierra-Johnson J, Jensen MD, Thomas RJ, Squires RW, et al. Diagnostic performance of body mass index to detect obesity in patients with coronary artery disease. *Eur Heart J*. 2007 Sep 1;28(17):2087–93.
129. Bosy-Westphal A, Geisler C, Onur S, Korth O, Selberg O, Schrezenmeir J, et al. Value of body fat mass vs anthropometric obesity indices in the assessment of metabolic risk factors. *Int J Obes*. 2006 Mar;30(3):475–83.
131. Popa S, Moța M, Popa A, Moța E, Serafinceanu C, Guja C, et al. Prevalence of overweight/obesity, abdominal obesity and metabolic syndrome and atypical cardiometabolic phenotypes in the adult Romanian population: PREDATORR study. *J Endocrinol Invest*. 2016 Sep;39(9):1045–53.
132. Twig G, Afek A, Derazne E, Tzur D, Cukierman-Yaffe T, Gerstein HC, et al. Diabetes risk among overweight and obese metabolically healthy young adults. *Diabetes Care*. 2014 Nov;37(11):2989–95.
133. Al-Shudifat A-E, Al-Shdaifat A, Al-Abdoh AA, Aburoman MI, Otoum SM, Sweedan AG, et al. Diabetes Risk Score in a Young Student Population in Jordan: A Cross-Sectional Study. *J Diabetes Res*. 2017;2017:8290710.