



INVESTIGACIÓN ORIGINAL

MARCADORES GENÉTICOS EN PACIENTES CON SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO Y DOS DE SUS FAMILIARES EN PRIMER GRADO DE CONSANGUINIDAD. ESTUDIO DE CASOS Y CONTROLES

Genetic markers in patients with polycystic ovary syndrome and in two relatives in the first degree of consanguinity. Case control study

María Patricia Hormaza-Ángel, MD¹; Camilo Andrés Agudelo-Vélez, MD, MSc²; Isabel Cristina Ortiz-Trujillo, PhD³; Lina María Martínez-Sánchez⁴; María de los Ángeles Rodríguez-Gázquez⁵; Johan Sebastián Lopera-Valle⁶; Diana Catalina Jaramillo-González, MD⁷; Andrea Jhoanna Manrique-Rincón⁸; Juan José Builes-Gómez⁹

Recibido: noviembre 23/12 – Aceptado: mayo 28/13

RESUMEN

Objetivo: estimar la asociación entre los marcadores genéticos D19S884 y UCSNP-19 y el síndrome de ovario poliquístico (SOP).

Materiales y métodos: estudio de 50 casos con SOP según criterios de Rotterdam y 100 controles: dos familiares femeninos en primer grado de consanguinidad sin la enfermedad. Se evaluaron

características sociodemográficas y clínicas. Los marcadores genéticos D19S884 y UCSNP-19 se identificaron por reacción en cadena de la polimerasa. Las variables cuantitativas se presentan con media \pm desviación estándar; se utilizaron las pruebas de t de Student y de McNemar. Se calcularon los OR y el IC 95%.

Resultados: la edad promedio en los casos fue 23 ± 6 años y en los controles de 39 ± 18 años. Los casos se asociaron de manera significativa a hirsutismo OR = 3,6 (IC 95%: 1,3-12,8) y acné OR = 4,3 (IC 95%: 1,4-17,4). Los polimorfismos del ins e ins/ins de UCSNP-19 tuvieron las mayores proporciones en los dos grupos de estudio, siendo el primero más frecuente en casos y el segundo en controles; sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Se identificaron 14 alelos de D19S884 que van desde 215 a 242 pb.

Conclusiones: no se encontró asociación entre el polimorfismo UCSNP-19 del gen CAPN10 y del marcador D19S994 con el SOP en la población estudiada.

- 1 Médica, Especialista en Ginecología y Obstetricia; endocrinóloga. Docente, Facultad de Medicina, Universidad Pontificia Bolivariana (UPB). Medellín, Colombia.
- 2 Médico, Magíster en Administración en Salud. Docente, Facultad de Medicina UPB. Medellín, Colombia.
- 3 Bióloga, Doctora en Biología. Docente, Facultad de Medicina UPB. Medellín, Colombia.
- 4 Bacterióloga, Especialista en Hematología y Manejo del Banco de Sangre. Docente, Facultad de Medicina UPB. Medellín, Colombia. linam.martinez@upb.edu.co
- 5 Enfermera, Doctora en Salud Pública. Docente, Facultad de Medicina UPB. Medellín, Colombia.
- 6 Estudiante de Medicina, Facultad de Medicina UPB. Medellín, Colombia.
- 7 Médico, estudiante de segundo año de Ginecología y Obstetricia, Facultad de Medicina UPB. Medellín, Colombia.
- 8 Estudiante de Biología, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.
- 9 Biólogo, Magíster en Biología. GENES Ltda. Medellín, Colombia.

Palabras clave: síndrome del ovario poliquístico, marcadores genéticos, hiperandrogenismo, consanguinidad.

ABSTRACT

Objective: To estimate the association between genetic markers D19S884 and UCSNP-19 and Polycystic Ovary Syndrome (PCOS).

Materials and methods: Study of 50 cases of PCOS consistent with the Rotterdam criteria and of 100 controls and two first-degree female relatives without the disease. Social, demographic and clinical characteristics were assessed, and genetic markers D19S884 and UCSNP-19 were identified using polymerase chain reaction. Quantitative variables are expressed as mean \pm standard deviation; the Student t test and the McNemar test were used. Odds ratios and 95% confidence intervals were estimated.

Results: Mean ages were 23 ± 6 years and 39 ± 18 years for the cases and controls, respectively. Cases showed a significant association with hirsutism OR = 3.6 (CI 95%: 1.3-12.8) and acne OR = 4.3 (CI 95%: 91.4-17.4). Del/ins and ins/ins polymorphisms of UCSNP-19 were found in the highest proportions in the two study groups, the former being more frequent among the cases and the latter among the controls. However, this difference was not statistically significant. Fourteen alleles of D19S884 were identified, ranging from 215 to 242 bp.

Conclusions: No association was found between the CAPN10 gene UCSNP-19 polymorphism and the D19S994 marker with PCOS in the population studied.

Key words: Polycystic ovary syndrome, genetic markers, hyperandrogenism, consanguinity.

INTRODUCCIÓN

El síndrome de ovario poliquístico (SOP) es un desorden endocrino heterogéneo, caracterizado por anovulación crónica, hiperandrogenismo, ovarios poliquísticos y anormalidad en la actividad de la insulina (1), con una prevalencia entre 5-10%

de mujeres en edad reproductiva (2). Es una entidad compleja (3, 4) con presencia de componente genético y factores ambientales en su etiología; se cree que algunos genes relacionados con la diabetes mellitus tipo 2 pueden jugar un papel importante en la patogénesis del síndrome debido a que este se encuentra asociado con el desarrollo de la intolerancia a la glucosa (5). El gen de la calpaina (CAPN10), que se evalúa por medio del polimorfismo UCSNP-19, ha mostrado evidencia de susceptibilidad al desarrollo del SOP. La actividad transcripcional de este gen es alta en células del páncreas, músculo e hígado, lo que sugiere que participa en la regulación de la secreción y acción de la insulina y en la producción de glucosa hepática, todas estas, acciones involucradas en el SOP (6). Debido a la fuerte asociación del SOP con la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2, se ha considerado al gen receptor de la insulina candidato para el síndrome (7, 8). La región 19p13 de este gen mostró asociación entre el SOP y el marcador microsatélite D19S884, mientras que no se presentó evidencia con otros marcadores de la misma región (9). Este marcador está localizado cerca del gen de resistencia a la insulina y estudios recientes han reportado evidencia de asociación y ligamiento de esta región genética con el SOP (10).

Teniendo en cuenta los resultados reportados sobre la asociación de algunos genes y este síndrome, y que la información que soporta esta posible asociación en la literatura internacional es escasa, el objetivo de nuestro estudio fue evaluar la asociación entre los dos marcadores genéticos y la presencia de síndrome de ovario poliquístico en una población colombiana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño y población. Estudio de casos y controles en el que participaron un total de 150 mujeres: 50 casos de SOP y 100 mujeres sin el síndrome. Se incluyeron mujeres de 18 a 57 años y se excluyeron mujeres que recibían terapia anovulatoria o con corticosteroides, y quienes presentaban otros desórdenes que se manifiestan también por anovulación.

Los casos fueron diagnosticados de acuerdo con los criterios de Rotterdam de 2003 (11), el cual define al síndrome como una disfunción ovulatoria más hirsutismo o hiperandrogenemia y, finalmente, hallazgos de ovarios poliquísticos por ecografía pélvica, según los parámetros descritos por Balen (12). Los controles fueron familiares, con ciclos normales de menstruación (< a 32 días). Se seleccionaron como controles dos familiares mujeres en primer grado de consanguinidad por cada caso. Todas las mujeres con SOP incluidas en el estudio se seleccionaron en forma consecutiva de la consulta de ginecología de la Clínica de la Universidad Pontificia Bolivariana, institución de alta complejidad que atiende población del régimen contributivo y subsidiado del sistema general de seguridad social en salud. Igualmente, se incluyeron pacientes de la consulta ginecológica particular de los investigadores. El comité de Ética de la Universidad Pontificia Bolivariana aprobó el estudio y de cada participante se obtuvo el consentimiento informado de forma escrita.

Técnicas. Tras la captación, los casos y sus dos controles fueron citados en un segundo momento para la toma de la información, para la cual se utilizó un cuestionario diseñado por los investigadores con las variables de interés. Para el análisis genómico se realizó el aislamiento del ADN (ácido desoxirribonucleico) de leucocitos de sangre total por extracción salina (13). Posteriormente se realizó una amplificación a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del marcador D19S884 que fue indicado en el banco de datos genómico (GBD, D19S884)¹ y los polimorfismos para el marcador UCSNP-19 fueron identificados por PCR. Todas las secuencias de los primers, las condiciones y el tamaño de los productos de la PCR fueron evaluados por Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Para lograr una correcta genotipificación se utilizó un control positivo para cada caso y todos los geles fueron leídos con doble ciego.

Se midieron las características sociodemográficas tales como la edad, el nivel socioeconómico, el peso, la talla y el índice de masa corporal (IMC), la presencia de acné, la caracterización fenotípica y el análisis del ADN genómico.

Análisis estadístico. Todos los análisis fueron realizados utilizando el paquete estadístico SPSS versión 17 (Chicago, Il). La información de las variables continuas se presenta con su promedio y la desviación (DE), además de los valores mínimos y máximos, y las cualitativas por medio de proporciones. Las diferencias entre los promedios de edad por grupo fueron evaluadas con la prueba t de student para muestras pareadas, y las diferencias de proporciones para las variables estrato socioeconómico y categoría de IMC se estudiaron con el estadístico X^2 de Pearson; cuando alguna celda tuvo un valor esperado menor de cinco se estimó el X^2 con corrección de Yates. Para el cálculo de la asociación del SOP con las características clínicas y fenotípicas se estimó el OR por medio de la prueba del X^2 de McNemar. En todos los análisis se asumió significancia estadística si el valor de probabilidad fue menor a 0,05.

RESULTADOS

En cuanto a las características basales de los grupos de estudio la edad promedio de los casos fue 23 ± 6 años y la de los controles 39 ± 18 años, diferencia estadísticamente significativa ($t = -6,00$, $p < 0,001$). El 54% de ambos grupos era de estratos socioeconómicos menores o iguales a tres ($X^2 = 0,366$; $p = 0,985$) y no se encontró diferencia significativa por categoría de IMC, pues el 38% de los casos y el 35% de los controles tenían IMC 25 ($X^2 = 2,743$; $p = 0,468$). Se encontró asociación significativa entre la presencia de acné y la frecuencia de presentación del fenotipo A (1) y el SPO (tabla 1).

Los polimorfismos del/ins e ins/ins de UCSNP-19 tuvieron las mayores proporciones en los dos grupos de estudio, siendo el primero el más frecuente en los casos y el segundo en los controles; sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (X^2 con corrección de Yates: $0,362$, $p = 0,835$) (tabla 2).

¹ Ver <http://www.gdb.org>

Tabla 1.
Distribución del acné y polimorfismos entre los casos de síndrome de ovario poliquístico y los controles en primer grado de consanguinidad

Variable	Caso expuesto		Caso no expuesto		OR* (IC 95% OR)
	Controles expuestos	Controles no expuestos	Controles expuestos	Controles no expuestos	
Acné	7	17	4	22	4,3- (1,4-17,4)
Caracterización fenotípica					
A	7	18	2	23	9,0 (2,2-79,9)
B	2	8	4	36	2,0 (0,5-9,1)
C	4	6	4	36	1,5 (0,4-7,2)

* McNemar Test.

Tabla 2.
Distribución del polimorfismo UCSNP-19 en 50 casos de SOP y 100 controles familiares

UCSNP-19	Casos		Controles	
	Número	%	Número	%
Del/Del	8	16,0	17	17,0
Del/Ins	22	44,0	48	48,0
Ins/Ins	20	40,0	35	35,0
Total	50	100,0	100	100,0

En este estudio se identificaron 14 alelos de D19S884 que van desde 215 a 242 bp. La distribución de los alelos en los casos y en los controles familiares se resume en la tabla 3, observándose que los más frecuentes fueron, en su orden: 225, 236 y 227, con valores casi idénticos en ambos grupos. Mientras que en los casos no se encontró el alelo 237, en los controles no estuvo presente el 238, sin embargo, estas diferencias entre los casos y sus controles no fueron estadísticamente significativas (X^2 : 10.244, $p = 0,674$).

DISCUSIÓN

Este estudio de casos y controles no encontró asociación entre el polimorfismo UCSNP-19 del gen CAPN10 y del marcador D19S994 con el SOP en la población estudiada. Varios reportes muestran

asociación entre variantes del gen CAPN10 y el SOP (5, 14-17). Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio son contradictorios con estos hallazgos, pero están de acuerdo con lo reportado por Márquez *et al.* (18), quienes no encontraron diferencia significativa en la distribución del genotipo UCSNP-19 del gen CAPN10 entre mujeres chilenas con el SOP y control. Además, solo encontraron asociaciones significativas entre la variante del gen calpaina 10 UCSNP-63 y algunos parámetros bioquímicos en mujeres con el SOP y controles.

Las bases genéticas del SOP todavía no se conocen muy bien, no obstante, se ha sugerido para su desarrollo una coexistencia entre factores ambientales y genéticos (14). Se ha insinuado asociación en la herencia de un haplotipo específico de los SNP (UCSNP-43, UCSNP-19 y UCSNP-63) del gen CAPN10 y un incremento en el riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo II en diferentes partes del mundo (6, 19); debido a la fuerte relación entre la diabetes y el SOP es factible pensar que los mecanismos involucrados sean similares.

En este estudio no se encontró diferencia en la distribución de los alelos D19S884 entre pacientes y sus controles familiares, este resultado concuerda con el encontrado por Villuendas *et al.* (20), quienes no encontraron ninguna diferencia en la distribución de 13 alelos del D19S884 entre pacientes y controles de España e Italia, considerándolos

independientemente o como un todo, concluyendo que no había asociación entre el marcador D19S884 y el SOP en mujeres procedentes de estos países (tabla 3). En el caso del citado estudio, los controles correspondieron a población sana sin manifestaciones bioquímicas de hiperandrogenismo. Igual característica compartieron los controles del presente estudio. Es posible que haber tomado los controles con alto grado de consanguinidad hubiera podido incrementar la presencia de los marcadores genéticos en estudio favoreciendo el no rechazo de la hipótesis nula.

Tabla 3.
Distribución de alelos de D19S884 en 50 casos de SOP y 100 controles familiares

D19S884	Casos 90 alelos		Controles 180 alelos	
	Número	%	Número	%
215	1	1,1	3	1,7
219	8	8,9	21	11,7
223	3	3,3	15	8,3
225	25	27,8	50	27,8
227	12	13,3	27	15,0
229	4	4,4	6	3,3
231	3	3,3	4	2,2
232	1	1,1	1	0,6
234	5	5,6	4	2,2
236	24	26,7	43	23,9
237	0	0,0	1	0,6
238	1	1,1	0	0,0
240	1	1,1	4	2,2
242	2	2,2	1	0,6
Total	90	100,0	180	100,0

CONCLUSIÓN

Después de analizar los resultados de este estudio de casos y controles pareados se puede concluir que no se encontró asociación entre el polimorfismo UCSNP-19 del gen CAPN10 y del marcador D19S994 con el SOP.

REFERENCIAS

1. Norman RJ, Dewailly D, Legro RS, Hickey TE. Polycystic ovary syndrome. *Lancet*. 2007;370:685-97.
2. Amato P, Simpson JL. The genetics of polycystic ovary syndrome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2004;18:707-18.
3. Carmina E. Genetic and environmental aspect of polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest*. 2003;26:1151-9.
4. Diamanti-Kandarakis E, Piperi C. Genetics of polycystic ovary syndrome: searching for the way out of the labyrinth. *Hum Reprod Update*. 2005;11:631-43.
5. Vollmert C, Hahn S, Lamina C, Huth C, Kolz M, Schöpfer-Wendels A, et al. Calpain-10 variants and haplotypes are associated with polycystic ovary syndrome in Caucasians. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;292:E836-44.
6. Horikawa Y, Oda N, Cox NJ, Li X, Orho-Melander M, Hara M, et al. Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet*. 2000;26:163-75.
7. Sorbara LR, Tang Z, Cama A, Xia J, Schenker E, Kohanski RA, et al. Absence of insulin receptor gene mutations in three insulin-resistant women with the polycystic ovary syndrome. *Metabolism*. 1994;43:1568-74.
8. Talbot JA, Bicknell EJ, Rajkhowa M, Krook A, Orahilly S, Clayton RN. Molecular scanning of the insulin receptor gene in women with polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81:1979-83.
9. Tucci S, Futterweit W, Concepcion ES, Greenberg DA, Villanueva R, Davies TF, et al. Evidence for association of polycystic ovary syndrome in Caucasian women with a marker at the insulin receptor gene locus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:446-9.
10. Urbanek M, Woodroffe A, McAllister J, Legro RS, Driscoll DA, Strauss JF, et al. Analysis of candidate gene region for polycystic ovary syndrome (PCOS) on Chr19p13. *Eur J Hum Genet*. 2001;9(Suppl 1):375.
11. Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks

- related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2004;81:19-25.
12. Balen AH, Laven JS, Tan SL, Dewailly D. Ultrasound assessment of the polycystic ovary: international consensus definitions. *Hum Reprod Update*. 2003;9:505-14.
 13. Salazar LA, Hirata M, Cavalli SA, Machado MO, Hirata RD. Optimized procedure DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. *Clin Chem*. 1998;44:1748-50.
 14. González A, Abril E, Roca A, Aragón MJ, Figueroa MJ, Velarde P, et al. CAPN10 alleles are associated with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:3971-6.
 15. Ehrmann DA, Schwarz PE, Hara M, Tang X, Horikawa Y, Imperial J, et al. Relationship of calpain-10 genotype to phenotypic features of polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:1669-73.
 16. González A, Abril E, Roca A, Aragón MJ, Figueroa MJ, Velarde P, et al. Specific CAPN10 haplotypes influence the clinical profile of polycystic ovary patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:5529-36.
 17. Wiltgen D, Furtado L, Kohek MB, Spritzer PM. CAPN10 UCSNP-43, UCSNP-19 and UCSNP-63 polymorphisms and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol*. 2007;23:173-8.
 18. Márquez J, Pacheco A, Valdés P, Salazar L. Association between CAPN10 UCSNP-43 gene polymorphism and polycystic ovary syndrome in Chilean women. *Clin Chim Acta*. 2008;398:5-9.
 19. Kang ES, Kim HJ, Nam M, Nam CM, Ahn CW, Cha BS, et al. A novel 111/121 diplotype in the Calpain-10 gene is associated with type 2 diabetes. *J Hum Genet*. 2006;51:629-33.
 20. Villuendas G, Escobar-Morreale HF, Tosi F, Sancho J, Moghetti P, San Millán JL. Association between the D19S884 marker at the insulin receptor gene locus and polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2003;79:219-20.

Conflicto de intereses: ninguno declarado.