

UCH-FC  
Biotecnología  
D932  
E.1



**SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO: RELACIÓN ENTRE EL  
POLIMORFISMO CYP 17 Y REPETICIONES CAG DEL RECEPTOR DE  
ANDRÓGENOS CON PERFIL HORMONAL Y METABÓLICO”**

Seminario de Título

entregado a la

Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al título de

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**

**CRISTÓBAL ANDRÉS DÜNNER MOSCA**

Director de Seminario de Título : Dra. Teresa Sir Petermann

Co-director de seminario de Título : Dr. Francisco Antonio Pérez-Bravo.



Octubre, 2007

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile que el Seminario de Título presentado por la alumno

**CRISTÓBAL ANDRÉS DÜNNER MOSCA**

ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación del Seminario de Título

como requisito para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Director de Seminario de Título: Dra. Teresa Sir-Petterman

Co-Director de Seminario de Título: Francisco Pérez-Bravo

Profesor Patrocinante: Prof. Madeleine Lambrot Chastia

Comisión de evaluación de Seminario de Título:

Dra. Margarita Vega

Prof. Madeleine Lambrot Chastia



## AGRADECIMIENTOS

Quisiera manifestar mi más sincero agradecimiento a todos aquellos que hicieron posible la realización de este seminario de título. A mis profesores tutores Dr. Francisco Pérez Bravo y Dra. Teresa Sir Petermann por su gran disposición a instruirme y abrirme las puertas de su laboratorio. También a mis compañeros del laboratorio de endocrinología de la Facultad de Medicina, Manuel Maliqueo y Bárbara Echiburú por su apoyo y colaboración en la corrección de este trabajo. En especial a mis padres, hermanas, abuelos y Erika, ya que sin ellos este gran paso no habría sido posible. A mis compañeros de la carrera de biotecnología, quienes me acogieron estos años con todo el apoyo necesario, especialmente, a Sebastián Rojas, Iván Valic, Carolina Carriel, Fredy Meza y José Lois.

Sin duda, mi paso por la Universidad no hubiera sido lo mismo sin los grandes amigos que encontré y con los que compartimos momentos inolvidables, gracias a todos ellos por su cariño y confiar en mi.

Mi agradecimiento más profundo, nuevamente, a mis abuelos y padres quienes me ha entregado todo su amor y me han brindado las herramientas para que hoy sea un profesional.



## RESUMEN:

El polimorfismo CAG en el exón 1 del receptor de andrógenos (RA), se ha estudiado como un posible defecto genético del síndrome de ovario poliquístico (SOP). En algunos estudios se ha descrito una relación inversa entre el número de repeticiones CAG y la expresión de la actividad del receptor. A su vez el gen CYP17 también ha sido relacionado con el síndrome de ovario poliquístico, ya que codifica para enzimas claves que participan en pasos limitantes en la ruta metabólica para la producción de andrógenos.

En el presente estudio se evaluó un grupo de mujeres chilenas con SOP y controles entre 14 y 36 años, con el propósito de determinar la relación entre el número de repeticiones CAG y las características metabólicas y hormonales del SOP. Además, se evaluó la variante T→C del gen CYP17, con el propósito de establecer un haplotipo (repeticiones CAG y CYP17) como posible marcador de riesgo en el SOP.

Las pacientes SOP y con menor número de repeticiones CAG (<10), y el genotipo A2/A2 presentaron valores antropométricos superiores, con un mayor IMC, ICC y diámetro de cintura. También estas pacientes fueron más insulino resistentes, que las pacientes con otros genotipos para CYP17 y con mayor número de repeticiones, lo cual fue establecido mediante HOMA-IR e ISI-composite.

En el caso de las repeticiones CAG no se encontró diferencias significativas en relación al menor número de repeticiones y las hormonas androgénicas, pero se podría sugerir que habría un efecto de los andrógenos libres sobre el tejido adiposo de estas mujeres, lo que conduciría a una mayor resistencia a insulina. Por otro lado el polimorfismo de CYP17 provocaría un aumento en la producción de andrógenos en el tejido adiposo propiamente tal, lo cual podría contribuir a la resistencia insulínica.

Si bien no se ha podido determinar la causa específica que provoca este síndrome, nosotros podemos sugerir que hay un efecto no sinérgico de ambos polimorfismos sobre la resistencia a la insulina, lo cual podría agravar el síndrome.

## ABSTRACT:

CAG polymorphism in exon 1 of androgen receptor (AR) has been studied as a possible genetic defect of PCOS. Some studies have described an inverse relationship between the number of CAG repeats and sensitivity of the receptor. In turn the gene CYP17 also has been linked to polycystic ovary syndrome, and coding for key enzymes involved in limiting step in the metabolic pathway for the production of androgens.

The present study evaluated a group of Chilean women with PCOS and controls between 14 and 36 years, with the aim of determining the relationship between the number of repeat CAG and the metabolic and hormonal characteristics of PCOS. In addition, assessed C→ T variant gene CYP17, with the aim of establishing a haplotype (CAG repeats and CYP17) as a potential marker of risk in the SOP.

Patients with PCOS and smaller number of CAG repeats (<10), and genotype A2/A2 presented anthropometric values higher, with a higher body mass index (BMI), waist to hip index (WHI) and waist diameter. These patients also were more insulin resistant, that the patients with other genotypes for CYP17 and greater number of repetitions, which was established by HOMA-IR and ISI-composite.

In the case of CAG repeats was not found significant differences in relation to fewer repeated and androgenic hormones, but it might suggest that there would be an effect of androgen on adipocyte tissue of these women, leading to greater resistance to insulin. Moreover polymorphism of CYP17 leads to a rise in the production of androgens in the adipose tissue itself, which could contribute to insulin resistance.

While unable to determine the specific cause that leads to this syndrome, we can suggest that there is a synergistic effect of both polymorphisms on insulin resistance, which could aggravate the syndrome.

## BIOGRAFIA



### Datos personales

---

- Nombre: Cristóbal Dünner Mosca.
- Fecha de Nacimiento: 18 julio de 1979
- Cédula de Identidad: 15.385.819-5
- Edad: 28 años
- Nacionalidad: Chilena
- Estado Civil: Soltero
- E-mail: cristobaldunner@gmail.com

### Antecedentes Académicos

---

- Enseñanza básica: Primero a octavo básico. Colegio Notre Dame, Santiago de Chile.
- Enseñanza Media: The Antofagasta British School.
- Tecnología medica: Universidad de Antofagasta (un semestre) 1998.
- Estudios superiores: Licenciado en Bachillerato en Ciencias Naturales y Exactas. Universidad de Chile en el 2001. Con distinción.
- Trabajo en laboratorio de fisiología vegetal, Universidad de Chile: Búsqueda de genes vegetales ortólogos del complejo Exocyst de *Saccharomyces cerevisiae* 2005.
- Unidad de investigación: Patrón cromatográfico de azúcares y polifruktanos en *Aloe Vera* regada con agua vitalizada. Primavera 2006.
- Presentación oral congreso de Endocrinología y Diabetes SOCHED 2007.
- Estudios Superiores: Licenciado en Biotecnología Molecular Universidad de Chile 2007.

## GLOSARIO

**Correpresor:** suele ser el producto de una ruta biosintética, o una molécula, las que se activan y adquieren su capacidad funcional, y es entonces cuando reprimen al operón estructural.

**DBD:** Dominio de unión a DNA.

**DHEAS:** Dehidroepiandrosterona sulfato.

**HRE:** Elementos de respuesta hormonal secuencias de ADN que regulan la transcripción como "enhancers" en forma de homo o heterodímeros, activando la expresión génica.

**HDL:** Lipoproteína de alta densidad.

**HOMA:** Modelo de variación homeostática.

**ICC:** Índice cintura- cadera

**IMC:** Índice de masa corporal.

**ISI:** Índice de sensibilidad a la insulina

**LBD:** Dominio de unión a ligando.

**LDL:** Lipoproteína de baja densidad.

**LH:** Hormona luteinizante.

**NTD:** Dominio N terminal.

**Polimorfismo CAG:** Repeticiones en tandem de codones CAG en el exón 1 del receptor androgenico.

**PRL:** Hiperprolactinemia

**RA:** Receptor de andrógenos.

**RI:** Resistencia a insulina, es una condición en la cual el cuerpo tiene problemas para responder a esta hormona, lo que aumenta las probabilidades de desarrollar diabetes tipo 2 y enfermedades del corazón.

**SHBG:** Hormona sexual de unión a globulina.

**Síndrome de Cushing:** El síndrome de Cushing es una afección que resulta del exceso de hormona cortisol, una hormona producida por las glándulas suprarrenales. La causa más común del síndrome de Cushing es la enfermedad de Cushing, provocada por la excesiva producción de la hormona adrenocorticotropica (ACTH) por parte de la glándula pituitaria la que estimula a las glándulas suprarrenales para producir cortisol.

## INDICE DE CONTENIDO

1. Introducción.....	12
1.1 Posibles genes involucrados en SOP.....	14
1.2. Receptor Androgénico humano.....	15
1.2.1 Mecanismo de acción del Receptor de Andrógenos (RA).....	17
1.2.2 Repeticiones CAG.....	18
1.3 Hipótesis.....	19
1.4 Objetivos.....	19
1.4.1 Objetivo general.....	19
1.4.2 Objetivos Específicos.....	19
2. Metodología.....	20
2.1 Diseño de estudio .....	20
2.2 Sujetos y métodos.....	20
2.2.1 Caracterización de las pacientes.....	20
2.2.2 Participantes del estudio.....	20
2.3 Tamaño de la muestra.....	20
2.4 Mediciones Antropométricas.....	21
2.4.1 Índice de masa corporal.....	21
2.4.2 Índice cintura –cadera.....	22
2.5 Mediciones bioquímicas.....	22
2.5.1 Prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO).....	22
2.5.2 Criterios para diabetes 2 e intolerancia a la glucosa.....	22
2.5.2.1 Intolerancia a la glucosa.....	22
2.5.2.2 Diabetes.....	23
2.5.3 Estudio de insulino resistencia .....	23
2.5.3.1 Concentración sérica de SHBG.....	23

2.5.3.2 Modelo de valoración homeostática .....	23
2.5.3.3 Índice de sensibilidad a la insulina (ISI) .....	23
2.6 Determinaciones hormonales .....	24
2.6.1 RIA de SHBG.....	24
2.6.2 RIA Insulina.....	24
2.6.3 RIA Testosterona, DHEA-SO <sub>4</sub> y 17-OHP.....	24
2.6.4 Perfil lipídico.....	25
2.7 Metodología molecular.....	26
2.7.1 Extracción de DNA.....	26
2.7.2 Polimorfismo -34pb CYP17.....	26
2.7.3 Genotipificación del receptor de andrógenos (RA).....	27
2.7.3.1 PCR-FAM de muestras del RA.....	28
2.7.3.2 Geles de acrilamida.....	30
2.7.4 Análisis de repeticiones.....	31
2.8 Análisis estadístico.....	32
3 RESULTADOS.....	33
3.1 Características clínicas y metabólicas del grupo de pacientes con SOP y mujeres controles.....	34
3.2 Distribución del número de repeticiones CAG.....	35
3.3 Frecuencias de CYP17 para pacientes con SOP y controles.....	37
3.3.1 Frecuencia genotípica para CYP17.....	38
3.4 Características antropométricas de mujeres con SOP y grupo control según genotipos de CYP17.....	39
3.5 Características hormonales de mujeres con SOP según el genotipo de CYP17.....	40
3.6 Características antropométricas de mujeres con SOP y grupo control, según el número de repeticiones CAG del RA.....	41
3.7 Características hormonales de mujeres con SOP según el número de repeticiones CAG del RA.....	42

3.8 Perfil lipídico de mujeres con SOP y controles según genotipos de CYP17.....	43
3.9 Perfil lipídico de mujeres con SOP y controles, según el número de repeticiones CAG del RA .....	44
4.0 Características bioquímicas de mujeres con SOP y grupo control según el genotipo de CYP17.....	45
4.1 Características bioquímicas de mujeres con SOP y grupo control, según el número de repeticiones CAG.....	46
5. Discusión.....	47
6. Conclusión.....	52
7. Bibliografía.....	53

## INDICE DE TABLAS

Tabla1a. Características clínicas de mujeres controles y portadoras de SOP .....	33
Tabla1b. Características metabólicas de mujeres controles y portadoras de SOP.....	34
Tabla 2. Frecuencia para el número de repeticiones CAG del RA.....	35
Tabla3a. Frecuencias genotípicas esperadas y observadas para el grupo de mujeres con SOP .....	37
Tabla 3b. Frecuencias genotípicas esperadas y observadas para el grupo de mujeres controles.....	37
Tabla 4. Frecuencia genotípica para CYP17 .....	38
Tabla 5. Características antropométricas de mujeres con SOP y grupo control, según el genotipo de CYP17 .....	39
Tabla 6. Características hormonales de mujeres con SOP según el genotipo de CYP17. ....	40
Tabla 7. Características antropométricas de mujeres con SOP según número de repeticiones CAG.....	41
Tabla 8. Características hormonales de mujeres con SOP según número de repeticiones CAG.....	42
Tabla 9. Perfil lipídico de mujeres con SOP y controles según el genotipo de CYP17....	43
Tabla 10. Perfil lipídico de mujeres con SOP según número de repeticiones CAG.....	44
Tabla 11. Características bioquímicas de mujeres con SOP y grupo control según el genotipo de CYP17.....	45
Tabla 12. Características bioquímicas de mujeres con SOP y grupo control, según el número de repeticiones CAG del AR.....	46

## 1. Introducción

El síndrome de ovario poliquístico (SOP), es uno de los desórdenes endocrino-metabólicos más frecuentes en las mujeres premenopáusicas y está caracterizado principalmente por la presencia de anovulación crónica e hiperandrogenismo. Además, la mayoría de estas pacientes presentan hiperinsulenemia, dislipidemia y obesidad. (Legro et al. 2001)

La agregación familiar en el SOP es frecuente, lo que sugiere una etiología presenta un fuerte componente genético (Franks S et al. 1998, Legro RS et al. 1998), sin embargo, la determinación de su forma de herencia ha sido difícil de establecer debido a la heterogeneidad del síndrome y a la ausencia del fenotipo masculino. Por otra parte, la compleja fisiopatología de este síndrome sugiere la coexistencia de al menos dos alteraciones genéticas implicadas en la expresión del síndrome (Sir Petermann et al. 2001). Por lo general las manifestaciones clínicas comienzan en el periodo premenárquico con la aparición de alteraciones menstruales tales como oligomenorrea, amenorrea y metrorragia disfuncional, entre otras. Además, pueden observarse manifestaciones de hiperandrogenismo tales como acné, alopecia androgénica e hirsutismo (Sir- Peterman et al. 2001) y también anovulación e infertilidad.

Debido a la heterogeneidad de las manifestaciones clínicas ha sido difícil llegar a un consenso en cuanto al diagnóstico de este síndrome, sin embargo se han establecido dos definiciones comúnmente utilizadas. La primera de ellas fue establecida en 1990 por la National Institute of Child Health and Human Development (NIH), en la cual se incluyeron los siguientes criterios (en orden de importancia): 1) Hiperandrogenismo y/o hiperandrogenemia, 2) anovulación 3) Exclusión de otros desórdenes conocidos, tales como síndrome Cushing, hiperprolactinemia, hiperplasia congénita (CAH). La segunda, establecida en Rotterdam el año 2003 por la European Society for Human Reproduction and Embriology y The American Society for Reproductive Medicine donde se señaló que el SOP puede ser diagnosticado, luego de excluir otros desórdenes relacionados, presentándose dos de las tres características: 1) Oligo o anovulación, 2) Manifestaciones Clínicas y/o bioquímicas de hiperandrogenismo, 3) Ovarios poliquísticos detectados mediante ultrasonografía. (Ricardo Azziz, 2006).

La fisiopatología del SOP en algunos casos involucra tres tipos de alteraciones relacionadas entre sí: una disfunción neuroendocrina caracterizada por una hipersecreción de Hormona Luteinizante (LH), un trastorno metabólico determinado por la presencia de Insulino Resistencia (IR) e hiperinsulinemia y una disfunción de la esteroidogénesis y foliculogénesis ovárica.

Un 50% -70% de mujeres con SOP presentan insulino- resistencia (IR), la cual ha sido relacionada con el hiperandrogenismo (Matthias Möhling et al. 2006). La insulina actúa sinérgicamente con la LH para aumentar la producción de andrógenos en las células de la teca. Al mismo tiempo, la insulina inhibe la síntesis hepática de hormona sexual de unión a globulinas (SHBG), una proteína clave que se une a la testosterona, resultando en el aumento de los niveles de andrógenos libres (David A.Ehrmann, 2005).

Finalmente, la disfunción de la esteroidogénesis y foliculogénesis ovárica se caracteriza por una excesiva producción de andrógenos por la teca de los folículos ováricos (Gilling-Smith et al. 1994). La disfunción ovárica sería clave en el SOP y se trataría probablemente de una disfunción intrínseca genéticamente determinada, la cual podría ser amplificada por el exceso de LH e insulina o por los propios andrógenos los que, en conjunto con factores paracrinos locales, alteran el desarrollo folicular.

### **1.1. Posibles genes involucrados en SOP:**

Si bien distintos genes han sido estudiados para intentar explicar la etiología del síndrome de ovario poliquístico, varios estudios se han enfocado principalmente en aquellos implicados en la ruta biosintética de andrógenos, dado que el hiperandrogenismo se muestra como una de las anomalías bioquímicas más frecuentes del SOP. Sin embargo, no se ha descartado la participación de otros genes, como los involucrados en la señalización insulínica y los de inflamación crónica (Escobar-Morreale, 2005).

Dentro de los genes relacionados a la esteroideogénesis adrenal y ovárica se encuentra el gen CYP11a que codifica para la enzima que participa en la conversión de colesterol a progesterona, la side chaine cleavage (SSC) (Granari et al 1997). Otro gen candidato es CYP21, el cual codifica para la enzima 21 hidroxilasa, cuya deficiencia produce la enfermedad hiperplasia adrenal congénita, que causa una acumulación de los niveles de la 17-hidroxiprogesterona sérica. En mujeres con SOP se ha observado la acumulación de 17-hidroxiprogesterona, sin embargo no se ha encontrado una asociación clara entre el genotipo CYP21 y el origen del exceso de andrógeno (Escobar-Morreale et al. 1999).

Por su parte el gen CYP19 codificante para el citocromo p450arom, perteneciente al complejo enzimático aromatasa, también se ha asociado la presencia de SOP e hiperandrogenismo. Evidencia de lo anterior ha sido la presencia de este defecto en un número importante de mujeres hiperandrogénicas (A.J.Jakimiuk et al.1998).

Por otra parte, el gen CYP17 podría ser un buen candidato, ya que controla uno de los pasos limitantes en la ruta biosintética androgénica ovárica. Este gen codifica para la enzima P450c17 $\alpha$  que posee actividad 17 $\alpha$ -hidroxilasa y 17,20 liasa. Esta enzima participa en la conversión de progesterona y pregnenolona en 17-hidroxiprogesterona y 17-hidroxipregnenolona, respectivamente, y la de estos esteroides a dihidroepiandrosterona (DHEA) y androstenediona con su actividad 17,20 liasa (Chanley M. Small et al. 2005). Un estudio relativamente reciente establece que mujeres con hiperandrogenismo presentan un aumento de la actividad de la enzima P450c17 $\alpha$  y más aún, se ha observado que el incremento en la expresión y actividad de esta enzima en la célula de la teca ovárica estaría asociado a un aumento en la actividad transactivacional del promotor de CYP17

(J.K. Wickenheisser et al. 2000). Se ha propuesto un polimorfismo correspondiente a una sustitución T→C en la región promotora del gen CYP 17 a -34 pb del inicio de la traducción, podría conferir hiperactividad de esta enzima. En un estudio realizado en una población griega no se observó diferencias en la frecuencia de este polimorfismo entre mujeres con SOP y controles. Sin embargo, solo el grupo con SOP presentaron el alelo A2/A2, por lo cual se propuso que este polimorfismo podría afectar al fenotipo, agravando el cuadro clínico del hiperandrogenismo con un nivel de testosterona mayor (Diamanti-Kandarakis et al. 1999). Sin embargo, un estudio de nuestro grupo encontró una fuerte asociación entre este polimorfismo y la RI, y no sobre el hiperandrogenismo como fue descrito anteriormente.

### **1.2. Receptor de Andr6genos humano:**

El receptor androgénico humano (RA) forma parte de los cuatro receptores esteroidales junto con el de estr6geno (RE), glucocorticoides (RG), mineralocorticoides (RM) y progesterona (PR), que se encuentran estrechamente relacionados entre sí. Esta relación se debe a su habilidad para activar la transcripción de los genes "target" a través del reconocimiento de secuencias de DNA específicas conocidas como elementos de respuesta hormonal (HREs), así como también a la homología en sus secuencias.

Específicamente el RA pertenece a la familia de factores de transcripción nucleares que incluye al receptor de estr6genos (RE), receptores de hormona tiroidea (TR $\alpha$  y TR $\beta$ ), receptor de vitamina D, entre otros. Al igual que el resto de los miembros de esta familia el receptor androgénico (RA) formaría un complejo hormona-receptor que actúa directamente con los genes "target" regulando así su transcripción (Rennie et al. 1993).

En cuanto al gen que codifica para el receptor androgénico se sabe que está localizado en el cromosoma X, específicamente en el brazo largo (Xq11-12) y se extiende alrededor de 75-90 Kb del DNA genómico (Charmian A. Quigley et al 1995). La secuencia de cDNA posee un marco de lectura abierto de 2751 nucle6tidos codificantes para una proteína de 917 aminoácidos (Gelman P. 2002).

La región codificante de la proteína consta de 8 exones (Trapman J, 1998) y la proteína en sí está constituida por tres dominios funcionales: un dominio de unión a ligando (LBD), un dominio de unión a DNA (DBD) y un dominio N-terminal (NTD). El dominio de unión a ligando (LBD) es codificado por el exón 4 al 8, comprendiendo aproximadamente entre 670-919 residuos. Dicha secuencia aminocídica presenta alrededor de un 50 % de homología con los correspondientes residuos de los receptores GR, MR y PR, sin embargo muestran la misma estructura constituida por 12 hélices y una pequeña hélice  $\beta$ -plegada. La principal característica y función de este dominio sería la especificidad y la alta afinidad de unión a andrógenos respectivamente (Charmian A. Quigley et al 1995- M. Matias et al.2000).

Por otra parte, la región central de la proteína (DBD) contiene aproximadamente 70 aminoácidos (559-624) que son codificados por los exones 2-3, y es la región mejor conservada entre los receptores de hormonas esteroidales. Esta región incluye ocho residuos de cisteínas que forman dos complejos de coordinación, cada uno compuesto de cuatro cisteínas y un ion de zinc ( $Zn^{+2}$ ). Estos dos dedos de zinc forman la estructura que se une a la mayor parte del DNA. (Schoenmakers et al. 1999)

En tanto el dominio N terminal (o de transactivación) es codificado por el exón 1 y comprende la mayor parte de la proteína, y se ha determinado que es una de las regiones que presentaría menor homología y más variabilidad en tamaño con respecto a los otros receptores esteroidales. Un polimorfismo VNTR (número variable de repetidos en tandem) compuesto de repeticiones CAG codifican para una cadena de poliglutaminas las cuales se han relacionado con la sensibilidad androgénica.

### 1.2.1. Mecanismo de acción del Receptor de Andr6genos (RA):

El mecanismo de acci3n molecular para producir la respuesta androg6nica, se inicia cuando difunde la testosterona dentro de la c3lula blanco, lo que ocasiona el desplazamiento de la prote3na inhibitoria (perteneciente a la familia de las p160) que se encuentra unida al receptor androg6nico, permitiendo de esta forma la uni3n de la testosterona a la prote3na del RA intracelular. Esta uni3n de tipo receptor-ligando provoca un cambio conformacional en el RA que facilita su dimerizaci3n y la posterior interacci3n del complejo receptor-ligando con secuencias de DNA (Elementos de respuesta hormonal, HREs). Seg3n Jeremy M. Berg et al. 1989 estas secuencias consensos ser3an palindr3micas, lo cual sugiere que cada sitio es reconocido por ambos d3meros en el dominio de uni3n a DNA. Luego en la regi3n activadora del receptor se le une un coactivador como ARA 70, SRC-1, SRC-2, culminando con la regulaci3n de la transcripci3n de los genes "target", produciendo un efecto androgenico como se muestra en la figura 1 (Carmian A. Quigley et al 1995).

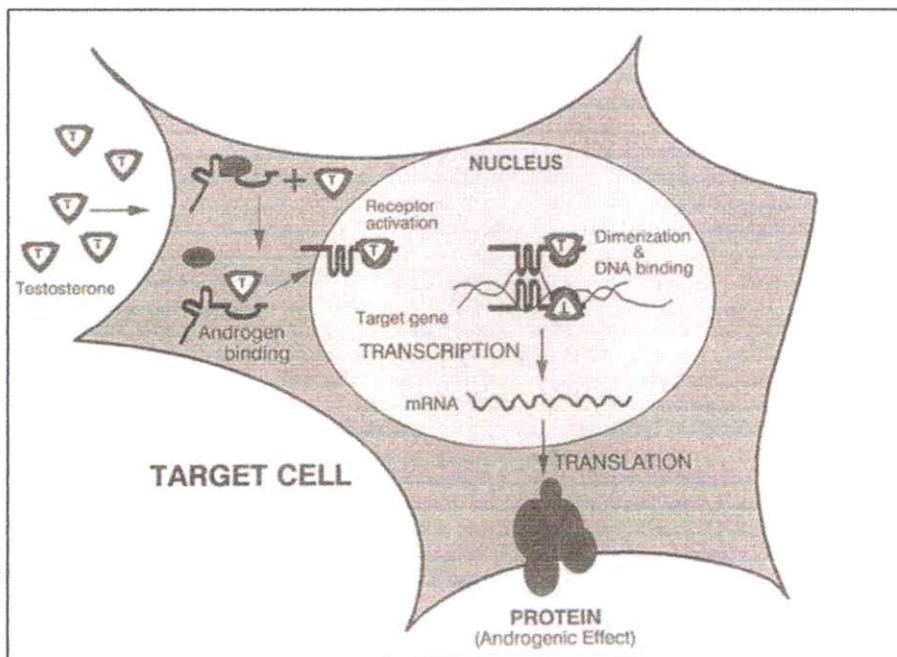


Fig 1. Mecanismo de acci3n del RA. Charmian et al 1995.

### **1.2.2. Repeticiones CAG:**

Estudios en humanos han sugerido que la variabilidad en la sensibilidad a andrógenos depende de la actividad del receptor de andrógenos, la cual se ha relacionado con el número de repeticiones CAG (Beilin et al. 2000). Diversos estudios han apuntado a una relación inversa del número de repeticiones con la sensibilidad del receptor. Sin embargo, en otros trabajos no han encontrado asociación entre el largo de repeticiones CAG en el gen del RA y la hipersensibilidad a andrógenos (Vottero et al.2006).

Esta región altamente polimórfica presenta diferentes tamaños debido a que ocurre un "slippage" o deslizamiento de la DNA polimerasa sobre el DNA templado, resultando en la variación numérica final de repetidos CAG copiados durante la replicación (Germann 2002). Estudios a nivel poblacional demostraron que el número de repetidos varía con la etnia y/o raza, con promedio un de 21 repeticiones para un grupo de hombres blancos (caucásicos) en comparación con 18 repeticiones para hombres negros (americanos) y 22 repeticiones para varones asiáticos (Edwards et al. 1992).

En otro estudio realizado por Hickey et al. (2002), el rango de repeticiones CAG en un grupo de mujeres jóvenes infértiles con SOP y mujeres sanas (fértils) fue de 8 a 32 y 14 a 30 repeticiones respectivamente. En el caso de un grupo de mujeres finlandesas con SOP y sanas el numero promedio de repeticiones es de  $21 \pm 2$  repeticiones CAG para ambos grupos (Jääskeläinen et al.2005). También se ha observado que hay alrededor de 20 diferentes tamaños de alelos para un grupo de mujeres, con resultados similares realizados en una población japonesa (Kenji Fujii et al. 2003).

Otro estudio en mujeres con SOP y mujeres controles con ciclos regulares, mostró una frecuencia alélica de 12,7%, 67,9% y 19,3% para las mujeres con SOP y 14,7%, 71,4% y 13,8% para mujeres controles. El rango de repeticiones CAG en las mujeres controles fue 19 a 29 y 13 a 29 en mujeres con SOP, para el mismo estudio. (Jääskeläinen et al.2005).

Debido a estos antecedentes se pretende relacionar el número de repeticiones CAG del RA, con características metabólicas, hormonales en mujeres con SOP. Además se evaluara la interacción con el polimorfismo del promotor de CYP17.

### **1.3. HIPÓTESIS**

Un menor número de repeticiones CAG del receptor de andrógenos se asocia a un mayor número de alteraciones metabólicas y hormonales lo que se relacionaría con la predisposición a desarrollar síndrome de ovario poliquístico. La cual se modificaría de acuerdo a la sustitución C→T en CYP 17.

### **1.4. OBJETIVOS**

#### **1.4.1. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la frecuencia y distribución de dos marcadores genéticos asociados al SOP: a) la variante -34bp de CYP17 y b) las repeticiones CAG del RA, en un grupo de mujeres chilenas y estimar su asociación con características hormonales y metabólicas del Síndrome de Ovario Poliquístico.

#### **1.4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Analizar la distribución de repeticiones CAG en el RA y la frecuencia genotípica y alélica de CYP 17 en pacientes SOP y mujeres controles.
- 2) Estandarizar una técnica confiable para la asignación de repeticiones CAG y estudiar la distribución de repeticiones CAG del RA y observar la relación con el marcador CYP17.
- 3) Asociar cada marcador genético con características metabólicas y hormonales en mujeres controles y con SOP.
- 4) Establecer un haplotipo (repeticiones CAG y CYP17) como posible marcador de riesgo en el SOP.

## **2. METODOLOGÍA**

### **2.1. DISEÑO DEL ESTUDIO:**

El presente estudio está planteado como un estudio de caso-control, de mujeres con SOP y mujeres sanas. El estudio forma parte de uno de los objetivos específicos del proyecto Fondecyt 1071007.

### **2.2. SUJETOS Y MÉTODO:**

#### **2.2.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS PACIENTES:**

Las mujeres con SOP y las del grupo control que cumplieron con los criterios de inclusión fueron entrevistadas. Durante la entrevista se les informó sobre la naturaleza del estudio. En aquellas que desearon ingresar en forma voluntaria al estudio, se les efectuó examen físico general; se llenó una ficha especialmente diseñada y se les dio información para firmar el consentimiento informado correspondiente al Proyecto. El estudio genético se realizó en el laboratorio de Epidemiología nutricional y genética del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), de la Universidad de Chile. Los recursos corresponden al proyecto Fondecyt 1071007.

#### **2.2.2. PARTICIPANTES DEL ESTUDIO**

Se estudiaron pacientes de sexo femenino, entre 14 y 36 años, portadoras de SOP y sanas, previa información detallada y consentimiento escrito. Las pacientes fueron catalogadas como portadoras de SOP según el criterio NIH internacionalmente descrito:

- Alteraciones del ciclo menstrual
- oligomenorrea u amenorrea: con menos de 8 ciclos menstruales por año y sin menstruación por más de 3 meses respectivamente.
- anovulación crónica (Progesterona día 22 < 4 ng/ml en oligomenorreicas).
- Signos clínicos de hiperandrogenismo (hirsutismo, acné).
- 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 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 mostró alguna deficiencia como hiperprolactinemia, presencia de tumores secretores de andrógenos, síndrome de Cushing y bloqueo de la 21-hidroxilasa. En ambos grupos de mujeres se evaluó tolerancia a la glucosa, RI y secreción de insulina.

### **2.3. TAMAÑO DE LA MUESTRA:**

Una muestra superior a 72 personas en cada uno de los grupos descritos sería suficiente para encontrar diferencias significativas entre los dos grupos, con respecto al polimorfismo CYP17, con un nivel de confianza de 90% y una amplitud del intervalo de confianza de 0,25 (Hulley 1988). Se analizaron 100 muestras de DNA, de mujeres con síndrome de ovario poliquístico y 87 muestras de DNA de mujeres controles, para el cálculo de frecuencias. 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. Las mujeres controles sanas, fueron reclutadas de las mismas áreas geográficas.

### **2.4. MEDICIONES ANTROPOMÉTRICAS**

#### **2.4.1. INDICE DE MASA CORPORAL (IMC):**

El IMC es un índice para la relación peso-tamaño, comúnmente utilizado para clasificar el sobrepeso y obesidad en adultos. Este se calcula como el peso (kilogramos) dividido por el tamaño al cuadrado (metros), ( $\text{Kg/m}^2$ ).

La clasificación del sobrepeso y obesidad, de acuerdo al IMC. La obesidad está clasificada como un  $\text{IMC} \geq 30$ . 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).

#### **2.4.2. INDICE CINTURA-CADERA (ICC):**

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  $\geq 0.85$ .

### **2.5. MEDICIONES BIOQUÍMICAS**

#### **2.5.1. 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 75 grs. de glucosa disuelta en 250-300 ml de agua fría; posteriormente, se tomaron muestras de 5 ml de sangre a los 30, 60, 90 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 ensayo inmunométrico (IRMA).

#### **2.5.2. CRITERIOS PARA DIABETES 2 E INTOLERANCIA A LA GLUCOSA:**

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

##### **2.5.2.1. INTOLERANCIA A LA GLUCOSA:**

Glicemia en ayunas  $> 100$  mg/dl y/o glicemia a las 2 h post-carga  $> 140$  mg/dl  $< 200$  mg/dl.

#### 2.5.2.2. DIABETES:

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

#### 2.5.3. ESTUDIO DE INSULINO RESISTENCIA:

##### Medición de insulino resistencia:

Se realizó mediante la medición de la Insulina basal > a 12.5  $\mu$ UI / ml e insulina a los 120 min > 60  $\mu$ UI / ml, HOMA IR >2.0, ISI <4.0. De acuerdo a valores establecidos en nuestro laboratorio. (Sir-Petermann 2002).

2.5.3.1. Concentración sérica de SHBG entre 30 a 87 nmol/l (Sir-Petermann 2002).

2.5.3.2. Modelo de valoración homeostática (HOMA<sub>IR</sub>): 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 et al. 1985):

$$\text{HOMA}_{\text{IR}} : \text{Insulina en ayunas } (\mu\text{U/ml}) \times \text{Glicemia en ayunas } (\text{mmol/l})$$

#### 22.4

Se considero a los pacientes como insulino resistente cuando el valor del HOMA es > 2.0.

2.5.3.3. Índice 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. Se considero a los pacientes como insulino resistente cuando el valor del ISI es  $< 4.0$ .

**10000**

ISI: \_\_\_\_\_

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

FPG: glucosa plasmática en ayunas (mg/dl)

FPI: insulina plasmática en ayunas ( $\mu$ U/ml).

## **2.6. DETERMINACIONES HORMONALES**

**2.6.1. IRMA 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.

**2.6.2. 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.

**2.6.3. RIA Testosterona, DHEA-SO<sub>4</sub> 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-SO<sub>4</sub> y; 7.1 y 7.3 % para 17-OHP; respectivamente.

**2.6.4. Perfil lipídico:** El perfil lipídico fue determinado por ensayos colorimétricos estandarizados (Photometric Instrument 4010; Roche, Basel, Switzerland). Por su parte la concentración del serum LDL-C (low density lipoprotein cholesterol) fue calculado por la fórmula de Friedewald's [ $LDL-C = Total\ Cholesterol - HDL-Cholesterol - (Triglycerides/5)$ ].

Las mediciones antropométricas, bioquímicas y determinaciones hormonales fueron realizadas en el laboratorio de endocrinología de la Facultad de Medicina. Se utilizó la base de datos con estas mediciones para realizar este estudio.

## 2.7. METODOLOGIA MOLECULAR

### 2.7.1. EXTRACCIÓN DE DNA

De cada individuo se obtuvo aproximadamente 3 mL de sangre periférica la cual, (obtenidas desde el centro hospitalario San Juan de Dios, Santiago de Chile), fue centrifugada y separado el suero de las partículas en suspensión. Se almacenaron 500 µL del suero de cada muestra para posteriores análisis, mientras que las células precipitadas (linfocitos) fueron sometidas al proceso de extracción de DNA genómico con el método de Chomezynski.

### 2.7.2. POLIMORFISMO -34pb CYP17

El DNA genómico se extrajo mediante el método de Chomezynski (Winkler, Santiago, Chile). Para la determinación del polimorfismo en la región promotora del gen CYP17 se realizó un PCR amplificando las zonas flanqueantes al sitio donde se localiza la sustitución T→C en la región -34 pb de CYP17. Se utilizaron los siguientes partidores:

CYP17 (*Sense*): 5'- CAT TGG CAC TCT GGA GTC - 3

CYP17 (*Antisense*): 5'- AGG CTC TTG GGG TAC TTG - 3

La reacción de PCR se realizó en las siguientes condiciones para un volumen final de 20 µl: 80 ng de DNA genómico, 10 pmoles de cada primer (Invitrogen), 100 µM de cada deoxinucleótido (dNTP) (Invitrogen), 50 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 1 U de Taq polimerasa y PCR 10X (Invitrogen). En 35 ciclos constituidos por: 1 minuto de denaturación a 94°C, 1 minuto de alineamiento a 57°C y una extensión a 72°C por un minuto, finalizando con un ciclo de extensión a 72°C por 10 minutos. El producto de amplificación fue visualizado en gel de agarosa al 2% (Winkler), (Diamanti-Kandarakis et al. 1999). La banda de 459 pb corresponde al fragmento amplificado de la región promotora del gen CYP17, como se muestra en la fig. 2A. Por su parte, el protocolo de RFLPs se realizó en geles de agarosa al 3% como se muestra en la fig 2B el fragmento de 459 pb que contiene el sitio de transición T → C, resultando en el alelo A2.

Figura 2.

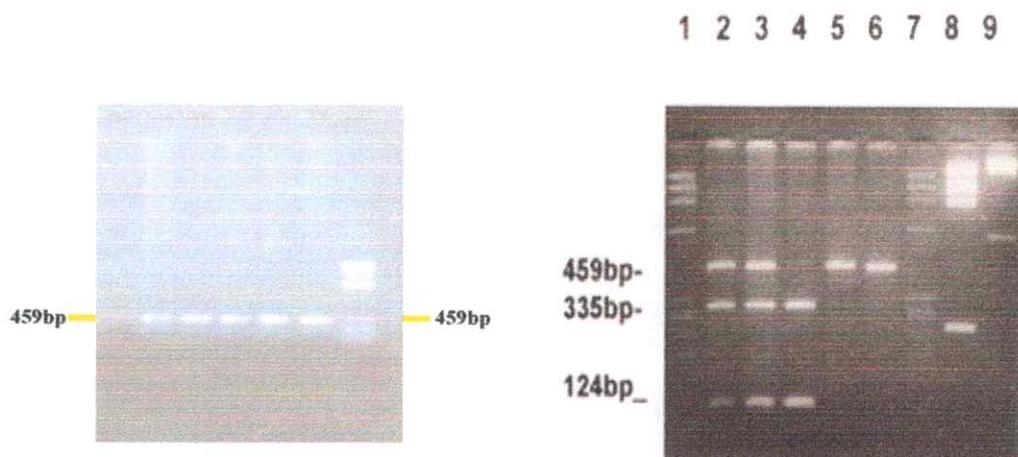


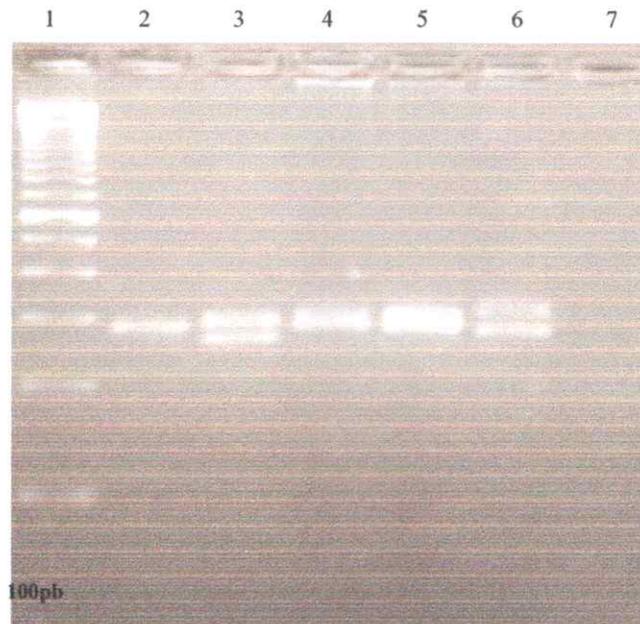
Fig. 2A. Gel de agarosa al 2%. Producto de Amplificación del gen CYP17 (459 bp, sin digestión con MspA1).

Fig. 2B. Patrón de restricción del gen CYP17 con MspA1. En la línea 2 y 3 heterocigotos para A2 (A1/A2), en la línea 4 homocigotos para alelo A2 (banda 335 bp). En el carril 5 no lleva el alelo A2 (banda 459 bp, Alelo A1), en la línea 6 el producto de PCR intacto (no incubado con MspA1), y en la línea 8: DNA pGL-2 digerido con MspA1. Para determinar el tamaño de los fragmentos se utilizó el DNA ladder de PhiX174 digerido con Hae III en la línea 1 y 7. Por último el DNA de Lambda digerido con Hind III en la línea 9 (Diamanti-Kandarakis et al. 1999).

### 2.7.3. GENOTIPIFICACIÓN DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS (RA)

El DNA genómico fue amplificado mediante PCR específico del exón 1 del AR, para lo cual se utilizaron partidores *sense* 5'-TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC-3' y *antisense* 5'-TTACGAGAAAGGAAGCCGTG-3'. La amplificación por PCR se realizó de manera de obtener un volumen final de 50  $\mu$ l. Conteniendo 0,2-0,5  $\mu$ g de DNA, buffer 10x PCR (Invitrogen), 2Mm dNTPs (Invitrogen), 50Mm MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 0,2  $\mu$ M de cada primer (Invitrogen), y 1.25 U de Taq polimerasa (Invitrogen). Luego se utilizó un termociclador Biometra PC-Personal cycler. La reacción de PCR de 30 ciclos, incluía un periodo de denaturación del DNA a 94°C por 30s, un temperatura de annealing a 62°C por 30s y un periodo de extensión de la Taq polimerasa a 72°C por 60s. Cada PCR fue iniciado con un periodo de denaturación de 6 min y terminando con 5 min de extensión a 72°C (Kenji Fujii et al. 2003). Se utilizó como estándar el 100pb DNA Ladder Invitrogen (1 $\mu$ g/ $\mu$ l). Se verificó los amplificados con geles de agarosa (Winkler) al 2% y al 4% como se observa en la figura 3. El gel fue teñido con bromuro de etidio (Invitrogen) para permitir

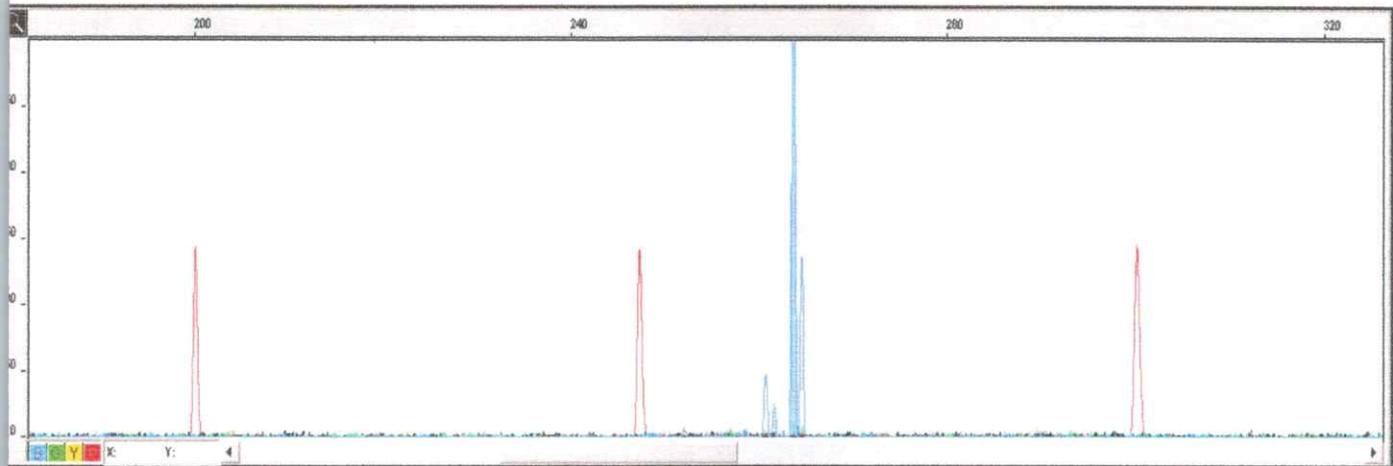
la visualización de la bandas de DNA con luz UV, observados con el programa BIO-CAPTMW software 1285.



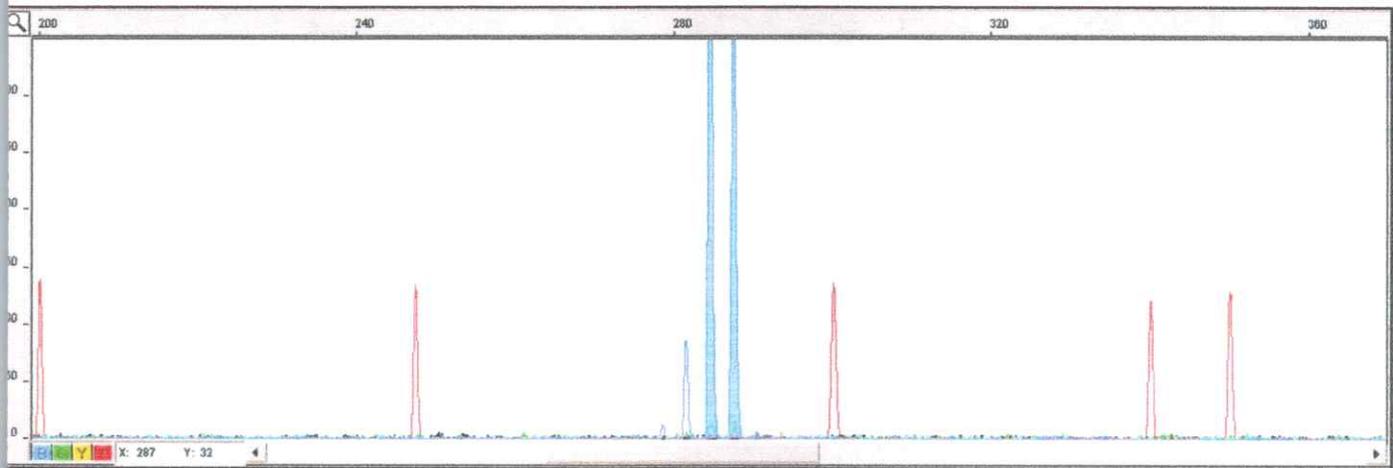
**Fig. 3** Gel de agarosa al 4% con muestras de pacientes controles y con SOP. En las línea 2, 3, 4, 6 corresponden a pacientes con SOP y en la fila 5 paciente control. En la línea 1 el marcador de peso molecular de 100pb y en la línea 7 el blanco.

2.7.3.1. PCR-FAM DE MUESTRAS DEL RA: Se realizó la amplificación de 11 muestras con los siguientes partidores *sense* 5'-TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC-3' y *antisense* 5'-dFAM-gCTgTgAAggTTgCTgTTCCTCAT-3' (este primer marcado con fluoroforo) de Biosearch technologies, INC. Luego se cubrieron con papel aluminio y fueron analizadas por secuenciación capilar en el laboratorio de Genética de la Universidad de Chile. Estas muestras se utilizaron como marcadores internos para verificar los alelos (heterocigotos-homocigotos) y el tamaño en pares de bases (pb) de cada banda. Como se muestra en la figuras 4A y 4B respectivamente.

**Figura 4a.**



**Figura 4b.**



**Fig.4.** Muestras PCR-FAM de pacientes con SOP. En fig.4a, se observa la muestra X1128 correspondiente a pacientes con SOP, homocigotas (un pick en azul) y en la fig.4b muestra X2169 de pacientes con SOP heterocigota (dos pick en azul). En rojo se muestra los estándares propios de la técnica para determinar los tamaños de las muestras.

### 2.7.3.2. GELES DE ACRILAMIDA:

Se realizó geles de acrilamida al 8% con las muestras amplificadas de SOP (n=100) y controles (n=87), utilizando una cámara Bio-Rad modelo Miniprotean. Los geles se llevaron a cabo utilizando dos componentes un *resolving* y un *staining*. El primero constituido por: 3,9 ml de agua, 2,3 ml de acrilamida 29:1 (Winkler), 2,1 ml de tris pH=8,8. 85 µl SDS 10% (Gibcobl), 85µl de persulfato de amonio (APS) al 10% (Gibcobl), 5µl Temed (Gibcobl) para un volumen final de 8,5 ml. Luego para concentrar la muestra se utilizo el *staining* (EdHarlow, David Lane 1988) con los siguientes componentes: 4,1ml de agua, 1 ml de acrilamida 29:1, 750 ml de tris pH=6,8, 60 µl SDS 10%, 60 µl de persulfato de amonio (APS) al 10%, 6 µl Temed, para un volumen final de 5 ml. Se utilizó como estándar DNA Ladder 100 pb y 50 pb a una concentración 1µg/µl. La corrida se realizó en dos etapas: 45min a 80V y luego a 60V por 3 horas y 30 minutos. Posteriormente se llevó a cabo la tinción para revelar los correspondientes geles utilizando 3 soluciones A, B y C. La solución A fue preparada en un tubo falcon de 50 ml, al que se agregó 45 ml de agua en 5 ml de etanol 95% /Ac.acético (10x). La solución B se preparó con 0,9 grs de AgNO<sub>3</sub> en 5 ml de agua quedando a una concentración de 100X. Luego en un tubo falcon de 50 ml se tomaron 500 µl de la solución de plata y se aforó con agua hasta 50 ml. Por último, para la solución C en un tubo falcon de 50 ml se agregó 30 ml de agua, 20 ml de NaOH 7,5% y 500 µl de formaldehído al 37%. Luego a cada gel se agregó la solución A y se calentó durante 30 segundos (s) en un microondas (Daewoo Kor-63F7) y se recuperó la solución A. Luego se agregó la solución B y se calentó durante 30 s. Después se desecho la solución y se lavo con agua destilada dos veces. Inmediatamente se agregó la solución C y se calentó durante 30 s. Nuevamente se desechó la solución y se lavó una vez con agua destilada para agregar finalmente la solución A recuperada. Luego se fotografió cada gel con una cámara canon modelo power-shot A620, como se muestra en la figura 5.

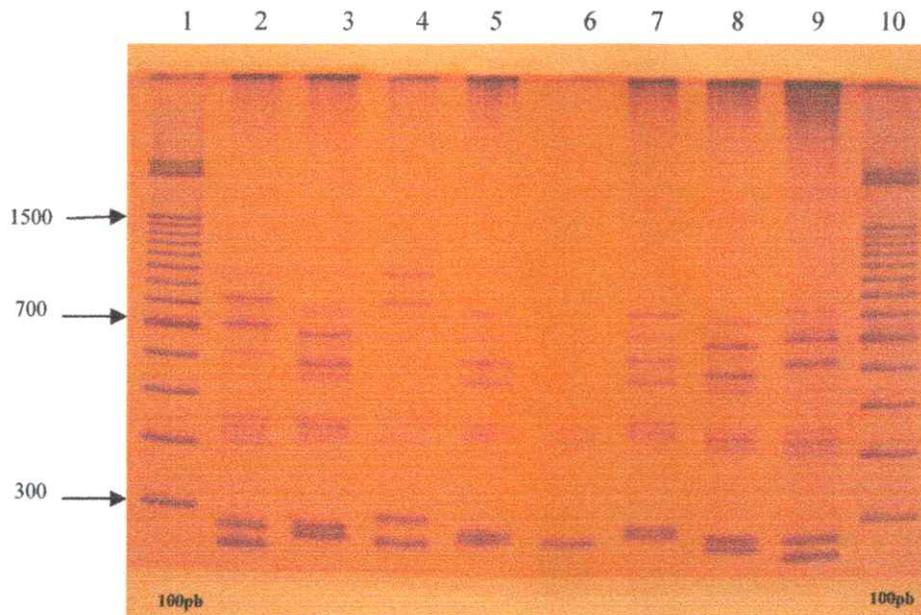


Figura 5. Gel de acrilamida al 8%. Las líneas 2-6 corresponden a muestras de pacientes con SOP (SX496, X2169, X2172, X2163, X1128, respectivamente). Las líneas 7 – 9, corresponden a las muestras de pacientes sanas (controles, NX101 NX890, NX232, respectivamente). La línea 1 y 10 muestra el marcador de peso molecular DNA Ladder de 100pb.

#### 2.7.4. ANÁLISIS DE REPETICIONES:

Cada fotografía fue sometida análisis de tamaños (pb) con un programa Kodac Molecular Imagin software 1D versión 4.0. Luego se determinó el número de repeticiones a través la siguiente formula aplicada:  $(\text{Tamaño alelos} - 221)/3$  (Wash et al 2005). El 221 de la fórmula presentada arriba, corresponde a las zonas flanqueantes a las repeticiones CAG. En estas zonas flanqueantes se unen ambos primer forward y reverse con a 103 y 118 pb respectivamente previos a las repeticiones, y el número tres para representar cada repetición en tripletes. Este análisis se realizó con el propósito de comprobar dicha fórmula, para esto se utilizó el programa de alineamiento Clustal W. Luego se realizó el promedio de los dos alelos para las pacientes de cada grupo. Luego el número de repeticiones CAG se agrupó en las siguientes categorías: cortas (<10), medianas (10-19) y largas (>20) para mujeres con SOP y controles respectivamente. Se comparó las fotografías de los geles de acrilamida, las muestras analizadas con Fam y las muestras en agarosa al 2 % para verificar los tamaños de repeticiones CAG (pb) y alelos.

## **2.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

La comparación de los casos y controles con respecto a las frecuencias alélicas y genotípicas se realizó a través del test chi-cuadrado. Se evaluó la concordancia de las frecuencias genotípicas respecto al equilibrio de Hardy-Weinberg. La descripción referente a los datos clínicos y bioquímicos se expresó como mediana y rango. La distribución normal de los datos se evaluó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias entre casos y controles se calculó mediante la prueba de t'student cuando las variables presentaron distribución normal o la prueba de Mann-Whitney si la distribución fue no paramétrica. Las diferencias entre los diferentes genotipos y/o clasificación de repeticiones CAG, tanto para el grupo control y SOP se evaluó mediante la prueba de ANOVA seguido de un test de Bonferroni o bien mediante la prueba de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos. La significancia estadística fue definida como  $p \text{ value} < 0.05$ . Todos los análisis se realizaron con el programa estadístico STATA 7.0.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Características clínicas y metabólicas del grupo de pacientes con SOP y mujeres controles.

Características clínicas y metabólicas incluyen edad, IMC, diámetro de cintura, índice cintura cadera (ICC), presión sistólica (PS) y presión diastolita (PD), en pacientes con SOP y controles se muestra en la tabla 1a. La tabla 1b se muestra la concentración de glicemia e insulina (0, 60,90 min) y perfil lipídico en mujeres con SOP y controles.

**Tabla 1a. Características clínicas de mujeres controles y portadoras de SOP.**

Grupo	Edad (años)	IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	Diámetro Cintura (cm.)	ICC	PS	PD
Control (n=87)	25.15 (15.00-36.00)	25.32 (17.96-43.35)	81.59 (62.0-117.00)	0,82 (0.69-0.98)	111.16 (90.00-144.00)	66.47 (48.00-94.00)
SOP (n=100)	26.08 (16.00-36.00)	28.92* (18.42-47.50)	89.21* (60.0-145.00)	0.85* (0.80-1.1)	110.03 (81.0-135.00)	66.32 (51.0-100.00)

Los valores se expresan como medianas y el rango (valor max. y min. respectivamente). IMC: índice de masa corporal. ICC.: índice cintura, cadera. PS. presión sistólica. PD: presión diastolita (\*)  $p < 0.05$ . El número respectivo de pacientes en cada caso fue mostrado, n.

Como se desprende de la tabla 1a, el grupo de mujeres con SOP presentó un IMC mayor al del grupo control ( $p=0.002$ ). Respecto a la distribución por edad, se encontraron valores comparables entre el grupo de mujeres con SOP y controles. En cuanto a ICC se encontró diferencia significativa en ambos grupos ( $p=0.012$ ). El diámetro de cintura en el grupo de mujeres con SOP fue significativamente mayor ( $p=0.006$ ) a lo observado en el grupo control, dicha diferencia se debe principalmente, a que las mujeres portadoras de este síndrome presentaron en su mayoría una distribución de grasa corporal de tipo androide. La presión sistólica (PS) y presión diastolita (PD) fue comparable entre los grupos.

**Tabla 1b. Características metabólicas de mujeres controles y portadoras de SOP.**

Grupo	Control, n=87	SOP, n=100
glicemia basal	81.00 (53.00-103.0)	84.00 (60.0-111.10)
Glicemia post-carga (2 horas)	85.50 (49.50-143.0)	93.00 (48.0-143.0)
insulina basal	9.68 (2.41-31.79)	12.68 (3.00-44.30)
insulina post-carga (2 horas)	33.40 (6.30-194.99)	67.53* (6.49-257.10)
HOMA	2.00 (0.42-7.61)	2.69* (0.53-9.74)
ISI	5.41 (1,16-10.02)	3.46* (0.42-9.27)
triglicéridos	108.0 (46.00-347.0)	125.50* (55.0-461.0)
colesterol	173.0 (125.0-300.0)	194.0* (124.0-227.0)
Colesterol-HDL	45.30 (23.40-96.40)	38.30 (23.20-58.00)
Colesterol-LDL	105.9 (37.4- 233.50)	111.90 (56.20-209.60)

Los valores se expresan como medianas y rango. (\*) $p < 0.05$ . El número respectivo de pacientes en cada caso fue mostrado, n.

Como se desprende de la tabla 1b, la glicemia e insulina basal fue mayor en pacientes con SOP, aunque estadísticamente no significativa. El grupo de mujeres con SOP presentó un mayor insulina post-carga que el grupo control ( $p < 0.0001$ ). Los valores de glicemia post-carga fueron mayores para las pacientes con SOP (NS) en comparación con las mujeres del grupo control. Respecto a las mediciones de HOMA-IR e ISI-composite se observó diferencias significativas en pacientes SOP y controles con un  $p = 0.002$  y  $p < 0.0001$

respectivamente, siendo mas insulino resistentes las mujeres con SOP. En relación al colesterol y triglicéridos se observaron diferencias significativas con  $p= 0,043$  y  $p= 0,023$  para el grupo de mujeres con SOP y mujeres controles. Las concentraciones de HDL y LDL fueron comparables entre ambos grupos.

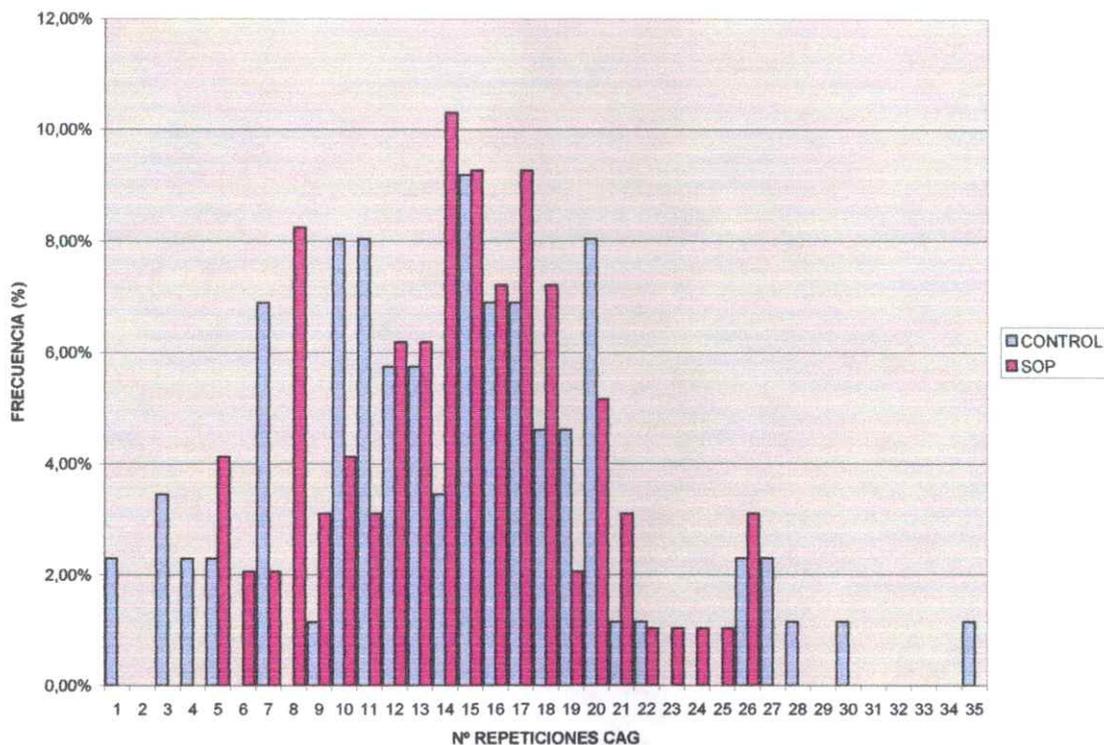
### 3.2. Distribución del número de repeticiones CAG.

**Tabla 2. Frecuencia para el número de repeticiones CAG del RA.**

	< 10	10-19	$\geq 20$
SOP n=100	19,59%	64,95%	15,46%
CONTROL n=87	18,39%	63,22%	18,39%

n: número de pacientes analizados

En la tabla 2 se muestran la frecuencia para el número de repeticiones CAG (promedio bialélico) en porcentajes, de acuerdo a las categorías descrita como cortas <10, medianas entre 10-19 y largas  $\geq 20$ . No se observaron diferencias porcentuales entre caso y controles. Como se desprende de la tabla, el mayor porcentaje se concentró entre 10-19 repeticiones en ambos grupos, siendo los porcentajes comparables. Lo mismo ocurrió con las repeticiones cortas.



**Figura 6. Distribución de las repeticiones CAG para el grupo con SOP y control. Las barras de color azul pertenecen a mujeres control y las barras de color rojo corresponden a mujeres con SOP.**

Una vez realizado el promedio bialélico el rango de repeticiones CAG para el RA fue de 5-26 y 1-35 para pacientes SOP y controles respectivamente. Los promedios bialélicos para las mujeres del grupo control fue de  $14,39 \pm 6,5$  números de repetidos CAG y para el grupo de mujeres con SOP fue de  $14,46 \pm 4,9$  repeticiones.

### 3.3. Frecuencia de CYP17 para pacientes con SOP y controles.

En las tablas 3a y 3b se observan las frecuencias genotípicas y alélicas según CYP17, también se determinó el equilibrio de Hardy-Weinberg, para ambos grupos de mujeres.

**Tabla 3a. Frecuencias genotípicas esperadas y observadas para el grupo de mujeres con SOP.**

Genotipo	Observado		Esperado
	n	(%)	n
A1/A1	21	(37,5)	21,2
A1/A2	27	(48,2)	26,4
A2/A2	8	(14,3)	8,2
Total	56	100 %	

Alelo	Observado	Frecuencia	Error estándar
A1	69	0.6161	0.0445
A2	43	0.3839	0.0445
total	112	1.0000	

P=0,8857.

**Tabla 3b. Frecuencias genotípicas esperadas y observadas para el grupo de mujeres control.**

Genotipo	Observado (%)		Esperado
A1/A1	32	(45,1)	28,5
A1/A2	26	(36,6)	32,9
A2/A2	13	(18,3)	9,5
Total	71	100 %	

Alelo	Observado	Frecuencia	Error estándar
A1	90	0.6338	0.0445
A2	52	0.3662	0.0445
total	142	1.0000	

P=0,0753.

En las muestras estudiadas la frecuencia alélica para las mujeres con SOP fue de 0.61 y 0.38 para los alelos A1 y A2, y para las mujeres controles 0.63 y 0.36 respectivamente. Se realizó el test de equilibrio exacto de Hardy-Weinberg, con el fin de establecer si la frecuencia genotípica de los individuos analizados en el estudio se encontraba en equilibrio según el parámetro aplicado. Los resultados del test de equilibrio de Hardy-Weinberg sugieren que los genotipos de ambos grupos en el estudio tanto SOP (P=0,8857) como control (P=0,0753) se encuentran en equilibrio.

### 3.3.1. Frecuencia genotípica para CYP17.

La tabla 4 resume la distribución de los genotipos del gen CYP17, de acuerdo a la característica de pacientes con SOP o control.

**Tabla 4. Frecuencia genotípica para CYP17.**

Genotipo	SOP (n=56)		Controles (n=71)		p-value chi-cuadrado Pearson
	n	frecuencia	n	frecuencia	
A1/A1	21	0.38	32	0.45	0.418 NS
A1/A2	27	0.48	26	0.37	
A2/A2	8	0.14	13	0.18	

n corresponde al número de pacientes de cada grupo. nt: número total de individuos de cada grupo. Se determino el p-value para la frecuencia de ambos genotipos. NS (no significativo).

Como se desprende de la tabla 4 en el grupo SOP la condición homocigota (A1/A1) se encuentra en una menor frecuencia que en las mujeres controles. La condición heterocigota se observa con menor frecuencia que en las mujeres con SOP. Sin embargo, en la condición de homocigoto para el alelo A2/A2, fue comparable entre ambos grupos.

### **3.4. Características antropométricas de mujeres con SOP y grupo control según genotipos de CYP17.**

En la tabla 5 se resumen las características antropométricas de ambos grupos de acuerdo a la presencia de los diferentes genotipos de CYP17.

**Tabla 5. Características antropométricas de mujeres con SOP y grupo control, según el genotipo de CYP17.**

Variables	Controles			SOP		
	A1/A1 n=32	A1/A2 n=26	A2/A2 n=14	A1/A1 n=20	A1/A2 n=27	A2/A2 n=10
Edad (años)	27.0 (15.0-33.0)	23.0 (17.0-36.0)	29.0 (24.0-34.0)	29.0 (18.7-36.0)	29.0 (16.0-36.0)	29.0 (19.0-34.0)
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	24.14 (19.04-43.45)	25.02 (17.96-30.8)	25.59 (21.37-33.57)	27.2 (18.7-45.2)	28.7 (20.5-47.5)	29.7 (17.3-44.5)
Diámetro Cintura (cm)	81.0 (62.0-117.0)	81.0 (75.5-84.0)	81.0 (65.0-101)	82.0 (69-121)	82.0 (69.0-121)	83.0 (71.0-108)
ICC (índice cintura-cadera).	0.82 (0.69-0.98)	0.82 (0.72-0.93)	0.81 (0.75-0.90)	0.81 (0.75-0.90)	0.83 (0.73-1.07)	0.83 (0.73-1.1)

Para cada genotipo se muestra el valor de la mediana y rango. El número respectivo de pacientes en cada caso fue mostrado, n.

De los resultados obtenidos se observó que la edad fue comparable en los tres genotipos en ambos grupos. Se observa además una tendencia mayor en cuanto al diámetro de cintura, ICC e IMC en las pacientes con SOP, portadoras del alelo A2 y más aún cuando son portadoras del genotipo homocigoto A2/A2.

### 3.5. Características hormonales de mujeres con SOP según el genotipo de CYP17.

En la tabla 6 se resumen los datos relacionados a las características endocrinológicas del grupo con SOP en las que se incluye niveles testosterona, índice de andrógenos libres (IAL), concentración dehidroepiandrosterona sulfato (DHEAS), hormona sexual de unión a globulina (SHBG) y la 17 hidroxiprogesterona (17OHP).

**Tabla 6. Características hormonales de mujeres con SOP según el genotipo de CYP17.**

Variables	SOP		
	A1/A1 n=20	A1/A2 n=27	A2/A2 n=10
Testosterona (ng/ml)	0,93 (0.10-1.45)	0.88 (0.14-1.46)	0.91 (0.51-1.72)
IAL	10.63 (1.29-42.48)	8.48 (1.11-31.02)	9.31 (2.63-31.78)
DHEAS (µg/dl)	284.89* (237.69-398.90)	114.89 (9.2- 190.9)	165.14 (114.89-215.40)
SHBG (nmol/L)	35.63 (9.63-241.0)	28.32 (10.96-13.97)	36.69 (10.69-81.71)
17OHP (ng/ml)	1.58 (0.8-2.39)	1.78 (0.62-15.05)	1.67 (1.45-1.90)

Para cada genotipo los valores se expresan como medianas y rango. (\*)  $p < 0.05$ . El número respectivo de pacientes en cada caso fue mostrado, n.

Los valores de testosterona fueron comparables entre los distintos genotipos. El índice andrógenos libres y SHBG tendió a ser menor en las pacientes con la característica de heterocigoto (A1/A2) y comparable entre los homocigotos (A1/A1 y A2/A2). Los valores de la DHEAS entre los genotipos dio diferencias significativa ( $p=0.004$ ) entre el genotipo A1/A1 con los otros dos genotipos, siendo menor en el genotipo heterocigoto A1/A2. Por último, en el caso de la 17-OHP no se observó diferencias entre todos los genotipos.

**3.6. Características antropométricas de mujeres con SOP y grupo control, según el número de repeticiones CAG del RA.**

En la tabla 7 se resumen los valores para las características antropométricas tanto de las pacientes SOP, como de las mujeres controles.

**Tabla 7. Características antropométricas de mujeres con SOP según número de repeticiones CAG.**

Variables	Controles			SOP		
	<10, n=30	10-19, n=35	≥20, n=20	<10, n=38	10-19, n=40	≥20, n=32
Edad (años)	25.00 (16.0-35.00)	25.00 (15.00-36.00)	24.5 (17-34.00)	29.00 (19.00-36.00)	29.00 (17.00-36.00)	21.50 (16.00-36.00)
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	25.21 (19.0-43.35)	25.28 (17.96-43.35)	24.23 (17.9-30.8)	32.20* (20.90-44.53)	26.07 (19.88-47.50)	25.44 (13.2-35.4)
ICC	0.84 (0.75-0.98)	0.82 (0.69-0.98)	0.82 (0.72-0.92)	0.88 (0.74-0.98)	0.82 (0.73-1.07)	0.83 (0.65-0.96)
Diámetro Cintura (cm)	83.00 (65.0-117.0)	82.00 (62.00-117.0)	77.00 (65-116.0)	93.50* (67.0-112.00)	79.00 (65.0-121.00)	83.00 (60.00-134.0)

Para cada repetición CAG, los valores se expresan como medianas y rango. (\*) p < 0.05. El número respectivo de pacientes en cada caso fue mostrado, n.

En los resultados no se encontraron diferencias significativas entre estos parámetros y el número de repetidos CAG para el grupo control. Sin embargo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el grupo SOP en cuanto al IMC (p= 0.046) entre las portadoras de un número de repeticiones menor a 10 y ≥ 20 repetidos CAG.

El diámetro de cintura fue mayor en las mujeres con SOP, con un número de repeticiones < 10 con un p= 0.004 en comparación con las portadoras de un número de repeticiones 10-19 y ≥ 20 repetidos CAG. El resto de los parámetros no mostraron diferencias significativas dentro del grupo de pacientes con SOP.

### 3.7. Características hormonales de mujeres con SOP según el número de repeticiones CAG del RA.

En la tabla 8 se muestra los valores hormonales de acuerdo a la categorización de las repeticiones CAG de las pacientes SOP.

**Tabla 8. Características hormonales de mujeres con SOP según número de repeticiones CAG.**

Variables	SOP		
	<10, n=38	10-19, n=40	≥20, n=32
Testosterona (ng/ml)	0.84 (0.6-1.46)	0.87 (0.6-1.88)	0.82 (0.63-1.64)
IAL	17.18 (6.6-31.02)	10.63 (2.63-54.23)	15.9 (2.56-21.39)
DHEAS (µg/dl)	131.99 (9.20-171.33)	215.04* (114.89-321.5)	178.0 (52.50-253.48)
SHBG (nmol/L)	15.00 (10.06-47.11)	32.06 (9.63-95.16)	31.00 (14.98-85.22)
17OHP (ng/ml)	0.8 (0.76-15.05)	1.72 (0.98-2.51)	1.77** (1.18-2.46)

Para cada repetición CAG, los valores se expresan como medianas y rango. El número respectivo de pacientes en cada caso fue mostrado, n.

(\*)  $p < 0.05$ . Entre sop con  $< 10$  y  $10-19$ .

(\*\*)  $p < 0.05$ . Entre sop con  $< 10$  y  $\geq 20$

En la tabla se observa que la concentración de la hormona testosterona fue comparable entre los grupos. Además los pacientes con un número de repeticiones menor a 10, presentan un IAL discretamente mayor que los pacientes con mayor número de repeticiones. Por otra parte para la DHEAS se encontraron diferencias significativas entre el grupo intermedio y el grupo menor de repeticiones ( $p=0.006$ ). Diferencias significativas ( $p=0.043$ ) se observaron para la 17-OHP entre las mujeres con repeticiones  $< 10$  y el grupo con  $10-19$  repeticiones, mientras que la SHBG fue menor en el caso de las pacientes con menor número de repeticiones sin significancia estadística.

### **3.8. Perfil lipídico de mujeres con SOP y controles según genotipos de CYP17.**

En la tabla 9 se muestra las concentraciones de lípidos, de acuerdo a la categorización de las repeticiones CAG de las pacientes SOP.

**Tabla 9. Perfil lipídico de mujeres con SOP y controles según genotipos de CYP17.**

Variables	Controles			SOP		
	A1/A1, n=32	A1/A2, n=26	A2/A2 n=14	A1/A1, n=20	A1/A2, n=27	A2/A2, n=10
Colesterol Total (mg/dl)	184.00 (125.0-265.0)	173.00 (129.0-242.0)	145.00 (138.0-177.0)	163.50 (121.0-256.0)	176.00 (124-263.00)	197.00* (151.0-277.0)
HDL (mg/dl)	46.10 (28.80-61.80)	46.70 (27.60-69.90)	51.05 (23.40-62.70)	42.40 (24.90-54.90)	40.90 (24.40-68.00)	41.30 (36.41-58.00)
Triglicéridos (mg/dl)	109.00 (46.0-219.00)	105.00 (48.0-347.00)	94.00 (48.0-157.00)	98.08 (57.0-210.00)	104.50 (61.0-287.00)	83.50 (60.0-134.00)
LDL	122.00* (51.1-194.80)	105.90 (44.0-160.30)	89.20 (62.00-121.60)	98.90 (62.1-190.90)	107.50 (64.2-185.90)	139.50 (90.9-209.60)

Para cada genotipo los valores se expresan como medianas y rango. (\*)  $p < 0.05$ . El número respectivo de pacientes en cada caso fue mostrado, n.

A partir de los valores que se muestran en la tabla 9, se encontraron diferencias significativas para el colesterol total ( $p = 0.013$ ) y para LDL ( $p = 0.027$ ) entre los genotipos homocigotos (A1/A1 y A2/A2) pertenecientes al grupo SOP y controles respectivamente. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los genotipos para los otros parámetros en ambos grupos.

**3.9. Perfil lipídico de mujeres con SOP y controles, según el número de repeticiones CAG del RA.**

En la tabla 10 se muestran los valores correspondientes al perfil lipídico de ambos grupos tomando en cuenta el número de repetidos CAG del RA (<10, 10-19, ≥20).

**Tabla 10. Perfil lipídico de mujeres con SOP según número de repeticiones CAG.**

Variables	Controles			SOP		
	<10 n=30	10-19, n=35	≥20, n=20	<10, n=38	10-19, n=40	≥20, n=32
Colesterol Total (mg/dl)	176.00 (142.0-239.0)	177.00 (125.00-300.0)	159.00 (138-184.0)	185.00 (124.0-235.00)	180.50 (121.0-277.0)	221.00 (125.0-251.0)
HDL (mg/dl)	36.40 (23.40-61.80)	46.20 (23.40-69.90)	52.70* (32.1-96.40)	35.70 (24.20-49.80)	40.35 (32.20-68.00)	41.90 (36.20-58.00)
Triglicéridos (mg/dl)	125.00 (62.0-209.0)	105.00 (46.00-347.00)	98.00 (48.0-148.0)	130.00 (91.00-176.00)	93.50 (57.0-461.00)	118.00 (55.0-315.00)
LDL	108.66 (76.4-170.90)	107.50 (44.00-233.50)	85.20 (37.4-133.1)	111.90 (64.20-169.00)	107.65 (62.1-209.60)	135.60 (56.2-172.80)

Para cada repetición CAG, los valores se expresan como medianas y rango. (\*) p < 0.05. El número respectivo de pacientes en cada caso fue mostrado, n.

A partir de estos resultados se encontró diferencias significativas sólo para HDL dentro del grupo control (p=0.003) entre repeticiones < 10 y ≥ 20. El HDL fue menor en el caso de pacientes con SOP, con menor número de repeticiones, pero sin una diferencia significativa. El resto de los parámetros no mostró diferencias significativas entre el número de repeticiones en ninguno de los grupos estudiados.

**4. Características bioquímicas de mujeres con SOP y grupo control según el genotipo de CYP17.**

En la tabla 11 se observa las características bioquímicas de pacientes con SOP y controles a través de la medición de glicemia e insulina basal y post-carga. A su vez la insulina se midió con el método de HOMA-IR e ISI en ambos grupos.

**Tabla 11. Características bioquímicas de mujeres con SOP y grupo control según genotipos de CYP17.**

Variables	Controles			SOP		
	A1/A1, n=32	A1/A2, n=26	A2/A2, n=14	A1/A1, n=20	A1/A2, n=27	A2/A2, n=10
Insulina Basal (μUI/ml)	11.77 (2.41-30.90)	7.98 (3.74-31.79)	8.25 (2.89-30.90)	10.5 (3.00-40.9)	14.9 (3.2-53.7)	23.8* (4.1-46.6)
Insulina post 2hrs (μUI/ml)	28.19 (7.49-72.55)	34.17 (6.30-194.99)	33.40 (19.52-159.39)	55.6 (8.5-300)	71.8 (15.0-320.7)	88.58* (24.6-279.6)
Glicemia Basal (mg/dl)	81.00 (53.0-100.00)	80.00 (10.26-65.00)	76.75 (60.00-92.00)	86.50 (66.4-111.00)	85.50 (73.90-154.0)	80.00 (72.00-89.00)
Glicemia post 2hrs (mg/dl)	75.00 (57.0-143.00)	87.00 (28.34-52.00)	95.00 (71.0-124.00)	100.25 (67.0-143.00)	95.00 (60.0-256.00)	95.50 (69.0-119.00)
HOMA <sub>IR</sub>	2.27 (0.42-6.05)	1.57 (0.60-7.65)	1.58 (0.44-6.05)	2.12 (0.53-20.72)	2.76 (1.12-22.18)	4.63* (2.51-9.78)
ISI	4.90 (2.10-22.02)	7.10 (1.16-17.33)	7.50 (1.75-16.85)	5.21 (0.73-19.27)	3.72 (0.66-10.00)	2.66* (1.25-6.11)

Para cada genotipo los valores se expresan como medianas y rango. Los valores de p significativos fueron mostrados p < 0.05 (\*). El número respectivo de pacientes en cada caso fue mostrado, n.

Se desprende de la tabla que las mujeres homocigotas con genotipo A2/A2 del grupo SOP fueron mas insulino-resistentes comparado con el grupo control con el genotipo A2/A2. Se encontraron diferencias significativas intra-grupos para la insulina basal, insulina post-carga con un p=0.002 y p=0.004 respectivamente, y para HOMA e ISI con un p=0.046 y p=0.027 respectivamente. Cabe que también se observo una diferencia significativa de los parámetros evaluados, en relación al genotipo A2/A2 de controles y pacientes con SOP.

**4.1. Características bioquímicas de mujeres con SOP y grupo control, según el número de repeticiones CAG.**

En la tabla 12 se observa las características bioquímicas de pacientes con SOP y controles a través de la medición de glicemia e insulina basal y post-carga. A su vez la insulina se midió con el método de HOMA-IR e ISI en ambos grupos.

**Tabla 12. Características bioquímicas de mujeres con SOP y grupo control, según el número de repeticiones CAG del RA.**

Variables	Controles			SOP		
	<10, n=30	10-19, n=35	≥20, n=20	<10, n=38	10-19, n=40	≥20 n=32
Insulina Basal (μUI/ml)	9.94 (2.89-30.09)	10.15 (2.41-31.79)	7.50 (2.5-25.37)	13.04 (6.01-18.78)	12.92 (3.00-35.54)	11.39 (5.70-44.30)
Insulina post 2hrs (μUI/ml)	33.8 (11.3-176.80)	33.40 (6.30-194.99)	28.76 (7.49-159.39)	74.72 (14.95-213.8)	70.58 (19.32-257.1)	35.09 (6.49-117.0)
Glicemia Basal (mg/dl)	80.0 (61.0-103.0)	84.00 (53.0-102.00)	81.00 (65.00-94.00)	78.5 (75.00-108.0)	82.5 (60.00-111.0)	89.00 (78.00-107.0)
Glicemia post 2hrs (mg/dl)	86.0 (49.5-143.00)	81.00 (55.0-143.00)	96.00 (64.0-108.00)	120.00 (71.00-143.0)	92.25 (48.00-143.0)	83.00 (60.00-128.0)
HOMA <sub>IR</sub>	2.16 (0.44-6.03)	2.16 (0.44-7.61)	1.51 (0.42-4.64)	2.49 (1.11-5.01)	2.51 (0.53-8.34)	2.86 (1.18-9.74)
ISI	5.09 (2.62-16.85)	5.41 (1.16-17.33)	7.82 (1.75-22.02)	4.10 (1.79-10.0)	4.32 (1.01-19.27)	4.42 (1.25-9.61)

Para cada repetición CAG, los valores se expresan como medianas y entre paréntesis el rango. El número respectivo de pacientes en cada caso fue mostrado, n.

De acuerdo a los resultados presentados en la tabla 12, no se encontraron diferencias significativas en los parámetros bioquímicos según clasificaciones del número de repetidos CAG del RA para ninguno de los dos grupos. Sin embargo se ve una tendencia que las mujeres SOP con < 10 repeticiones son mas insulino- resistentes que las mujeres controles.

## 5. DISCUSIÓN

El polimorfismo CAG en el exón 1 del RA, se ha estudiado como un posible defecto genético del SOP. En algunos estudios se ha descrito una relación inversa entre el número de repeticiones CAG y la sensibilidad del receptor. Sin embargo, otros estudios no han encontrado asociación entre este polimorfismo y la hipersensibilidad del RA en mujeres jóvenes hiperandrogénicas (Calvo et al.2000). A su vez el gen CYP17 también ha sido relacionado con el síndrome de ovario poliquístico, ya que codifica para enzimas claves que participan en pasos limitantes en la ruta metabólica para la producción de andrógenos.

En el presente estudio se evaluó un grupo de mujeres chilenas con SOP y controles, con el propósito de determinar la relación entre el número de repetidos CAG y, por ende la variación en la sensibilidad del receptor androgénico, y su relación con las características metabólicas y hormonales del SOP. Además, se evaluó la variante T→C del gen CYP17, con el propósito de establecer un haplotipo (repeticiones CAG y CYP17) como posible marcador de riesgo en el SOP.

Las pacientes SOP con el genotipo A2/A2 y con menor número de repeticiones CAG resultaron ser más insulino resistentes, que las pacientes con otros genotipos para CYP17 y con mayor número de repeticiones, determinado mediante HOMA-IR e ISI-composite. Además, se calculó el odd-ratio para ambos marcadores genéticos en conjunto, repeticiones cortas CAG y alelo A2, como posibles determinantes en la insulino resistencia en las mujeres con SOP, sin embargo, no se encontró significancia estadística.

Por otra parte, se observó una relación entre las pacientes con SOP portadoras del genotipo A1/A1 y los niveles altos de DHEAS. Esto concuerda con una investigación realizada por Kahsar et al. 2004 en mujeres estadounidenses, en las cuales observaron que el nivel de DHEAS era menor para el genotipo A2/A2 y mayor para el genotipo A1/A1, lo que sugiere que no habría asociación entre el genotipo A2/A2 y una mayor producción de DHEAS. Así mismo, no se observó relación entre el alelo A2 y los otros andrógenos analizados.

En relación a la frecuencia observada para el polimorfismo CAG del RA el número promedio de repeticiones resultó similar tanto para el grupo control como para el grupo SOP, cuando fueron promediadas todas las categorías (cortas, medianas y largas) por separado en ambos grupos. De la misma forma, no se encontró diferencia en la distribución alélica entre pacientes SOP y controles, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Mifsud et al. 2000.

Por otra parte, el rango de repeticiones CAG en el RA encontrado por T.Hickey et al. 2007 fue de 14-30 repeticiones para mujeres controles y 8-32 para mujeres con SOP. Lo anterior difiere de nuestros resultados ya que el rango encontrado fue de 1-35 y 5-26 para controles y SOP, respectivamente (Fig.6). Esto podría deberse a diferencias étnicas y/o metodológicas, ya que estos autores utilizaron la técnica de secuenciación para posteriormente determinar el número de repeticiones en sus muestras. Estas muestras secuenciadas las utilizaron luego como estándares internos en los geles de acrilamida. Sin embargo, en nuestro estudio no se empleó secuenciación, sino que se utilizó estándares internos en los geles de acrilamida, que previamente habían sido analizados por PCR-Fam, lo que permitió determinar su tamaño y con este parámetro, luego se calculó el número de repeticiones. Esto se puede observar en las figuras 4a y 4b, en las cuales se puede verificar que las muestras, correspondientes a pacientes con SOP, x 1128 y x 2169, corresponden a un homocigoto y heterocigotos respectivamente.

El polimorfismo de la región promotora del gen CYP17 ha sido estudiado en otras poblaciones. Diamanti-Kandarakis et al.1999, describen la existencia de diferentes genotipos de CYP17 en 50 pacientes con SOP y 50 mujeres sanas de una población griega. En este estudio, se observó que en las mujeres con SOP el 34% fue A1/A1, el 58% fue A1/A2 y el 8% fue A2/A2, comparado con nuestro estudio en 130 mujeres con SOP se observó que el 38% presentó genotipo A1/A1, el 48% A1/A2 y el 14% A2/A2, lo que indica que la distribución genotípica es comparable. Lo mismo ocurrió con las mujeres del grupo control, quienes presentaron una frecuencia genotípica A1/A1 similar a la observada en nuestro estudio. Sin embargo, la homocigocidad del genotipo A2/A2 en el grupo control

no fue observada por estos autores, pero sí en nuestro estudio en el que se observó un porcentaje del 18% para el genotipo A2/A2.

En el presente estudio, la frecuencia del alelo A2 fue similar entre mujeres sanas y mujeres con SOP, lo cual concuerda con estudios previos (Gharani et al.1996, Marszalek 2001). Gharani et al.(1996) observaron que la frecuencia del alelo A2 en una población de origen caucásico fue de 44% para SOP y 34% para las mujeres sanas, mientras que en nuestro estudio la frecuencia del alelo A2 fue de 38% para mujeres con SOP y 36% para mujeres sanas.

En relación a las características clínicas del SOP y el polimorfismo de repeticiones CAG se observó una relación entre el número de repeticiones y las características clínicas tales como el IMC, ICC y diámetro de cintura. Las pacientes con menor número de repeticiones CAG (<10), presentaron valores antropométricos superiores, lo que concuerda con lo descrito por Walsh et al.2005 quienes observaron un mayor IMC, ICC y diámetro de cintura en las mujeres con menor número de repeticiones, según la clasificación de repeticiones cortas realizada por estos autores.

En relación a CYP17 se observaron diferencias entre los distintos genotipos y el IMC, diámetro cintura e ICC en mujeres con SOP pero sin significancia estadística. Lo anterior concuerda con un estudio previo realizado por nuestro grupo, en el cual las mujeres portadoras del alelo A2 fueron más obesas que aquellas pacientes que no portaban dicho alelo (Echiburú et al., In press).

Respecto al perfil hormonal de las pacientes con SOP y el número de repeticiones CAG, observamos que las pacientes con menor de 10 repeticiones fueron más hiperandrogénicas, aunque no alcanzaron significancia estadística. Lo anterior concuerda con estudios realizados por Simoni et al. 2005, quienes describieron una relación inversa entre el número de repeticiones y la severidad del hiperandrogenismo.

En relación al gen CYP17 con el perfil hormonal del grupo SOP, no se encontraron diferencias significativas entre las portadoras del alelo A1/A1, el A1/A2 y A2/A2. Lo que sugiere que el polimorfismo T→C de CYP17 no se encuentra asociado con la síntesis de hormonas esteroidales en el ovario en SOP.

En el presente estudio se observó que las mujeres SOP con repeticiones <10 presentaron una mayor insulino resistencia que aquellas pacientes con un número de repeticiones CAG intermedio o mayor. Lo anterior coincide con lo descrito por Möhlig et al. (2006) quienes describieron una relación inversa entre el número de repeticiones y el nivel de resistencia insulínica.

Como se mencionó anteriormente las pacientes con menor número de repeticiones fueron discretamente más hiperandrogénicas con un IAL levemente aumentado. Tomando en cuenta esta idea y sabiendo que estas pacientes (con menores repeticiones) son más insulino resistentes, y por ende presentan una menor concentración de SHBG, se podría especular que habría un efecto de los andrógenos libres a nivel de tejido adiposo produciendo una mayor insulino resistencia. Esto se apoya en el trabajo de Corbould 2007, quien observó este efecto en células adiposas tratadas con diferentes concentraciones de testosterona. De esta forma se produce un círculo vicioso entre los andrógenos libres y la resistencia a insulina.

A su vez las mujeres de esta categoría (repeticiones cortas) fueron más obesas y poseían una contextura de tipo androide, caracterizada por la acumulación de grasa intra-abdominal, por lo que se podría inferir que hay un efecto de los andrógenos en la acumulación y distribución de la grasa corporal. Lo anterior concuerda con las observaciones realizadas por Dieudonné et al.1988 quienes demostraron la presencia de RA en preadipocitos y adipocitos, lo que permite inferir que los andrógenos podrían contribuir en el desarrollo del tejido adiposo.

En estudios recientes, el polimorfismo de CYP17 ha sido asociado con condiciones metabólicas. En el presente estudio las pacientes portadoras del alelo A2/A2 fueron más insulino resistentes que las no portadoras. A su vez la expresión y actividad enzimática del gen de P450c17 $\alpha$  en tejido adiposo de humanos ha sido descrito (Puche et al.2002), representando una fuente adicional de andrógenos que puede ser asociada con insulino

resistencia. Se podría inferir que la presencia de este polimorfismo incrementaría la producción de andrógenos locales, resultando en un aumento de la lipólisis de la grasa visceral e incrementando el nivel de ácidos grasos no-esterificados (NEFA) lo cual podría contribuir a la insulino resistencia por un aumento en la gluconeogénesis hepática, disminuyendo la extracción de insulina y la captación periférica de glucosa (Rebuffe et al. 1991, Randle 1963).

## 6. CONCLUSIONES

Las mujeres con síndrome de ovario poliquístico con menor número de repeticiones CAG del RA y portadoras del alelo A2 del gen CYP17 son más obesas e insulino resistentes que las mujeres sanas. En el caso de las repeticiones CAG no se encontró diferencias significativas en relación al menor número de repeticiones y el incremento de los de andrógenos circulantes, pero se podría sugerir que habría un efecto de los andrógenos libres sobre el tejido adiposo de estas mujeres, lo que conduciría a una mayor resistencia a insulina. Por otro lado, el polimorfismo de CYP17 provocaría un aumento en la producción de andrógenos en el tejido adiposo propiamente tal, lo cual podría contribuir a la resistencia insulínica.

Si bien no se ha podido determinar la causa específica que provoca este síndrome, nosotros podemos sugerir que hay un efecto de ambos polimorfismos sobre la resistencia a la insulina, lo cual altera la homeostasis de estas mujeres agravando el síndrome.

No obstante no se observa un efecto sinérgico de ambos polimorfismos por lo que el haplotipo (repeticiones CAG y CYP17) no constituiría un marcador de riesgo.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Azziz Ricardo. Diagnosis of Polycystic Ovarian Syndrome: The Rotterdam Criteria Are Premature. *Journal of clinical Endocrinology and metabolism* 2006; 91:(3):781-785.
- Beilin J, E M A Ball, J M Favalaro y J D Zajac. .Effect of the androgen receptor CAG repeat polymorphism on transcriptional activity: Specificity in prostate and non-prostate cell lines. *Journal of molecular endocrinology* 2002; 25: 85-96.
- Berg M. Jeremy .DNA Binding Specificity of Steroid Receptors. *Cell* 1989; 57 :1065-1068.
- Calvo RM, Asuncion M, Sancho J, San Millan JL, Escobar-Morreale HF. The role of the CAG repeat polymorphism in the androgen receptor gene and of skewed X chromosome inactivation, in the pathogenesis of hirsutism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2000; 85:1735-1740.
- Calvo Rosa M., Miryam Asunción, José Sancho, José L. San Millán and Héctor F. Escobar-Morreale. The role of the cag repeat polymorphism in the androgen receptor gene and of skewed x-chromosome inactivation, in the pathogenesis of hirsutism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2000; 85:(4): 1735-1740.
- Chaney M.Small, Michele Marcus, Stephanie L Sherman, Amy K.Sullivan, Amita K.Manatunga and Heather Spencer Feigelson. Cyp17 genotype predicts serum hormone level among premenopausal women. *Human reproduction* 2005; 20:(8): 2162-2167.
- Charmian A Quigley, Alessandra de Bellis, Keith B. Marscheke et al. Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Reviews Endocrine* 1995. 16: 271-321.
- Charmian A. Quigley, Alessandra de Bellis, Keith B. Marschke, Mostafa K. el-Awady, Elizabeth M. Wilson, and Frank S. French. Androgen receptor defects: historical, clinical, and clinical molecular perspectives. *Endocrine Reviews* 1995, 16: 3: 7-8.
- Corbould A. Chronic testosterone treatment induces selective insulin resistance in subcutaneous adipocytes of women. *Journal of Endocrinology* 2007; 192:585-594.

Diamanti-Kandarakis Evanthia, M.D., Ph.D., Michael I. Bartzis, B.Sc., Evangelia D. Zapanti, M.D., Ph.D., Giovanna G. Spina, M.D., Fanny A. Filandra, M.D., Thomais C. Tsianateli, M.D., Angeliki T. Bergiele, M.D., and Chryssa R. Kouli, M.D. "Polymorphism T→C (-34 bp) of gene CYP17 promoter in greek patients with polycystic ovary syndrome". *Fertility and Sterility* 1999; 71:(3):431-435.

Dieudonne M. N., R. pecquery, A. Boumediene, M. C. Leneveu, and Y. Giudicelli. Androgen receptors in human preadipocytes and adipocytes: regional specificities and regulation by sex steroids. *J Physiol Cell Physiol* 1998; 274:1645-1652.

Dieudonné M. N., R. Pecquery, A. Boumediene, M. Leneveu and Y. Giudicelli, Androgen receptors in human preadipocytes and adipocytes: regional specificities and regulation by sex steroids. *Am J Physiol Cell Physiol* 1998; 274:1645-1652.

Dunaif, A., Segal, K.R., Futterweit, W., Dobrjansky, A. Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. *Diabetes* 1989; 38: 1165-1174.

Echiburú Barbara, Francisco Perez Bravo, Manuel Maliqueo, Fernando Sánchez Nicolás Crisosto and Teresa Sir Peterman. Polymorphism T→C (-34pb) of gene CYP17 promoter in women with polycystic ovary syndrome is associated with obesity. *Metabolism clinical and experimental* (In press).

Edwards A., H.A. Hammond, L. Jin, C.T. Caskey, R. Chakraborty. Genetic Variation at five tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* 1992; 12: 241-253.

Ehrmann David A, M.D. Polycystic Ovaries Syndrome. *The new England Journal of Medicine*; 352:(12):1223-1236.

Escobar-Morreale H.F, J.L. San Millán, R.R Smith. The Presence of the 21-hydroxylase deficiency carrier status in hirsute women: phenotype-genotype correlations. *Fertility and Sterility* 1999; 72:(4):629 -638.

Escobar-Morreale Héctor F. The molecular-genetic basis of functional hyperandrogenism and the polycystic ovary syndrome. *Endocrine Reviews* 2005; 26: 251-282.

- Fujii Kenji, Tatsuyuki Okiura, Koji Nishimura, Chitoshi Orimoto, Hiroaki Nishimukai. Short tandem repeat typing in exón 1 of the androgen receptor gene. *Legal medicine* 2003;5: S201-203.
- Gelmann P.Edward .Molecular biology of the androgen receptor. *journal of clinical oncology* 2002; 20:(13): 3001-3015.
- Gharani, N, Waterworth, DM, Williamson, RFranks, S.5' polymorphism of the CYP17 gene is not associated with serum testosterone level in women with polycystic ovaries. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1996. 81:(11):4174.
- Ghranari D.M. Waterworth ,S.Batty, et al . Association of the steroid synthesis gene CYP11a a with polycystic ovary syndrome and hyperandrogenism. *Human Molecular Genetics*1997; 6: 3:397-402.
- Ghrani Franks S, Waterworth D, Batty S. Current, "Development in the molecular genetics of the polycystic ovary syndrome. *TEM* 1998; 9:51-52.
- Gilling-Smith C., Willis D.S., Beard R.W., Franks S. Hypersecretion of androstenedione by isolated theca cells from polycystic ovaries. *J.Clin. Endocrinol. Metab.* 1994;79:1158-1165.
- Harlow Ed, David Lane *Antibodies: A Laboratory Manual* 1988.Apéndice 1: 640.
- Hickey T., A. Chandy, y R. J. Norman. The androgen receptor cag repeat polymorphism and x-chromosome inactivation in australian caucasian women with infertility related to polycystic ovary syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*2002; 87:(1):161-165.
- Hulley S, Cummings S." *Designing Clinical Research and Epidemiologic approach* 1998; 220:75-86.
- Jääskeläinen Jarmo,MD,Seija Coronen MD, Raimo Voutilainen,M.D.,Maritta Hippeläinen,M.D., and Seppo Heinonen,M.D. Androgen receptor gene CAG length polymorphism in women with polycystic ovary syndrome2005; *Fertility and Sterility* ;83:(6):1724-1728.
- Jakimiuk A.J., S.R.Weistman,P.R. Brzechffa, and D.A. Magoffin. Aromatase mRNA expression in individual follicullicles from polycystic ovaries.*Molecular Human reproduction* 1998; 4:(1):1-8.

- Kahsar-Miller M., L. Boots, A. Bartolucci, R. Azziz . Role of a CYP17 polymorphism in the regulation of circulating dehydroepiandrosterone sulfate levels in women with polycystic ovary syndrome 2004. *Fertility and Sterility*; 82 :(4): 973-975.
- 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, Spielman R, Urbanek M, Driscoll D, Strauss III JF and Dunaif A. Phenotype and genotype in the polycystic ovary syndrome. *Recent Prog Horm Res* 1998; 53: 217-256.
- Marszalek B., M Laciński, N Babych, E Capla, J Biernacka-Lukanty, A Warenik-Szymankiewicz, W H Trzeciak. Investigations on the genetic polymorphism in the region of CYP17 gene encoding5'-UTR in patients with polycystic ovarian syndrome. *Gynecol Endocrinol* 2001; 15 :2: 123-128.
- Matias Pedro M., Peter Donner, Ricardo Coelho, Monica Thomaz, Cristina Peixoto ,Sofia Macedo, Norbert Otto, Simone Joschko, Peter Scholz, Anja Wegg, Siegfried Basler§,Martina Scha"fer, Ursula Egner, and Maria Arménia Carrondo .structural evidence for ligand specificity in the binding domain of the human androgen receptor. *The journal of Biological Chemistry* 2000; 26164-26171.
- Matsuda M, Defronzo R. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing. *Diabetes Care* 1999; 22:(9): 1462-1470.
- Matthews DR, Hoskre JP, Rudenski AS, Naylor BA. Homeostasis model assess ment: insuline resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrationons in man 1985. *Diabetologia*. 28:(7): 412-419.
- Mifsud Amparo, Sylvia Ramirez and E.L.Yong. Androgen receptor genes CAG trinucleotide repeat in anovulatory infertility and polycystic ovaries. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2000; 85:(9): 3484–3488.
- Möhling Matthias, Annette Jürgens, Joachim Spranger , Kurt Hoffmann, Martin O Weickert , Hans W Schlösser, Thilo Schill, Georg Brabant, Andreas Schüring, Andreas F H Pfeiffer, Jörg Gromoll and Christof Schöfl.The androgen receptor CAG repeat modifies the impact of testosterone on insulin resistance in women whith polycystic ovary syndrome European. *Journal of Endocrinology* 2006; 155 (1): 127-130.

- Puche C., M. Jose, A.Cabero, and A.Meseguer .Expression and enzymatic activity of the P450c17 gene in human adipose tissue. *European Journal of Endocrinology* 2002; 146: (2): 223-229.
- Rajkhowa M, Neary RH, Kumpatla P, et al. Altered composition of high density lipoproteins in women with the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*1997;82: 3389-3394.
- Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus 1963; 13(1):785-789.
- Rebuffé-Scrive M, Márin P, Björntorp P. Effect of testosterone on abdominal adipose tissue in men1991; 15 :(11):791-795 .
- Rennie PS, Bruchovsky N, Leco KJ, Sheppard PC, McQueen SA,Cheng H, Snoek R, Hamel A, Bock ME, MacDonald BS, Nickel BE, Chang C, Liao S, Cattini PA, Matusik RJ. Characterization of two cis-acting DNA elements involved in the androgen regulation of the probasin gene. *Molecular Endocrinology* 1993; 7: 23-36.
- Richard S. Legro, MD, Allen R. Kunselman, MA, Andrea Dunaif, MD. prevalence and predictors of dyslipidemia in women with polycystic ovary syndrome. *The american journal of medicine* 2001. 111: 607-613.
- Schoenmakers E, Alen P, Verrijdt G, et al: Differential DNA binding by the androgen and glucocorticoid receptors involves the second Zn-finger and a C-terminal extension of the DNA-binding domains. *Biochem Journal* 1999; 341:515-521,
- Simoni Brum, Ilma, Poli Mara Spritzer, Franyoise Paris, Maria Augusta Maturana, Franyoise Audran, Charles Sultan. Association Between Androgen Receptor Gene CAG Repeat Polymorphism and Plasma Testosterone Levels in Postmenopausal Women. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 2005; 12 :( 2 ):135-141.
- Sir Peterman Teresa, Maliqueo Manuel Y, Perez Bravo Francisco, Angel B Barbara, Carvajal P Fernando, Maria Paz del Solar P, Benitez M Ricardo; Prevalence of type II diabetes mellitus and insulin resistance in parents of women with polycystic ovary syndrome. *Diabetologia* 2002; 45: 959-964.

Sir Peterman Teresa, Angel B Barbara, Maliqueo Manuel Y, Carvajal P Fernando, J.L.Santos, Pérez Bravo Francisco; ortancia de establecer su diagnóstico. *Revista medica de Chile* 2001.129: (7): 1-11.

Trapman J, Klaassen P, Kuiper GG, van der Korput JA, Faver PW, van Rooj HC, etal. Cloning, estructura and expresión of a cDNA encoding the human androgen receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 153: 241-248.

Vottero A., M.Capelletti, S.Giuliodori, I.Viani, M.Ziveri,T.M.Neri,S.Bernasconi, and L.Ghizzoni Deacresed Androgen receptor gene methylation in premature pubarche: a novel pathogenetic mechanism?. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2006; 91(3): 968-972.

Walsh Sean, Joseph M. Zmuda, Jane A. Cauley, Patrick R. Shea, E. Jeffrey Metter,Ben F. Hurley,1 Robert E. Ferrell,3 and Stephen M. Roth; Androgen receptor CAG repeat polymorphism is associated with fat-free mass in men. *J Appl Physiol* 2005; 98:132-137.

WHO Physcal status: The use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. Geneva, World Health Organization, 1995; 854:368-369.

WHO:Obesity preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity. Geneva, World Health Organization 1997.

Wickenheisser J.K., Quinn P.G.,Nelson V.L.,Legro R.S, Strauss J.F.III, and.McAllister J.M. Differential activity of the cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydroxilase and steroidogenic acute regulatory protein gene promoters in normal and polycystic ovary syndrome theca cells. *Journal of endocrinology and metabolism* 2000; 85(6): 2304-2311.