

CIRUGÍA y CIRUJANOS

Órgano de difusión científica de la Academia Mexicana de Cirugía
Fundada en 1933

www.amc.org.mx www.elsevier.es/circir



ARTÍCULO ORIGINAL

Análisis de asociación del SNP-63 y la variante indel-19 del gen de calpaína-10 con síndrome de ovario poliquístico en mujeres en edad reproductiva



Silvia Esperanza Flores-Martínez^a, Anna Gabriela Castro-Martínez^a,
Andrés López-Quintero^a, Alejandra Guadalupe García-Zapién^b,
Ruth Noemí Torres-Rodríguez^a y José Sánchez-Corona^{a,*}

^aDivisión de Medicina Molecular, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalajara, Jalisco, México

^bDepartamento de Farmacobiología, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México

Recibido el 14 de noviembre del 2013; aceptado el 4 de agosto del 2014

PALABRAS CLAVE

Gen *CAPN10*;
Haplotipos;
Síndrome de ovario poliquístico

Resumen

Antecedentes: El síndrome de ovario poliquístico es una enfermedad compleja y heterogénea que implica problemas reproductivos y metabólicos. Se ha sugerido una predisposición genética en la etiología de este síndrome. La identificación del gen de la calpaína-10 (*CAPN10*) como el primer gen asociado a diabetes mellitus tipo 2 suscitó el interés por investigar su posible relación con el síndrome de ovario poliquístico, debido a que este síndrome se asocia a hiperinsulinemia y resistencia a la insulina, 2 anormalidades metabólicas relacionadas con diabetes.

Objetivo: Investigar si existe asociación entre el SNP-63 y la variante indel-19 del gen *CAPN10* y el síndrome de ovario poliquístico en mujeres en edad reproductiva.

Material y métodos: El estudio incluyó a 101 mujeres (55 con síndrome de ovario poliquístico y 46 clínicamente sanas). La variante indel-19 se identificó mediante corrimiento electroforético de los fragmentos amplificados por PCR y el SNP-63 por PCR-RFLP.

Resultados: Las frecuencias alélicas y genotípicas de las 2 variantes no difieren significativamente entre pacientes con síndrome de ovario poliquístico y mujeres del grupo control. El haplotipo 21 (definido por el alelo inserción de la variante indel-19 y el alelo C del SNP-63) se encontró con mayor frecuencia en los 2 grupos de estudio, siendo más frecuente en el grupo de pacientes; sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p = 0.8353$).

*Autor para correspondencia: División de Medicina Molecular, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social. Sierra Mojada 800, Colonia Independencia. CP 44340, Guadalajara, Jalisco, México. Teléfono: (33) 36189410

Correo electrónico: josancmx@yahoo.com.mx; jose.sanchezco@imss.gob.mx (J. Sánchez Corona).

KEYWORDS

CAPN10 variants;
Haplotypes;
Polycystic ovary
syndrome

Conclusiones: Los resultados sugieren que el SNP-63 y la variante indel-19 del gen *CAPN10* no son factores de riesgo para síndrome de ovario poliquístico en nuestro grupo de pacientes.

Todos los derechos reservados © 2015 Academia Mexicana de Cirugía A.C. Publicado por Masson Doyma México S.A. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Analysis of the association of SNP-63 and indel-19 variant in the calpain-10 gene with polycystic ovary syndrome in women of reproductive age

Abstract

Background: Polycystic ovary syndrome is a complex and heterogeneous disease leading to reproductive, as well as metabolic problems. It has been suggested that there may be a genetic predisposition in the aetiology of polycystic ovary syndrome. The identification of calpain 10 gene (*CAPN10*) as the first candidate gene for type 2 diabetes mellitus has focused the interest in investigating their possible connection with the polycystic ovary syndrome. This syndrome is associated with hyperinsulinaemia and insulin resistance, two metabolic abnormalities associated with type 2 diabetes mellitus.

Objective: To investigate if there is association between the SNP-63 and the genetic variant indel-19 of *CAPN10* gene and polycystic ovary syndrome in women of reproductive age.

Material and methods: This study included 101 women (55 with polycystic ovary syndrome and 46 without polycystic ovary syndrome). The genetic variant indel-19 was identified by electrophoresis of the amplified fragments by PCR, and the SNP-63 by PCR-RFLP.

Results: The allele and genotype frequencies of the two variants do not differ significantly between women with polycystic ovary syndrome and the control women group. The haplotype 21 (defined by the insertion allele of indel-19 variant and C allele of SNP-63) was found with higher frequency in both study groups, being more frequent in the polycystic ovary syndrome patients group, however, this difference was not statistically significant.

Conclusions: The results suggest that SNP-63 and indel-19 variant of *CAPN10* gene do not represent a risk factor for polycystic ovary syndrome in our patient group.

All Rights Reserved © 2015 Academia Mexicana de Cirugía A.C. This is an open access item distributed under the Creative Commons CC License BY-NC-ND 4.0.

Antecedentes

El síndrome de ovario poliquístico es un desorden endocrino heterogéneo considerado como la causa más común de anovulación, hiperandrogenismo e infertilidad en mujeres en edad reproductiva¹. Otras de las principales características clínicas del síndrome de ovario poliquístico son la obesidad (principalmente del segmento superior) y anormalidades metabólicas, tales como hiperinsulinemia y resistencia a la insulina, lo que constituye un factor de riesgo para desarrollar diabetes mellitus tipo 2 y enfermedad cardiovascular^{2,3}.

La prevalencia del síndrome de ovario poliquístico en diferentes poblaciones es del 3-7% en mujeres en edad reproductiva y en mujeres con hiperandrogenismo es del 60-80%⁴. En México se ha reportado una prevalencia del 6%⁵.

La fisiopatología del síndrome de ovario poliquístico es compleja; sin embargo, las 2 principales alteraciones hormonales observadas en las pacientes con síndrome de ovario poliquístico incluyen: la elevación de los niveles circulantes de la hormona luteinizante y de la insulina (hiperinsulinemia); de hecho, se ha sugerido que existe sinergismo entre ambas, por lo que la hiperestimulación ovárica por la insulina provocaría hiperandrogenismo². Se ha considerado que el síndrome de ovario poliquístico es un trastorno con un componente genético en su etiología y esta condición ha sido apoyada por la marcada agregación familiar y porque se ha documentado que el grado de concordancia es mayor en las

gemelas monocigotas que en las dicigotas². Las teorías con respecto al modo de herencia del síndrome de ovario poliquístico incluyen un modelo multifactorial en donde la interacción de factores ambientales (nutrición y actividad física) y un grupo de genes causales (genes candidatos de susceptibilidad) contribuyen a su variabilidad fenotípica⁶.

La asociación del síndrome de ovario poliquístico con resistencia a la insulina y riesgo para desarrollar diabetes mellitus tipo 2 condujo a suponer que el defecto primario causante de este síndrome podría residir en alguno de los mediadores de la ruta metabólica de la respuesta a la insulina⁷. Desde que el gen de la calpaína-10 (*CAPN10*) fue identificado por Horikawa et al.⁸ en el año 2000 como el primer gen asociado a diabetes mellitus tipo 2, surgió el interés por investigar su posible relación con el síndrome de ovario poliquístico, debido a la participación documentada del producto proteico de este gen en la vía de señalización de la insulina^{6,7,9-11}.

La calpaína-10 es una cisteína-proteasa no lisosomal activada por calcio, perteneciente al grupo de calpaínas atípicas por carecer del dominio IV^{8,12}. Esta calpaína se expresa en diferentes tejidos, tales como islotes pancreáticos, músculo esquelético, hígado y adipocitos¹³. Aunque su función específica aún no ha sido totalmente esclarecida, se ha propuesto que la calpaína-10 es una molécula importante en la función de las células β del páncreas, ya que se ha demostrado que regula la exocitosis de los gránulos secretores de insulina^{14,15}.

También se ha indicado que la calpaína-10 facilita la translocación de GLUT4 a través de un efecto distal sobre la vía de acción de la insulina. Además, la calpaína-10 también ha sido implicada en la reorganización del citoesqueleto de actina que acompaña tanto a la translocación de vesículas GLUT 4 como a la secreción de insulina^{14,16}.

El *CAPN10* se localiza en la región distal del brazo largo del cromosoma 2 (2q37.3), y abarca 65,674 nucleótidos en longitud, distribuidos en 15 exones y 14 intrones^{14,16}. De las variantes que han sido identificadas en el gen *CAPN10*, destacan un SNP localizado en el intrón 3, el SNP-43 (G>A; rs3792267), y otro localizado en el intrón 13, el SNP-63 (C>T; rs5030952), así como una inserción/delección de 32 pb, referida en la literatura médica como SNP-19, presente en el intrón 6 (variante indel-19; rs3842570), ya que se ha descrito que, de manera independiente o como haplotipo, contribuyen a la susceptibilidad a diabetes mellitus tipo 2 en diversas poblaciones^{8,17}. Algunos estudios se han centrado en la relación del síndrome de ovario poliquístico con variantes en el gen *CAPN10*^{1,6,9-11,18-24}; sin embargo, la influencia de las variaciones genéticas en la susceptibilidad para el desarrollo de patologías multifactoriales como síndrome de ovario poliquístico parece diferir entre poblaciones; por lo mismo, el objetivo de este estudio fue analizar la distribución de alelos y genotipos de 2 de las variantes más comunes del gen *CAPN10* (el SNP-63 y la variante indel-19) en pacientes con síndrome de ovario poliquístico y en mujeres sin síndrome de ovario poliquístico para evaluar si existe asociación entre este síndrome y las 2 variantes en mujeres en edad reproductiva.

Material y métodos

Se incluyó en el estudio a un total de 101 mujeres (55 con diagnóstico de síndrome de ovario poliquístico y 46 sin síndrome de ovario poliquístico), todas ellas en edad reproductiva (18-38 años) y no emparentadas entre sí. Los tamaños de muestra para los 2 grupos de estudio (55 y 46) superan el mínimo (36 individuos) para un sistema de polimorfismos bialélicos (α 0.05; p = 0.05) de acuerdo a Chakraborty²⁵.

Todas las mujeres incluidas en el estudio eran mestizas, residentes del estado de Jalisco. Previo a la firma de la carta de consentimiento informado de participación en el estudio, las mujeres que aceptaron participar fueron informadas acerca de la finalidad, los beneficios y los procedimientos que se llevaron a cabo en el proyecto. El protocolo de estudio fue conducido de acuerdo con la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité Local de Investigación y Ética del Instituto Mexicano del Seguro Social (#2005/1/1/064).

Las pacientes con síndrome de ovario poliquístico fueron consecutivamente captadas en los servicios de Fertilidad y Endocrinología de la Unidad Médica de Alta Especialidad del Hospital de Ginecología y Obstetricia del Centro Médico Nacional de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social. El diagnóstico de síndrome de ovario poliquístico fue de acuerdo con los criterios del consenso ASRM/ESHRE de Rotterdam revisados en 2003²⁶, complementado con el abordaje integral del síndrome de ovarios poliquísticos (Guía de práctica clínica, CIE-10:E28, Instituto Mexicano del Seguro Social)²⁷ (tabla 1). De las 55 pacientes con síndrome de ovario poliquístico, 44 cursaron con sobrepeso (índice de masa corporal > 25) y 11 presentaron obesidad (índice de masa corporal \geq 30).

Las mujeres del grupo control fueron seleccionadas al azar y tuvieron ciclos menstruales regulares entre 21-28 días, con un índice de masa corporal < 25 y sin historia personal y familiar de síndrome de ovario poliquístico, las cuales asistieron al hospital para chequeo general de salud.

No se incluyó en el estudio a mujeres embarazadas o que estuvieran bajo terapia anovulatoria, antiandrogénica o con corticoides. Las variables de confusión, como actividad física y régimen alimenticio, no fueron consideradas para este estudio.

Genotipificación

El ADN genómico fue extraído a partir de leucocitos de sangre periférica de acuerdo con un protocolo estándar²⁸, con algunas modificaciones, y fue almacenado en buffer Tris-EDTA pH 8.0 a -20 °C hasta su procesamiento.

Para la identificación del SNP-63 (C16378T), se amplificó un fragmento de 192 pb, el cual se sometió a digestión con 2 U de la enzima de restricción *HhaI* a 37 °C, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (New England Biolabs, Ipswich, EE. UU.), lo que generó un fragmento de 192 pb si el alelo T estaba presente y 2 fragmentos uno de 162, y otro de 30 pb si estaba presente el alelo C²⁹. Para la identificación de la variante indel-19, se amplificó un fragmento de 155 pb en presencia de la delección (3 repeticiones de 32 pb, alelo 2R), mientras que si estaba presente la inserción el fragmento amplificado era de 187 pb (2 repeticiones de 32 pb, alelo 3R)²⁹ (tabla 2). La diferencia en pares de bases de los productos de PCR y los productos de la digestión enzimática se analizó en geles de poliacrilamida al 6%, teñidos con nitrato de plata (fig. 1). Como control interno de calidad, se seleccionaron muestras con los genotipos de referencia para su corroboración por electroforesis capilar en un secuenciador automático Beckman-Coulter modelo CEQ8800 (California, EE. UU.).

Los haplotipos formados por los 2 polimorfismos del gen *CAPN10* fueron inferidos considerando la variante indel-19 en la primera posición y el SNP-63 en la segunda posición. Esto genera 4 posibles haplotipos: haplotipo 11 (alelo delección de la variante indel-19, alelo C del SNP-63), haplotipo 12 (alelo delección de la variante indel-19, alelo T del SNP-63), haplotipo 21 (alelo inserción de la variante indel-19, alelo C del SNP-63) y haplotipo 22 (alelo inserción de la variante indel-19, alelo T del SNP-63).

Análisis estadístico

Las frecuencias alélicas de las 2 variantes del gen *CAPN10* se determinaron por el método de conteo directo de los genotipos observados y se presentaron como frecuencias simples.

La comparación de las frecuencias alélicas, genotípicas y de haplotipos de la variante indel-19 y del SNP-63, entre las pacientes con síndrome de ovario poliquístico y las mujeres del grupo control, así como la determinación del equilibrio de Hardy-Weinberg se realizó mediante la prueba de la chi al cuadrado (χ^2). Se consideró como valor estadísticamente significativo si el valor de probabilidad fue menor de 0.05.

El análisis de los datos se realizó utilizando el programa estadístico RxC con 10,000 iteraciones³⁰. Para inferir los haplotipos se utilizó el programa HaplotypeReconstructor_v0.6.

Tabla 1 Criterios revisados de Rotterdam ESHRE/ASRM 2003 complementados con la GPC CIE-10: E28

Criterios diagnósticos (2 de 3 criterios)	
1. Oligo y/o anovulación	Historial de 8 o menos ciclos menstruales en un año o ciclos menstruales menores de 26 días o más de 35 días y P4 < 4 ng/ml
2. Signos de hiperandrogenismo	Clínico Hirsutismo ^a Acné Patrón alopecia masculino
	Bioquímico Testosterona total > 84.7 ng/dl Testosterona libre > 0.75 ng/dl Índice de testosterona libre/andrógeno DHEA DHEAS > 2459 ng/ml Relación LH/FSH > 2 Niveles disminuidos de globulina transportadora de esteroides sexuales
3. Ovarios poliquísticos	Presencia de 12 o más folículos en cada ovario con una medida de 2 a 9 mm de diámetro, y/o volumen ovárico incrementado > 10 mm (evaluación por ultrasonido)
Exclusión de otras patologías ^b	
Síndromes de resistencia a la insulina severa	Síndrome de Cushing HAIRAN Neoplasma secretor de andrógenos
Hiperplasia suprarrenal congénita	Deficiencia de 21 hidroxilasa (17 hidroxiprogesterona 2-3 ng/ml)
Tumores secretores de andrógenos	Tumores de Sertoli-Leydig, adenomas suprarrenales
Hiperprolactinemia	Elevación de niveles de prolactina
Hipogonadismo hipogodotrófico	Niveles séricos bajos de FSH y niveles disminuidos de E2
Falla ovárica prematura	Niveles séricos elevados de FSH y niveles disminuidos de E2
Estudios complementarios para evaluar comorbilidades	
Perfil de lípidos en ayuno	
Glucosa sérica en ayuno	
Insulina sérica en ayuno	
Razón glucosa/insulina < 4.5 indica resistencia a la insulina	
DHEA: dehidroepiandrosterona; DHEAS: sulfato de dehidroepiandrosterona; E2: estradiol; FSH: hormona foliculoestimulante; HAIRAN: síndrome acantosis <i>nigricans</i> resistente a la insulina hiperandrogénica; LH/FSH: relación hormona luteinizante/hormona foliculo estimulante; P4: progesterona.	
^a Evaluado por sistema de puntaje estandarizado (Ferriman-Gallwey).	
^b La exclusión de otras patologías forma parte de la evaluación inicial. Criterios revisados de Rotterdam ESHRE/ASRM 2003 ²⁶ . Abordaje integral del síndrome de ovarios poliquísticos ²⁷ .	

Resultados

La edad promedio de las mujeres del grupo control fue de 26 años; así mismo el 80% de estas mujeres presentaron ciclos menstruales de 25 a 28 días, mientras que en las pacientes con síndrome de ovario poliquístico el promedio de edad fue de 29 años y el 88% de ellas tuvieron ciclos menstruales de 30 a 60 días.

La distribución de alelos y genotipos del SNP-63 y la variante indel-19 en las pacientes con síndrome de ovario poliquístico y las mujeres del grupo control se muestran en la tabla 3. La distribución de genotipos observados de las 2 variantes estuvo de acuerdo con lo esperado con el equilibrio de Hardy-Weinberg ($p > 0.05$). Las frecuencias genotípicas de la variante indel-19 y del SNP-63 no difieren significativamente entre el grupo de pacientes con síndrome de ovario poliquístico y las mujeres del grupo control ($p = 0.7240$ y $p = 0.6793$, respectivamente). El análisis de las

frecuencias alélicas demostró que el alelo inserción de la variante indel-19 y el alelo C del SNP-63 se encontraron con mayor frecuencia en el grupo de pacientes con síndrome de ovario poliquístico comparado con el grupo control; sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p = 0.5587$ y $p = 0.5671$, respectivamente).

En la población de estudio se observaron los 4 posibles haplotipos. La combinación 21 (alelo inserción de la variante indel-19, alelo C del SNP-63) y el haplotipo 21/21 fueron los que se encontraron con mayor frecuencia en los 2 grupos de estudio (tabla 4), pero al comparar las frecuencias observadas del total de haplotipos y haplotipos entre el grupo de pacientes con síndrome de ovario poliquístico y el grupo control no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.8353$ y $p = 0.8231$, respectivamente).

De manera adicional, también se realizó la comparación de las frecuencias alélicas de la variante indel-19 y del SNP-

Tabla 2 Abordaje metodológico para la identificación de las dos variantes del gen *CAPN10*

Variante	Iniciadores	Fragmento amplificado	Enzima de restricción	Fragmentos esperados
SNP-63	Sentido 5'AAGGGGGGCCAGGGCCTGACGGGGGTGGCG3' Antisentido 5'AGCACTCCCAGCTCCTGATC3'	192 pb	<i>HhaI</i> GCG [^] C	Alelo C 162 +30 pb Alelo T 192 pb
Indel-19 inserción/ delección de 32 pb	Sentido 5'GTTTGGTTCTTTCAGCGTGGAG3' Antisentido 5'CATGAACCTGGCAGGGTCTAAG3'	155 pb 187 pb	-	Alelo Ins 187 pb Alelo Del 155 pb

pb: pares de bases.

63 observadas en la población aquí estudiada con las frecuencias descritas en otros estudios conducidos en poblaciones de América (Chile y Brasil), Asia (China, Corea, India y Turquía), y Europa (Alemania, España, e Inglaterra) (tabla 5).

Discusión

Se ha descrito la asociación del síndrome de ovario poliquístico con resistencia a la insulina y el riesgo para desarrollar diabetes mellitus tipo 2; el presente estudio se llevó a cabo para evaluar la posible asociación de este síndrome con 2 de los polimorfismos del gen *CAPN10* (variante indel-19 y SNP-63) implicados en el haplotipo de riesgo (121) para desarrollar diabetes mellitus tipo 2 en mexico-americanos⁸, y se encontró que la distribución de alelos y genotipos fue similar en pacientes con síndrome de ovario poliquístico y mujeres sin síndrome de ovario poliquístico, lo que permite sugerir que en nuestro grupo de pacientes la variante indel-19 y SNP-63 no representan un factor de riesgo para desarrollar síndrome de ovario poliquístico. Este hallazgo está de acuerdo con lo descrito en 2 estudios previos, uno

conducido en Inglaterra⁹ y el otro en Turquía¹⁸, en donde además de analizar el SNP-63 y la variante indel-19, analizaron otras 2 variantes del gen *CAPN10* (SNP-44 y SNP-43) y no hubo asociación de ninguna de las 4 variantes con síndrome de ovario poliquístico. Aun cuando existen varios estudios en los que se da evidencia de la implicación de variantes en el gen *CAPN10* en el desarrollo de síndrome de ovario poliquístico, la asociación no es siempre con la misma variante, ya que, por ejemplo, en mujeres alemanas se reportó la asociación de este síndrome con el SNP-56¹¹; en mujeres de España⁶, de Turquía¹⁹ y de India¹ la asociación fue con el SNP-44, mientras que en 2 poblaciones de América Latina, Chile²⁰ y Brasil²¹, la asociación fue con el SNP-43.

Existen relativamente pocos estudios en los que se haya investigado la relación entre el síndrome de ovario poliquístico y los haplotipos del gen *CAPN10*. En un estudio realizado en mujeres alemanas, en las que se analizaron 8 variantes del gen *CAPN10* (incluidos indel-19 y SNP-63), se encontró que el haplotipo TGA2AGCA representa un riesgo incrementado para síndrome de ovario poliquístico¹¹. En mujeres de India, donde se analizaron 5 variantes (también incluidos indel-19 y SNP-63), se encontró asociación significativa con

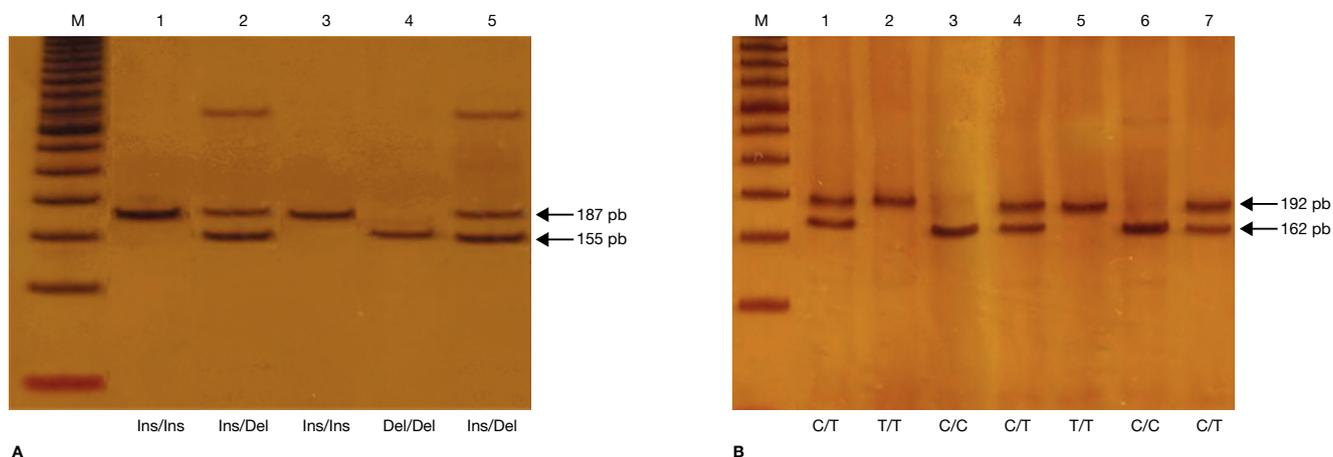


Figura 1. A) Genotipificación de la variante indel-19. Productos de PCR separados en gel de poliacrilamida al 6% teñido con nitrato de plata. M: marcador de peso molecular (escalera de ADN de 50 pb). Carriles 1 y 3 homocigoto Ins/Ins (fragmento de 187 pb); carriles 2 y 5 heterocigoto Ins/Del (fragmentos de 187 pb y 155 pb); carril 4 homocigoto Del/Del (fragmento de 155 pb). B) Genotipificación del SNP-63. Productos de PCR digeridos con la enzima *HhaI* separados en gel de poliacrilamida al 6% teñido con nitrato de plata. M: marcador de peso molecular (escalera de ADN de 50 pb). Carriles 3 y 6 homocigoto C/C (fragmento de 162 pb); carriles 1, 4 y 7 heterocigoto C/T (fragmentos de 192 pb y 162 pb); carriles 2 y 5 homocigoto T/T (fragmento de 192 pb).

Tabla 3 Distribución de alelos y genotipos del SNP-63 y la variante indel-19 en las pacientes con síndrome de ovario poliquístico y las mujeres del grupo control

Polimorfismo			Pacientes con SOP n (%)	Controles n (%)	Valor de p	OR, IC del 95%
Indel-19	Genotipo	Ins/Ins	21 (38)	16 (35)	0.7240	0.831
		Del/Ins	27 (49)	22 (48)		
		Del/Del	7 (13)	8 (17)		
	Alelo	Ins	69 (63)	54 (59)		
		Del	41 (37)	38 (41)		
SNP-63	Genotipo	C/C	38 (69)	30 (65)	0.6793	0.821
		C/T	17 (37)	15 (33)		
		T/T	0 (0)	1 (2)		
	Alelo	C	93 (85)	75 (82)		
		T	17 (15)	17 (18)		

Del: delección; n: número de sujetos de estudio (genotipo) o cromosomas (alelo); Ins: inserción; SOP: síndrome de ovario poliquístico.

Tabla 4 Distribución de haplotipos y diplotipos del SNP-63 y la variante indel-19 en pacientes con síndrome de ovario poliquístico y controles

		Pacientes con SOP n = 110 ^a		Grupo control n = 92 ^a		p
		n	(%)	n	(%)	
Haplotipos	21	68	(62)	54	(59)	0.8353
	22	25	(23)	21	(23)	
	11	16	(15)	17	(18)	
	12	1	(1)	0	(0)	
Diplotipos		n = 55		n = 46		0.8231
	21/21	20	(36)	16	(35)	
	21/22	15	(27)	13	(28)	
	21/11	12	(22)	9	(20)	
	21/12	1	(2)	0	(0)	
	22/22	3	(5)	1	(2)	
	22/11	4	(7)	6	(13)	
11/11	0	(0)	1	(2)		

SOP: síndrome de ovario poliquístico.

n: número de individuos; SOP: síndrome de ovario poliquístico.

^an: número de cromosomas.

el haplotipo 21121¹. En mujeres españolas, en las que se analizaron 4 variantes (SNP-44, SNP-43, indel-19 y SNP-43), se encontró asociación del haplotipo 1121 pero con hipercolesterolemia en pacientes con síndrome de ovario poliquístico¹⁰. En mujeres coreanas donde se analizaron solo 3 variantes (SNP-43, indel-19 y SNP-63), la asociación con síndrome de ovario poliquístico se encontró con el haplotipo 1112²². En el presente estudio, al analizar solo 2 variantes, el haplotipo que se encontró con mayor frecuencia en las pacientes con síndrome de ovario poliquístico fue el haplotipo

21 (alelo inserción de la variante indel-19, alelo C del SNP-63), el cual es parcialmente similar al haplotipo 121 descrito por Horikawa et al., en población mexicana-americana⁸, sin embargo, no se alcanzó valor estadístico significativo cuando se compararon las frecuencias haplotípicas con el grupo control, descartando así su posible asociación con síndrome de ovario poliquístico en nuestro grupo de pacientes estudiadas. Por lo anterior, es necesario analizar otras variantes en el gen *CAPN10* para investigar la contribución de un haplotipo extendido en el desarrollo de este síndrome.

Aun cuando nuestros resultados sugieren la no implicación en el desarrollo de síndrome de ovario poliquístico de la variante indel-19 y el SNP-63 del gen *CAPN10*, ya sea de manera individual o como haplotipo, el presente estudio es de particular importancia ya que, hasta nuestro conocimiento, este es el primer estudio en el que se investiga la posible asociación de variantes del gen *CAPN10* y haplotipos con síndrome de ovario poliquístico en población mexicana.

El análisis comparativo de las frecuencias de alelos entre diferentes poblaciones demostró que las frecuencias alélicas de la variante indel-19 en nuestro grupo de pacientes con síndrome de ovario poliquístico fueron diferentes de las encontradas en pacientes con síndrome de ovario poliquístico de la población de Brasil²¹, así mismo se observaron diferencias entre las frecuencias de nuestro grupo control con el grupo control de la población de la India¹. En relación con el SNP-63, además de que también se encontraron diferencias cuando se compararon las frecuencias alélicas observadas, tanto en nuestro grupo de pacientes con síndrome de ovario poliquístico, como en nuestro grupo control con las frecuencias reportadas en la India¹, también se encontraron diferencias con las frecuencias reportadas en el estudio realizado en Inglaterra⁹ y con el estudio conducido en población española, solo que con esta última población las diferencias fueron solo entre los grupos controles⁶. Las diferencias encontradas con Inglaterra y la India pueden ser causa de la poca o casi nula migración documentada de los ingleses y de los hindúes a México. El análisis de varios polimorfismos genéticos en poblaciones de Europa y de América, incluido Brasil, han dado evidencia de la variación en la

Tabla 5 Frecuencias alélicas de la variante indel-19 y el SNP-63 del gen *CAPN10* en diferentes poblaciones

Continente	Población de estudio	Control/SOP	Ins/Del-19				SNP-63			
			Alelo Ins		Alelo Del		Alelo C		Alelo T	
			Control	SOP	Control	SOP	Control	SOP	Control	SOP
América	Presente estudio ^{a*}	46/55	0.59	0.63	0.41	0.37	0.82	0.85	0.18	0.15
	Chilenos ²⁰	70/50	0.59	0.61	0.41	0.39	0.81	0.79	0.19	0.21
	Brasileños ²¹	59	ND	0.37*	ND	0.63*	ND	0.87	ND	0.13
Asia	Hindúes ¹	298/248	0.45*	0.54	0.55*	0.46	0.95*	0.95*	0.05*	0.05*
	Turquía ¹⁸	50/44	0.56	0.55	0.44	0.45	0.86	0.92	0.14	0.08
Europa	Inglaterra ⁹	525/185	0.61	0.59	0.39	0.41	0.92*	0.92*	0.08*	0.08*
	Españoles ⁶	92/55	0.65	0.53	0.35	0.47	0.92*	0.88	0.08*	0.12

ND: no disponible; SOP: síndrome de ovario poliquístico.

^a Grupo de referencia.

* $p < 0.05$.

estructura genética de las diferentes poblaciones, posiblemente como resultado de las distintas mezclas interetnias³¹⁻³⁴. Nuestros resultados sugieren que la población mestiza mexicana tiene características genéticas particulares que la diferencian de otras poblaciones de todo el mundo.

Los factores genéticos que están implicados en el síndrome de ovario poliquístico y sus distintas expresiones podrían explicar la variación fenotípica en la presentación clínica del síndrome, la cual es fisiológicamente heterogénea y controversial en los determinantes genéticos, ya que en cada población se han encontrado resultados diferentes analizando incluso el mismo polimorfismo. Las diferencias étnicas entre los sujetos de estudio parecen estar contribuyendo a estas diferencias.

Por lo expuesto anteriormente, y debido a la etiología multifactorial del síndrome de ovario poliquístico, se debe considerar como mecanismos moleculares de este síndrome la sumatoria de factores genéticos de riesgo, ya que el efecto de un solo gen no es suficiente para favorecer el desarrollo del desbalance endocrino-metabólico que presentan las pacientes, en interacción con factores ambientales desencadenantes que contribuyen a la aparición del síndrome.

Conclusiones

La distribución de alelos, de genotipos y de haplotipos de la variante indel-19 y del SNP-63 no difieren significativamente entre las pacientes con síndrome de ovario poliquístico y las mujeres del grupo control, por lo que estos hallazgos sugieren que estas 2 variantes del gen *CAPN10* no representan un factor de riesgo para el síndrome de ovario poliquístico, por lo que no pueden ser utilizados en la práctica clínica como marcadores de riesgo genético en la población estudiada. El análisis poblacional mostró que se presentan diferencias con la población de Brasil, España, Inglaterra e India, lo que indica que existe heterogeneidad en las frecuencias de las variantes del gen *CAPN10* entre diferentes poblaciones.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Este trabajo fue parcialmente apoyado por el Fondo de Investigación en Salud, del Instituto Mexicano del Seguro Social con número de registro 2005/1/1/064. Queremos agradecer al Dr. Sergio Alberto Sánchez Walle por el apoyo brindado para la captación de las mujeres participantes en el estudio.

Bibliografía

- Dasgupta S, Sirisha PV, Neelaveni K, Anuradha K, Reddy BM. Association of *CAPN10* SNPs and haplotypes with polycystic ovary syndrome among south indian women. *PLoS One*. 2012;7(2):e32192.
- Moran C, Hernández M, Cavioto M, Porias LH, Malaca J, Bermúdez JA. Síndrome de ovario poliquístico. Posición de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología. *Rev Endocrinol Nutrición*. 2006;14(1):7-12.
- Spritzer PM. Polycystic ovary syndrome: Reviewing diagnosis and management of metabolic disturbances. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2014;58(2):182-187.
- Azziz R, Woods KS, Reyna R, Key TJ, Knochenhauer ES, Yildiz BO. The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *J Clin Endocr Metab*. 2004;89(6):2745-2749.
- Moran C, Tena G, Moran S, Ruiz P, Reyna R, Duque X. Prevalence of polycystic ovary syndrome and related disorders in mexican women. *Gynecol Obstet Invest*. 2010;69(4):274-280.
- Gonzalez A, Abril E, Roca A, Aragón MJ, Figueroa MJ, Velarde P, et al. Comment: *CAPN10* alleles are associated with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(8):3971-3976.
- Ehrmann DA, Schwarz PEH, 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(4):1669-1673.

8. 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(6):163-175.
9. Haddad L, Evans JC, Gharani N, Robertson C, Rush K, Wiltshire S, et al. Variation within the type 2 diabetes susceptibility gene calpain-10 and polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(6):2606-2610.
10. Gonzalez A, Abril E, Roca A, Aragón MJ, Figueroa MJ, Velarde P, et al. Specific CAPN10 gene haplotypes influence the clinical profile of polycystic ovary patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(11):5529-5536.
11. 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(3):E836-844.
12. Suzuki K, Hata S, Kawabata Y, Sorimachi H. Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes.* 2004;53 Suppl 1:S12-18.
13. Ezzidi I, Turki A, Messaoudi S, Chaieb M, Kacem M, Al-Khateeb GM, et al. Common polymorphisms of calpain-10 and the risk of type 2 diabetes in a tunisian arab population: A case-control study. *BMC Med Genet.* 2010;11:75.
14. Turner MD. Coordinated control of both insulin secretion and insulin action through calpain-10-mediated regulation of exocytosis? *Mol Genet Metab.* 2007;91(4):305-307.
15. Ridderstråle M, Nilsson E. Type 2 diabetes candidate gene CAPN10: First, but not last. *Curr Hypertens Rep.* 2008;10(1):19-24.
16. Dong B, Liu R. Characterization of endogenous and recombinant human calpain-10. *Biochimie.* 2008;90(9):1362-1371.
17. Cox NJ, Hayes MG, Roe CA, Tsuchiya T, Bell GI. Linkage of calpain 10 to type 2 diabetes: The biological rationale. *Diabetes.* 2004;53 Suppl 1:S19-25.
18. Unsal T, Konac E, Yesilkaya E, Yilmaz A, Bideci A, Ilke Onen H, et al. Genetic polymorphisms of FSHR, CYP17, CYP1A1, CAPN10, INSR, SERPINE1 genes in adolescent girls with polycystic ovary syndrome. *J Assist Reprod Genet.* 2009;26(4):205-216.
19. Yilmaz M, Yurtçu E, Demirci H, Ergün MA, Ersoy R, Karakoç A, et al. Calpain 10 gene single-nucleotide 44 polymorphism may have an influence on clinical and metabolic features in patients with polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest.* 2009;32(1):13-17.
20. Márquez JL, Pacheco A, Valdés P, Salazar LA. Association Between CAPN10 UCSNP-43 gene polymorphism and polycystic ovary syndrome in chilean women. *Clin Chim Acta.* 2008;398(1-2):5-9.
21. 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(3):173-178.
22. Lee JY, Lee WJ, Hur SE, Lee CM, Sung YA, Chung HW. 111/121 diplotype of calpain-10 is associated with the risk of polycystic ovary syndrome in korean women. *Fertil Steril.* 2009;92(2):830-833.
23. Haap M, Machicao F, Stefan N, Thamer C, Tschritter O, Schnuck F, et al. Genetic determinants of insulin action in polycystic ovary syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2005;113(5):275-281.
24. Diao XH, Shi YH, Gao Q, Wang LC, Tang R, Chen ZJ. Relationship between single nucleotide polymorphism-56 of calpain-10 gene and glucose and lipid metabolism in polycystic ovary syndrome patients. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2008;43(2):106-109.
25. Chakraborty R. Sample size requirements for addressing the population genetic issues of forensic use of DNA typing. *Hum Biol.* 1992;64(2):141-159.
26. 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(1):19-25.
27. Abordaje integral del síndrome de ovarios poliquisticos. México: Instituto Mexicano del Seguro Social, 2010. Guía de Práctica Clínica, CIE-10:E28 [consultado 10 Nov 2010]. Disponible en: <http://www.adamedfarma.es/wp-content/uploads/2014/03/1.pdf>
28. Gustincich S, Manfioletti G, del Sal G, Schneider C, Carninci P. A fast method for high quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques.* 1991;11(3):298-300.
29. Orho-Melander M, Klannemark M, Svensson MK, Ridderstråle M, Lindgren CM, Groop L. Variants in the calpain-10 gene predispose to insulin resistance and elevated free fatty acid levels. *Diabetes.* 2002;51(8):2658-2664.
30. R x C a Windows(TM) Program for the Analysis of Contingency Tables via the Metropolis Algorithm [consultado 24 Jun 2012]. Disponible en: http://www.marksgeneticsoftware.net/_vti_bin/shtml.exe/rxc.htm
31. Barros-Núñez P, Rosales-Reynoso MA, Sandoval L, Romero-Espinosa P, Troyo-Sanromán R, Ibarra B. Genetic Variation of the FMR1 gene among four mexican populations: Mestizo, huichol, purepecha, and tarahumara. *Am J Hum Biol.* 2008;20(3):259-263.
32. Gómez M, Clark RM, Nath SK, Bhatti S, Sharma R, Alonso E, et al. Genetic admixture of European FRDA Genes is the cause of Friedreich ataxia in the Mexican population. *Genomics.* 2004;84(5):779-784.
33. Gaspar PA, Hutz MH, Salzano FM, Hill K, Hurtado AM, Petzl-Erler ML, et al. Polymorphisms of CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, and TP53 genes in Amerindians. *Am J Phys Anthropol.* 2002;119(3):249-256.
34. Contreras AV, Monge-Cazares T, Alfaro-Ruiz L, Hernandez-Morales S, Miranda-Ortiz H, Carrillo-Sanchez K, et al. Resequencing, haplotype construction and identification of novel variants of CYP2D6 in Mexican mestizos. *Pharmacogenomics.* 2011;12(5):745-756.