

Artículo Original

Relación entre el polimorfismo -34 Bp de la región promotora del Gen CYP17 con el perfil hormonal y metabólico en mujeres con diabetes mellitus tipo 1

Francisco Pérez B.¹, Jacqueline Mohr², Francisca Eyzaguirre C.², Patricia López C.², Germán Iñiguez V.², Fernando Cassorla G.² y Ethel Codner.²

Relationship of -34 Bp polymorphism in the promoter of Cyp17 Gene with hormonal and metabolic profile in women with type 1 diabetes mellitus

¹Laboratorio de Genómica Nutricional
Departamento de Nutrición. Facultad
de Medicina. Universidad de Chile.
²Instituto de Investigaciones Materno
Infantil (IDIMI), Facultad de Medicina,
Universidad de Chile.

(Proyecto Fondecyt 1050452).

Correspondencia:
Dr. Francisco Pérez Bravo
Laboratorio de Genómica Nutricional
Departamento de Nutrición.
Facultad de Medicina.
Universidad de Chile.
Avda. Independencia 1027. Santiago.
E-mail: fperez@med.uchile.cl

Recibido: 07 Abril de 2009
Aceptado: 04 Mayo de 2009

*The P450c17a enzyme has a central role in ovarian hyperandrogenism, which is a characteristic of polycystic ovary syndrome (PCOS). Several studies have suggested a possible role for the CYP17 gene, which codes for the enzyme P450c17a and the -34bp T-C polymorphism in the development of hyperandrogenism. The presence of the Cytosine, known as A2 allele, has been associated with hyperandrogenism in patients with PCOS. **Objective:** To evaluate the frequency and association of the -34bp polymorphism in the CYP17 gene and determine its association with hormonal and metabolic characteristics in women with DM1. **Patients and Methods:** The CYP17 polymorphism was studied in 72 DM1 and 71 control women by PCR and RFLP analysis. The CYP17 genetic dosage was compared with the antropometrical characteristics and the serum concentrations of testosterone, androstenedione, DHEAS and 17OH progesterone in women with DM1. **Results:** Genotype A2/A2 was present in 20.8% and 7.1% of DM1 and controls, respectively ($p = 0,034$). Allele A2 was present in 40.3% and 27.5% of DM1 and healthy women, respectively ($p = 0,031$). No association between CYP17 genotypes and hormonal or metabolic characteristics was observed. **Conclusion:** This study shows that the frequency of the A2/A2 genotype was higher in women with DM1 than in the control group. However, no association between the presence of the polymorphism and circulating steroid levels or BMI was observed.*

Key words: Type 1 diabetes, CYP17 polymorphism, Genetic Markers, Association Study, Hyperandrogenism.

Introducción

La diabetes mellitus tipo 1 (DM1) es una de las enfermedades crónicas de mayor importancia en la niñez. En los últimos años la mayoría de los países en el mundo han informado de un sostenido y creciente aumento en sus tasas de incidencia. Esta patología presenta una compleja etiología en la cual se ha descrito la participación de factores genéticos y ambientales^{1,2}.

El tratamiento actual con insulina, dieta y estricto control glicémico ha elevado la sobrevida de los pacientes con DM1; sin embargo, también han aparecido una serie de complicaciones crónicas derivadas del tratamiento³⁻⁵, entre ellas la obesidad y el síndrome de ovario poliquístico (SOP)⁶⁻¹².

Dentro de los múltiples genes que se han estudiado en el campo de las hormonas sexuales, el gen CYP17, el cual codifica para el complejo citocromo P450c17a, que involucra las actividades enzimáticas 17a-hidroxilasa y 17,20-liasa, ha sido intensamente estudiado en diversas patologías y modelos metabólicos como el cáncer de mamas, el SOP, el hiperandrogenismo y otros¹³⁻¹⁵. Esta enzima tiene un rol fundamental en la regulación de la síntesis de los andrógenos ováricos y suprarrenales. El gen que codifica para dicha enzima se localiza en el brazo largo del cromosoma 10 y se ha descrito un polimorfismo de nucleótido simple (SNP) en su región promotora que se encuentra a -34 bases del sitio de iniciación, correspondiente a una sustitución de T/C que genera un nuevo sitio de unión al factor de transcripción

Artículo Original

Sp1, fenómeno que se postula como una de las causas del aumento de la expresión de dicho gen (A1 presenta T y A2 presenta C). La presencia de la variante alélica A2 ha sido asociada con un exceso de andrógenos circulantes. Al respecto, existen publicaciones con resultados divergentes en relación al papel de este polimorfismo en el desarrollo del hiperandrogenismo^{16,17}.

Varios estudios han observado un incremento en la prevalencia de hiperandrogenismo en mujeres con DM1, pero no existen estudios que analicen el posible papel de este polimorfismo (-34 bp) en la DM1. El tratamiento con insulina efectuado en mujeres con DM1 podría gatillar una sobre-expresión de CYP17, lo que podría conducir a una mayor producción de andrógenos por el ovario¹⁸⁻²¹.

El objetivo de este estudio fue evaluar la frecuencia del polimorfismo del gen -34 bp CYP17 y determinar su posible asociación con las características metabólicas y hormonales en mujeres con DM1.

Sujetos y Método

El estudio incluyó un total de 143 mujeres: 72 con DM1 y 71 controles. Se tabularon mediciones antropométricas de peso, talla e índice de masa corporal. En el grupo de pacientes diabéticas se registró la hemoglobina glicosilada (HbA1C) promedio del último año, duración de la enfermedad y dosis diaria de insulina utilizada. El protocolo de esta investigación fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital San Borja Arriarán y todos los pacientes y controles entregaron su consentimiento por escrito. Se obtuvo una muestra de sangre en ayuna para estudio hormonal y obtención de DNA. En las mujeres post-menárquicas la muestra fue obtenida en fase folicular (días 1-7 del ciclo menstrual). Se determinó la concentración sérica de esteroides sexuales: DHEAS, androstenediona, 17 OH progesterona y testosterona mediante RIA convencional²².

El DNA genómico fue aislado de una muestra de 5 mL de sangre periférica a través del método de Schomzynski. Mediante PCR se amplificó un fragmento de DNA de 459 bp que contenía el sitio -34bp donde se encuentra la

transición T → C utilizando los siguientes partidores: (sense) 5'-CAT TGGCACTCTGGAGTC-3' y (antisense) 5'-AGG CTCTTGGGGTACTTG-3'. La reacción de PCR se realizó en condiciones estandarizadas: volumen final de 25 µL, 80 ng de DNA genómico; 10 pmol cada partidor, 100 µM de cada dNTP, 50 µM de MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerasa. La reacción de PCR se realizó en 35 ciclos constituidos por: 1 minuto de denaturación a 94° C, 1 minuto de alineamiento a 57° C y 1 minuto de extensión a 72° C. Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 2% con bromuro de etidio. La sustitución C por T en la posición -34 bp del gen CYP17 se realizó a través de corte con la enzima de restricción MspA1 bajo las siguientes condiciones: 10 µL de producto de amplificación, incubación a 37° C durante 1 hora con 4U de MspA1. El reconocimiento del sitio de restricción da lugar a la generación de dos fragmentos de 335 bp y 124 bp los cuales se visualizaron mediante geles de agarosa al 2% con bromuro de etidio^{18,19}.

Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa STATA 11.0. La comparación de los perfiles hormonales (testosterona, androstenediona, DEAS y 17 OH-progesterona), edad, antigüedad de la DM1 e IMC, se llevó a cabo mediante ANOVA. Las comparaciones de frecuencia alélicas y genotípicas entre casos y controles fueron analizadas mediante las pruebas de χ^2 y Prueba exacta de Fisher utilizando el programa SHESIS (URL: <http://202.120.7.14/analysis/myAnalysis.php>). Se evaluó la concordancia de las frecuencias genotípicas con respecto al equilibrio de Hardy-Weinberg mediante la prueba exacta de χ^2 . Un valor de p menor de 0,05 fue considerado como estadísticamente significativo.

Resultados

El análisis de polimorfismo para el gen CYP17 se muestra en la Tabla 1. La distribución alélica y genotípica se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg. El Genotipo A2/A2 fue más prevalente en el grupo DM1 (20,8%) comparado

Tabla 1. Distribución de genotipos y frecuencia alélica para el polimorfismo -34 bp del gen CYP17 en mujeres con DM1 y controles

	Mujeres DM1 (n = 72)		Mujeres Controles (n = 71)		P
Genotipo					
A1/A1	29	0,403	37	0,521	NS
A1/A2	28	0,389	29	0,408	NS
A2/A2	15	0,208	5	0,071	0,034
Frecuencia alélica					
% de A1	59,7		72,5		
% de A2	40,3		27,5		0,031

Artículo Original

Tabla 2. Características clínicas, antropométricas y hormonales de mujeres con DM1 estratificadas de acuerdo al genotipo CYP17

	DM1 (A1/A1) (n = 29)	DM1 (A1/A2) (n = 28)	DM1 (A2/A2) (n = 15)
Edad (años)	17,5 ± 8,5	18,1 ± 7,2	19,8 ± 9,8
Duración DM1 (años)	10,0 ± 7,6	10,0 ± 6,6	12,9 ± 8,3
HbA1c (%)	8,6 ± 1,6	8,2 ± 1,9	8,7 ± 2,0
Dosis diaria de insulina (U/kg/día)	1,1 ± 0,3	1,2 ± 0,4	0,9 ± 0,3
IMC (kg/m ²)	24,2 ± 3,4	22,5 ± 3,1	23,1 ± 6,3
DHEAS (mg/dL)	1.136 ± 631	1.210 ± 657	1.245 ± 530
Androstenodiona (ng/mL)	1,9 ± 0,9	1,6 ± 0,7	1,6 ± 0,8
17-OH Progest. (ng/mL)	1,9 ± 1,4	1,3 ± 0,7	1,3 ± 0,6
Testosterona (ng/mL)	0,5 ± 0,3	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,2

Tabla 3. Características antropométricas y hormonales de mujeres controles de acuerdo a la estratificación por genotipo CYP17

	DM1 (A1/A1) (n = 37)	DM1 (A1/A2) (n = 29)	DM1 (A2/A2) (n = 5)
Edad (años)	20,1 ± 9,9	19,9 ± 10	13,3 ± 3,3
IMC (kg/m ²)	22,9 ± 4,5	22,5 ± 4,5	20,0 ± 2,6
DHEAS (mg/dL)	1.079 ± 659	971 ± 662	990 ± 564
Androstenodiona (ng/mL)	1,2 ± 0,6	1,1 ± 0,6	1,0 ± 0,5
17-OH Progest. (ng/mL)	1,2 ± 0,5	1,1 ± 0,4	0,9 ± 0,4
Testosterona (ng/mL)	0,6 ± 0,4	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,1

con la población de mujeres controles (7,1%; $p = 0,034$). El genotipo A1/A1 fue más frecuente en la población control, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa. La frecuencia del alelo A2 fue mayor en DM1 comparado con los controles (40,3% vs 27,5%, respectivamente, $p = 0,031$).

La Tabla 2 muestra los parámetros clínicos y hormonales en el grupo de mujeres con DM1 según su genotipo. Las características clínicas y hormonales no fueron diferentes según el genotipo CYP17 y tampoco se observaron diferencias en los parámetros clínicos ni hormonales según el genotipo CYP17 en las mujeres controles (Tabla 3).

Discusión

Este estudio analizó la frecuencia de la sustitución T → C (polimorfismo -34 bp del gen *CYP17*) en un grupo de mujeres chilenas con DM1. Nuestros resultados mostraron una mayor frecuencia del genotipo A2/A2 en el grupo de mujeres con DM1 en comparación con el grupo control y por consiguiente una mayor frecuencia alélica A2 entre las diabéticas.

Debido a la asociación de DM1 con hiperandrogenismo

y SOP, la propuesta de este estudio fue analizar la posible relación entre la variante genética -34 bp del gen *CYP17* y DM1, dado que en la literatura existe información contradictoria respecto a la asociación de este polimorfismo con el hiperandrogenismo y el SOP^{18,19}. Hace algunos años, Diamati-Kandarakis y cols¹⁹, describieron la distribución de este polimorfismo entre mujeres controles y mujeres con SOP y asociaron la presencia del alelo A2 del gen *CYP17* con niveles aumentados de testosterona. Este estudio, mostró una significativa mayor frecuencia del alelo A2 en el grupo de mujeres con DM1 respecto al grupo control (40,3% versus 27,5%; $p = 0,031$). No obstante, corresponde a una distribución que se encuentra dentro del porcentaje de alrededor de 37-44% descrito en otras poblaciones^{23,24}.

A pesar de la asociación inicialmente descrita por el estudio Griego¹⁹, otras investigaciones han sido incapaces de confirmar esta asociación^{16,18}. Estudios recientes han relacionado al polimorfismo del gen *CYP17* con alteraciones metabólicas²⁵. Recientemente, Echiburú y col²⁶, analizaron la frecuencia de este polimorfismo en población chilena con SOP, no encontrando diferencias en la distribución alélica y genotípica comparado con controles, aunque se postuló una posible asociación del alelo A2 con aumento del peso

corporal, adiposidad abdominal y alteraciones metabólicas. Un reciente estudio realizado en Argentina demostró una leve asociación de este polimorfismo en pacientes con SOP, sugiriendo un papel menor en el fenotipo hiperandrogénico asociado al SOP²⁷, aunque este efecto no ha sido observado en la población coreana²⁸. Por último, este polimorfismo ha mostrado también resultados contradictorios cuando se ha intentado asociarlo con la edad de la menarquia^{29,30}.

Diversas observaciones clínicas y experimentales apoyan la hipótesis de que la insulina tiene una importante actividad gonadotrófica. Esta actividad podría explicar, en parte, una serie de alteraciones clínico-metabólicas que se pueden observar en la DM1 tales como hipofunción ovárica, amenorrea primaria, anovulación, menarquia tardía y baja tasa de embarazos. La mayor frecuencia del alelo deletéreo A2 en este grupo podría estar condicionando un comportamiento distinto de la célula frente al estímulo insulínico, aunque no observamos un perfil hormonal diferente al comparar pacientes portadoras y no portadoras.

En resumen, este estudio describe una mayor frecuencia del alelo A2 del gen CYP17 en un grupo de mujeres chilenas con DM1. Sin embargo, no se observaron asociaciones significativas entre los portadores de este alelo A2 y niveles aumentados de andrógenos o alteraciones del control metabólico en pacientes con DM1.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado a través del Proyecto FONDECYT 1050452 (Dra. Ethel Codner). Los autores agradecen a la Sra. Alejandra Ávila el excelente apoyo de enfermería, y a todas las pacientes y controles que participaron de este estudio y el apoyo logístico aportado por el Hospital San Borja Arriarán. Este trabajo constituyó la estadía de investigación en Chile de la alumna Jacqueline Mohr proveniente de la Universidad de Leiden, Holanda.

Referencias

1. Skyler JS. 2008. Type 1 Diabetes TrialNet Study Group. Update on worldwide efforts to prevent type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 1150: 190-196.
2. Hawa MI, Beyan H, Buckley LR, Graham RD. 2002. Impact of genetic and non-genetic factors in type 1 diabetes. *Am J Med Genet* 115: 8-17.
3. Jacob AN, Salinas K, Adams-Huet B, Raskin P. 2006 Potential causes of weight gain in type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab* 8: 404-411.
4. Libman IM, Pietropaolo M, Arslanian SA, LaPorte RE, Becker DJ. 2003. Changing prevalence of overweight children and adolescents at onset of insulin-treated diabetes. *Diabetes Care* 26: 2871-2875.
5. De Block CE, De Leeuw IH, Van Gaal LF. 2005. Impact of overweight on chronic microvascular complications in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* 28: 1649-1655.
6. Thorn LM, Forsblom C, Fagerudd J, Thomas MC, Pettersson-Fernholm K, Saraheimo M, et al. 2005. Metabolic syndrome in type 1 diabetes: association with diabetic nephropathy and glycemic control: the FinnDiane study). *Diabetes Care* 28: 2019-2024.
7. McGill M, Molyneaux L, Twigg SM, Yue DK. 2008. The metabolic syndrome in type 1 diabetes: does it exist and does it matter? *J Diabetes Complications* 22: 18-23.
8. Sandhu N, Witmans MB, Lemay JF, Crawford S, Jadavji N, Pacaud D. 2008. Prevalence of overweight and obesity in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab* 21: 631-640.
9. Ljungkrantz M, Ludvigsson J, Samuelsson U. 2008. Type 1 diabetes: increased height and weight gains in early childhood. *Pediatr Diabetes* 9: 50-56.
10. Escobar-Morreale HF, Roldan B, Barrio R, Alonso M, Sancho J, de la Calle H, et al. 2000. High prevalence of the polycystic ovary syndrome and hirsutism in women with type 1 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 4182-4187.
11. Codner E, Soto N, López P, Trejo L, Ávila A, Eyzaguirre F, et al. 2006. Diagnostic Criteria for Polycystic Ovary Syndrome and Ovarian Morphology in Women with Type 1 Diabetes Mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 2250-2256.
12. Codner E, Escobar-Morreale H. 2007. Hyperandrogenism and Polycystic Ovary Syndrome in Women with Type 1 Diabetes Mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 1209-1216.
13. Gambineri A, Pelusi C, Vicennati V, Pagotto U, Pasquali R. 2002. Obesity and the polycystic ovary syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26: 883-896.
14. Corbould A. 2008. Effects of androgens on insulin action in women: is androgen excess a component of female metabolic syndrome?. *Diabetes Metab Res Rev* 24: 520-532.
15. Bugano DD, Conforti-Froes N, Yamaguchi MN. 2008. Barakat EC. Genetic polymorphisms, the metabolism of estrogens and breast cancer: a review. *Eur J Gynaecol Oncol* 29: 313-320.
16. Franks S. 1997. The 17 alpha-hydroxylase/17,20 lyase gene (CYP17) and polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 46: 135-136.
17. Berstein LM, Imyaninov EN, Gamajunova VB, Kovalevskij AJ, Kuligina ESh, Belogubova EV, et al. 2002. CYP17 genetic polymorphism in endometrial cancer: are only steroids involved?. *Cancer Lett* 180:47-53.
18. Techatraisak K, Conway GS, Rumsby G. 1997. Frequency of a polymorphism in the regulatory region of the 17 alpha-hydroxylase-17,20-lyase (CYP17) gene in hyperandrogenic states. *Clin Endocrinol (Oxf)* 46: 131-134.
19. Diamanti-Kandarakis E, Bartzis MI, Zapanti ED, Spina GG, Filandra FA, Tsianateli TC, et al. 1999. Polymorphism T→C (-34 bp) of gene CYP17 promoter in Greek patients with polycystic ovary syndrome; Fertility and Sterility 71: 431-435.
20. Tee MK, Dong Q, Miller WL. 2008. Pathways Leading to Phosphorylation of P450c17 and to the Posttranslational Regulation of Androgen Biosynthesis. *Endocrinology* 149: 2667-2677.
21. Bremer AA, Miller WL. 2008. The serine phosphorylation

Artículo Original

- hypothesis of polycystic ovary syndrome: a unifying mechanism for hyperandrogenemia and insulin resistance. *Fertil Steril* 89: 1039-1048.
22. Codner E, Mook-Kanamori D, Bazaes RA, Unanue N, Sovino H, Ugarte F, et al. 2005. Ovarian Function during Puberty in Girls with Type 1 Diabetes Mellitus: Response to Leuprolide. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 3939-3945.
23. Gharani N, Waterworth DM, Williamson R, Franks S. 1996. 5' polymorphism of the CYP17 gene is not associated with serum testosterone levels in women with polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 4174. doi:10.1210/jc.81.11.4174.
24. Marszałek B, Lacinski M, Babych N, Capla E, Biernacka-Lukanty J, Warenik-Szymankiewicz A, et al. 2001. Investigations on the genetic polymorphism in the region of CYP17 gene encoding 5'-UTR in patients with polycystic ovarian syndrome. *Gynecol Endocrinol* 15: 123-128.
25. Ohnishi T, Ogawa Y, Saibara T, Nishioka A, Kariya S, Focumoto M, et al. 2005. CYP17 polymorphism as a risk factor of tamoxifen-induced hepatic steatosis in breast cancer patients. *Oncol Rep* 13: 485-489.
26. Echiburú B, Pérez-Bravo F, Maliqueo M, Sánchez F, Crisosto N, Sir-Petermann T. 2008. Polymorphism T > C (-34 base pairs) of gen CYP17 promoter in women with polycystic ovary syndrome is associated with increased body weight and insulin resistance: a preliminary study. *Metabolism* 57: 1765-1771.
27. Pérez MS, Cerrone GE, Benecia H, Marquez N, De Piano E, Frechtel G. 2008. Polimorfismos en los genes CYP11 α y CYP17 y etiología del hiperandrogenismo en pacientes con poliquistosis ovárica. *Medicina (Buenos Aires)* 68: 129-134.
28. Park JM, Lee EJ, Ramakrishna S, Cha DH, Baek KH. 2008. Association study for single nucleotide polymorphisms in the CYP17A1 gene and polycystic ovary syndrome. *Int J Mol Med* 22: 249-254.
29. Pei YF, Zhang L, Deng HW, Dvornyk V. 2008. CYP17 MspA1 polymorphism and age at menarche: a meta-analysis. *Dis Markers* 25: 87-95.
30. Mitchell ES, Farin FM, Stapleton PL, Tsai JM, Tao EY, Smith-DiJulio K, et al. 2008. Association of estrógeno-related polymorphisms with age at menarche, age at final menstrual period and stages of the menopausal transition. *Menopause* 15: 105-111.