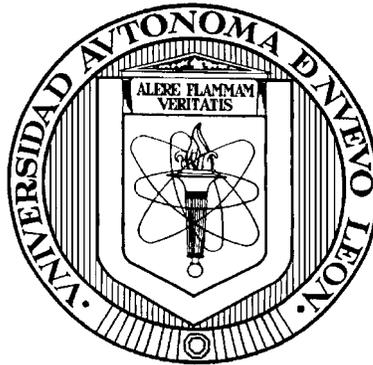


**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**DETERMINACIÓN DE REPETICIONES CAG EN EL
RECEPTOR DE ANDRÓGENOS Y SU RELACIÓN
CON LA INFERTILIDAD MASCULINA.**

**Por
DR. LAURO SALVADOR GÓMEZ GUERRA**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN MEDICINA**

Abril, 2008

**DETERMINACION DE REPETICIONES CAG EN EL RECEPTOR DE
ANDROGENOS Y SU RELACIÓN CON LA INFERTILIDAD MASCULINA.**

Aprobación por la comisión de Tesis:

**Dra. Rocío Ortiz López
DIRECTOR DE TESIS**

**Dr. med. Augusto Rojas Martínez
COMISIÓN DE TESIS**

**Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez
COMISIÓN DE TESIS**

**Dr. med. Oscar Vidal Gutiérrez
COMISIÓN DE TESIS**

**Dr. PhD Jorge Valenzuela Rendón
COMISIÓN DE TESIS**

**Dr. Dionicio A. Galarza Delgado
SUBDIRECTOR DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

Este trabajo de Tesis de Doctorado en Medicina se desarrolló en el Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la UANL y en el Servicio de Urología del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González, bajo la supervisión de la Dra. Rocío Ortiz López como directora y los doctores Augusto Rojas Martínez, Herminia G. Martínez Rodríguez, Oscar Vidal Gutiérrez, Jorge Valenzuela Rendón como co-directores, todos profesores de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

DEDICATORIA

A mis padres a quienes extraño mucho y a quienes les debo lo que soy.

No lloro porque terminó su vida, sonrío por lo que sucedió con ella
Gabo

A mis hijos: Laura, Eduardo y Montse, que son mi tesoro.

A Laura: Por su fortaleza y valores

A Eduardo: Por su nobleza e integridad

A Montse: Por su caridad y dulzura

Dios no prometió días sin dolor, risas sin tristezas, sol sin lluvia, pero él si prometió fuerzas para cada día, consuelo para las lágrimas y luz para el camino.... Ustedes hacen posible mi vida.

Y por último a Norma, mi esposa: A quien sino a ti que me conoces tanto.
Por tu amor, porque me ha hecho entender quien soy cuando estoy contigo.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar a la Dra. Rocío Ortíz, Directora de la Tesis y a su esposo el Dr. Augusto Rojas por su paciencia, consejos y dirección para llevar a cabo a feliz término esta tesis doctoral, pero sobretodo y lo que más valoro es lo que se generó: su amistad. Gracias, amigos.

Al personal del laboratorio del Departamento de Bioquímica por su apoyo incondicional en el análisis y procesamiento de las muestras para la realización de este trabajo.

A todo el personal del Servicio de Urología por su apoyo total y en especial a mi secretaria Mardia por su tiempo, paciencia y ayuda en el escrito y organización de este trabajo.

A todos los miembros de la comisión: Dra. med. Herminia G. Martínez Rodríguez, Dr. med. Oscar Vidal Gutiérrez, Dr. PhD Jorge Valenzuela Rendón, por sus consejos, orientaciones, observaciones y su amistad.

Gracias a la Universidad Autónoma de Nuevo León por darme la oportunidad de realizar mis sueños y ver crecer las semillas plantadas y las esperanzas sembradas en el corazón, de los jóvenes que llenan nuestras aulas.

EDUCAR ES ENSEÑAR CAMINOS.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Función del receptor de andrógenos	4
1.2 Biología molecular del receptor de andrógenos.....	7
1.3 Polimorfismos en el receptor de andrógenos.....	10
II. ANTECEDENTES DIRECTOS	18
III. JUSTIFICACIÓN.....	19
IV. OBJETIVO	19
V. HIPÓTESIS.....	20
VI. ESTRATEGIA GENERAL	20
VII. METODOLOGÍA.....	21
7.1 Área donde se desarrolló el trabajo.....	21
7.2 Selección de pacientes y controles.....	21
7.2.1 Selección grupo control.....	21
7.2.2 Criterios de inclusión y exclusión de pacientes....	23
7.2.3 Selección de pacientes.....	23
7.2.4 Características de los pacientes colectados.....	24
7.3 Estudios moleculares.....	25
7.3.1 Extracción de DNA de las muestras	25
7.3.2 Diseño de oligonucleótidos	26
7.3.3 Optimización de las condiciones de amplificación...	26
7.3.4 Análisis de repeticiones CAG en el RA.....	27
7.3.5 Secuenciación de productos amplificados.....	28
VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	29
IX. RESULTADOS	30
9.1 Resultados de la selección de los controles fértiles.....	30
9.2 Características epidemiológicas de las muestras.....	30
X. DISCUSIÓN.....	34
XI. CONCLUSIONES.....	35
XII. BIBLIOGRAFÍA.....	36
XIII. ANEXO 1	40

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Modelo de acción de las hormonas esteroideas en una célula diana
- Figura 2 Acción de los andrógenos mediada por el receptor de andrógeno (RA)
- Figura 3 Estructura molecular del receptor de andrógenos
- Figura 4 Representación de la estructura del receptor de andrógenos y la localización de las repeticiones CAG en el exón 1
- Figura 5 Esquema que muestra la estructura del gen del receptor de andrógenos
- Figura 6 Modulación del efecto genómico de la testosterona por la longitud del número de repeticiones CAG en el receptor de andrógenos
- Figura 7 Estrategia general
- Figura 8 Estrategia general para la amplificación de marcadores STRs en el análisis de sujetos fértiles
- Figura 9 Distribución cromosómica de los 13 marcadores STRs utilizados para los estudios de paternidad en los sujetos controles y ejemplo de los geles de acrilamida teñidos con plata para visualizar los marcadores analizados
- Figura 10 Estandarización de la amplificación del exón 1 del receptor de andrógenos
- Figura 11 Geles de poliacrilamida teñidos con plata.
- Figura 12 Secuenciación y amplificación del receptor de andrógenos
- Figura 13 Prueba de paternidad
- Figura 14 Diagnóstico seminológico
- Figura 15 Biopsia testicular
- Figura 16 Gráfica de resultados

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1 Variaciones étnicas en la repetición CAG en el exón 1 del receptor de andrógenos, en sujetos sanos
- Tabla 2 Estudios del número de repeticiones CAG en el gen del RA en varones con infertilidad masculina idiopática, cáncer de próstata y otras patologías
- Tabla 3 Número y porcentaje de repeticiones CAG en sujetos infértiles
- Tabla 4 Número y porcentaje de repeticiones CAG en sujetos fértiles (grupo Control)

LISTA DE ABREVIATURAS

CFTR	conductancia transmembranal de la fibrosis quística
RA	receptor de andrógenos
CAG	tripleto de repeticiones de citocina, adenina, guanina
T	testosterona
DHT	dihidrotestosterona
RNA	ácido ribonucleico
RNA _m	ácido ribonucleico mensajero
TAD	dominio de transactivación
AF-1	función de activación 1
AF-5	función de activación 5
DNA	ácido desoxirribonucleico
DBD	dominio de unión al DNA
LBD	dominio de unión al ligando
ICSI	inyección intracitoplasmática de esperma
STRs	repetición corta en tandem
PCR	reacción de la cadena de polimerasa
EDTA	etilen diamino tetra acético
TSNT	Trisma Base, SDS, NaCl y Triton

Darí­a todo lo que sé
Por la mitad de lo que ignoro

Descartes

La verdadera sabiduría, está en reconocer
la propia ignorancia

Sócrates

RESUMEN

Dr. Lauro Salvador Gómez Guerra
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Fecha de Graduación: Abril 2008

DETERMINACIÓN DE REPETICIONES CAG EN EL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS Y SU RELACIÓN CON LA INFERTILIDAD MASCULINA

Número de páginas: 41

Candidato para el grado de Doctor en
Medicina

Área de estudio: Análisis de repeticiones del CAG en el receptor de andrógenos

Propósito: Distintas investigaciones en diferentes regiones del mundo han implicado la relación del número de repeticiones del CAG en el receptor de andrógenos con infertilidad masculina con resultados controversiales. En este estudio nosotros investigamos la asociación de infertilidad masculina idiopática por primera vez en varones mexicanos con el número de repeticiones del CAG en el receptor de andrógenos.

Material y Métodos: El número de repeticiones del CAG en el receptor de andrógenos fue investigado en varones infértiles y varones fértiles como grupo control. Los parámetros espermáticos variaron de azoospermia a oligoastenozoospermia severa de origen idiopático. El grupo control consistió en varones con paternidad comprobada. El DNA fue aislado de sangre periférica y el genotipo fue realizado por PCR.

Resultados: No hubo diferencia estadísticamente significativa en el número de repeticiones de CAG en el receptor de andrógenos entre el grupo control (23.32, DS \pm 2.557) y los varones infértiles (media 23.56 y DS \pm 3.006) respectivamente, con una $p=0.665$.

Conclusión: El número de repeticiones del CAG en el receptor de andrógenos no está relacionado con el grado de impedimento en la espermatogénesis y características clínicas en varones infértiles; por lo que no se considera un factor de riesgo en infertilidad masculina en la población mexicana.

FIRMA DE LA ASESORA

Dra. Rocío Ortiz López
Directora de Tesis

IX. INTRODUCCIÓN

La infertilidad de la pareja es atribuible a la mujer aproximadamente en el 40% de los casos y en otro 40% al varón, siendo el 20% restante problemas de ambos ^{1,2}. En las pruebas requeridas para determinar la causa específica de la infertilidad se evalúan en la pareja los antecedentes infecciosos, la exposición a agentes químicos o físicos, los factores endocrinológicos, etc. En la mujer se investiga además la ovulación y el estado anatómico de las trompas de Falopio, mientras que en el varón se estudian la producción de espermatozoides (número, movilidad y forma), la anatomía del aparato reproductor y su vasculatura³. Esto último a través de la valoración clínica, un análisis de semen, niveles hormonales, estudios de imagen y otros estudios específicos. En los varones sub-fértiles, los defectos en la espermatogénesis son una observación común, sin embargo, en muchos hombres este no es un evento evidente como una causa definitiva de infertilidad masculina⁴.

Finalmente, existe también aquella infertilidad que aún después de haber descartado las causas fisiológicas (particularmente las hormonales) y anatómicas en las estructuras del aparato reproductivo y el tejido gonadal, no se encuentra una causa aparente del problema. Las investigaciones recientes han revelado que una proporción significativa de infertilidad masculina puede estar asociada a una variedad de anomalías genéticas^{5,6}.

Los factores genéticos más comúnmente asociados a la infertilidad masculina son:

1) Anormalidades en el cariotipo⁷ (donde se puede desenmascarar anomalías genéticas potencialmente transmisibles en el hombre infértil, incluyendo desórdenes numéricos y estructurales de los cromosomas).

2) Las microdeleciones de genes espermátogénicos que se localizan en el cromosoma Y⁸ que llevan a un debilitamiento espermátogénico; por ejemplo, cuando se observa una falla testicular por azoospermia o por oligozoospermia severa. Las microdeleciones en el cromosoma Y pueden estar presentes entre el 10 al 15% de estos pacientes. En un trabajo realizado por nuestro grupo de colaboración sobre el análisis de deleciones en el cromosoma Y en un grupo de 60 pacientes azoospermicos, encontramos una frecuencia del 14% de microdeleciones⁹.

3) Los desórdenes genéticos que afectan la secreción y acción de gonadotropinas destacando la deficiencia de andrógenos¹⁰.

4) Las mutaciones en el gen regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística (CFTR)^{11,12} el cual está asociado con azoospermia, con aplasia congénita del epidídimo y ausencia bilateral congénita de los conductos deferentes.

5) Adicionalmente a estas factores genéticos mencionados, en los últimos años, varios investigadores han reportado que mutaciones y polimorfismos en el gen del Receptor de Andrógenos (RA) ocasionan la

expresión variable de la proteína y que esta variabilidad está significativamente asociada con disminución de la espermatogénesis e infertilidad masculina^{13,14,15}.

Con base a esta última observación, este proyecto se enfocó al análisis del polimorfismo CAG localizado en el exón 1 del gen del RA, con la finalidad de determinar si existe alguna relación con este polimorfismo y la infertilidad masculina en un grupo de pacientes infértiles que asisten a la consulta de Urología del Hospital Universitario, “José Eleuterio González”-UANL..

A continuación se describen las funciones y características moleculares del RA y particularmente se mencionan algunos trabajos que han analizado el número de las repeticiones CAG en diferentes poblaciones, donde muestran la variabilidad en el número de repeticiones dependiendo de la población estudiada.

1.1 Función del receptor de andrógenos (RA)

El RA es una proteína funcionalmente muy interesante, no solo tiene su actividad receptora de la hormona para ejercer la respuesta celular por su unión al ligando, sino que también ejerce la función como factor de transcripción; de modo que esta proteína realiza señalización celular y regula expresión de muchos otros genes esenciales en el metabolismo normal de la célula (ver figura 1)

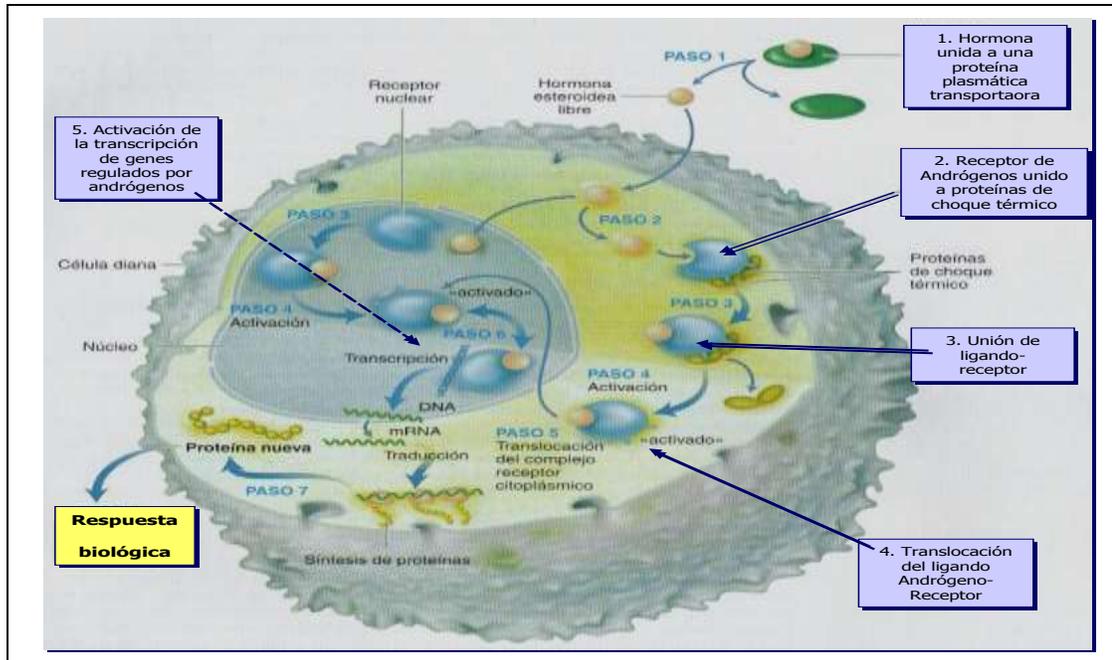


Figura 1. Modelo de acción de las hormonas esteroides en una célula diana (Modificado de Trudy McKee. 2003. *Bioquímica: La base molecular de la vida* ¹⁶). En el caso del RA, la hormona llega hasta la célula blanco transportada por una proteína plasmática, se introduce a la célula y se une al RA. Ocurre la transducción del ligando hormona-receptor y se internaliza al núcleo donde se une al DNA y activa la transcripción de genes regulados por andrógenos, para desencadenar la respuesta biológica.

El desarrollo del fenotipo masculino y el inicio de la espermatogénesis destacan en la producción de gametos masculinos que son dependientes en los eventos celulares que responden a los andrógenos. Los dos andrógenos fisiológicos más importantes son la testosterona (T) y la 5 alfa de- hidrottestosterona (DHT) (ver figura 2).

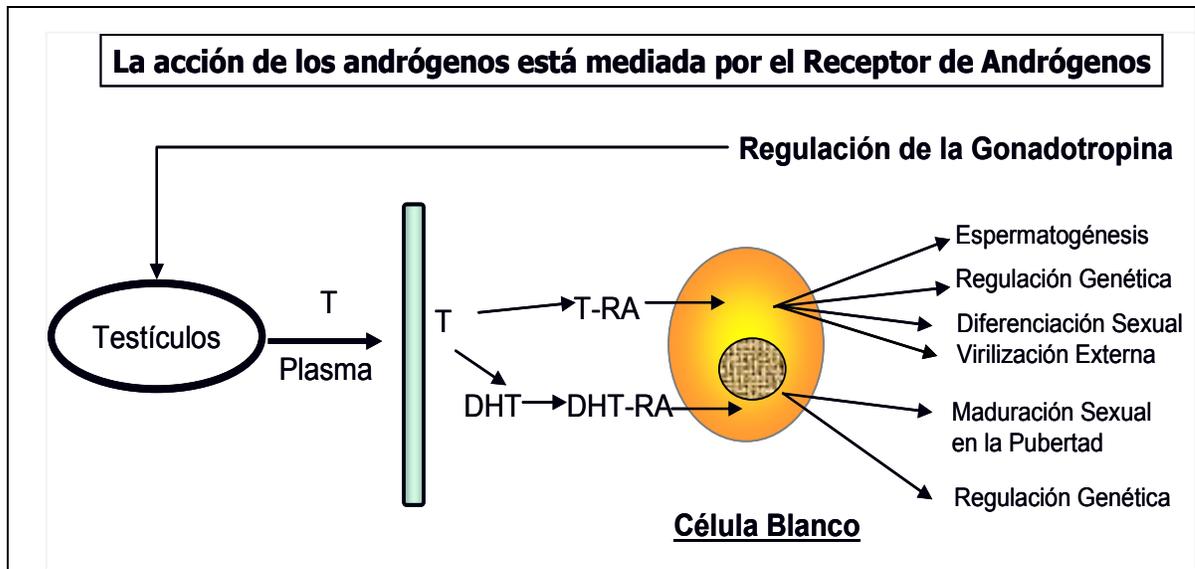


Figura 2. Representa la acción de los andrógenos mediada por el receptor de andrógeno (RA).
T=Testosterona, DHT=Dihidrotestosterona

La acción de los andrógenos es mediado por los RA y a pesar de la existencia de dos formas diferentes de andrógenos, solo un gen para el RA ha sido identificado y clonado (aunque existen dos isoformas originadas a partir del mismo gen)^{17,18}.

La testosterona es crucial para la sobrevivencia de los conductos de Wolf y su subsiguiente desarrollo y diferenciación a epidídimo, conducto deferente y vesícula seminal. La DHT, un metabolito de la testosterona, está involucrado en el desarrollo del pene y el escroto. Al momento de la pubertad, los andrógenos manejan la iniciación de la espermatogénesis y el desarrollo de los órganos sexuales accesorios, incluyendo la próstata. Todos estos procesos desarrollados dependientes de andrógenos, culminan en una espermatogénesis exitosa; pero, alguna alteración en cualquiera de estos pasos o etapas podrá resultar en una falla en la espermatogénesis¹⁵.

1.2 Biología molecular del receptor de andrógenos

El gen del RA se localiza en el brazo corto del cromosoma X, abarca una región de 80 a 90 Kb. correspondientes a 8 exones que se transcriben en un RNA mensajero (RNAm) de 2, 760 nucleótidos^{19, 20}

El RA es realmente un factor de transcripción intracelular (se localiza en el citoplasma), pertenece a la superfamilia del receptor nuclear/esteroide; miembros de los cuales incluyen receptores para estrógenos, progesterona, hormonas adrenales, hormona tiroidea, ácido retinoico y vitamina D²¹.

Se han descrito dos isoformas del RA (isoformas RA-A y RA-B) originadas a partir del mismo gen: La forma **RA-A**: Es una proteína de 87 kDa: con la región amino+ terminal truncada porque carece de los primeros 187 aminoácidos y la forma **RA-B**: Es una proteína de 110 kDa: corresponde a la forma completa

Al igual que otros receptores nucleares, respecto a la relación estructura y función del RA, éste tiene varios dominios modulares, cada uno con funciones definidas que se describen a continuación²² (ver figura 3).

- a) Un dominio de transactivación (**TAD**) en la región amino-terminal, que consiste en un dominio regulador de unión a AF-1 (Función de Activación 1) localizado entre los residuos 101 y 370, lo cual es requerido para unir al factor transcripcional AF-5 entre los residuos 360 a 485, responsable para la actividad constitutiva y de dimerización que involucra a los residuos 1 al 36 y que contiene el dominio FXXLF (donde F = fenilalanina, L = Leucina, and X = cualquier aminoácido)²³

- b)** Un dominio de unión al DNA (**DBD**) posicionado en la parte central de la proteína entre los residuos 370 a 494 el cuál interactúa tanto con el DNA y con el dominio LBD en una forma inusual (para un receptor nuclear) en una interacción cabeza-cola.
- c)** Un dominio o región de bisagra flexible, que conecta a DBD con LBD; influye en el tráfico subcelular de proteínas activando a AF-2, responsable de la actividad agonista inducida por AF-2 unido a proteínas co-activadoras (que contienen motivos LXXLL) y/o la región AF-1 de otra molécula de RA (conteniendo el motivo FXXLF) para formar el dímero cabeza-cola.
- d)** Un dominio co-activador de unión al ligando (LBD) en la región carboxi-terminal²⁴. Aunque cada dominio del RA tiene funciones específicas, pueden llevarse a cabo interacciones intermoleculares entre dominios o también interacciones intramoleculares con otras proteínas co-activadoras^{25,26}

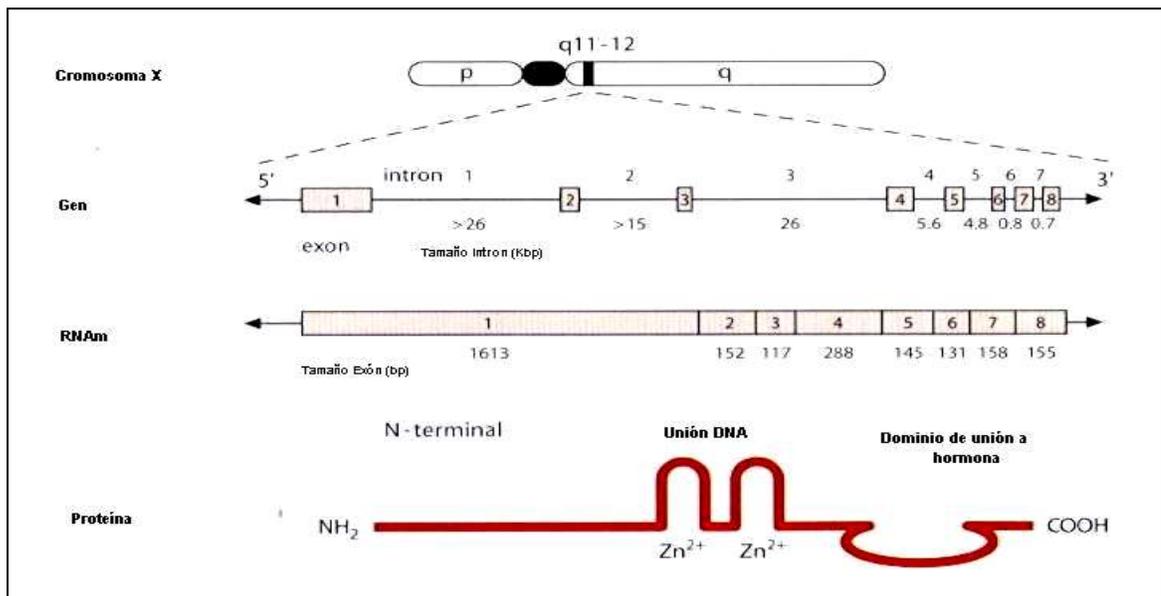
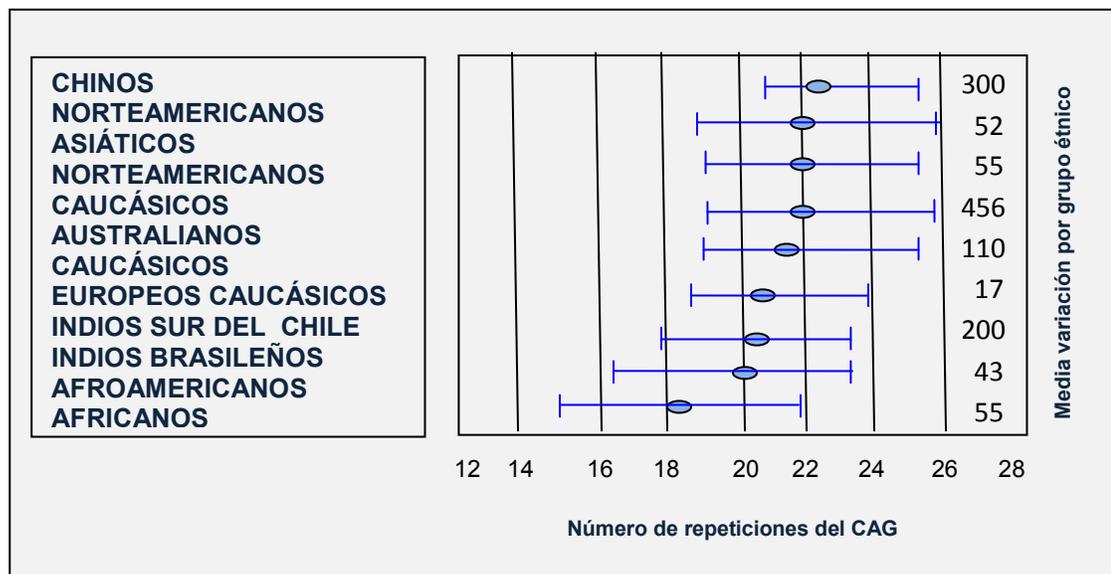


Figura 3. Estructura molecular del receptor de andrógenos. La figura esquematiza la localización, estructura del gen, RNAm y los dominios de la proteína: a) el dominio de transactivación (TAD) en la región amino-terminal, b) el dominio de unión al DNA (DBD) posicionado en la parte central de la proteína, c) el dominio o región de bisagra y d) Un dominio co-activador de unión al ligando (LBD) en la región carboxi-terminal.

El conocimiento de las propiedades funcionales y estructurales de los RA ha sido también muy importante para el entendimiento de las bases moleculares de la infertilidad masculina causada por el mal funcionamiento de este receptor. Ahora se sabe que la región 5' del gen RA, a nivel del exón 1 (correspondiente al dominio TAD) está formado por dos segmentos consistentes en repeticiones de aminoácidos de glutamina (codificados por el codón CAG) y glicina (codificados por el codón GGN). Algunos trabajos han mostrado que el número de repeticiones es polimórfico y el número de estas repeticiones varía entre individuos de la población normal (ver tabla 1).²⁷⁻³⁴

Tabla 1. Variaciones étnicas en la repetición CAG en el exón 1 del receptor de andrógenos, en sujetos sanos



Existe mucha controversia acerca de cómo esta variación en la secuencia líder de la proteína puede afectar la función y en algunas situaciones, asociarse a infertilidad masculina y a otras patologías como cáncer de próstata, cáncer de mama, etc. (ver figura 4).

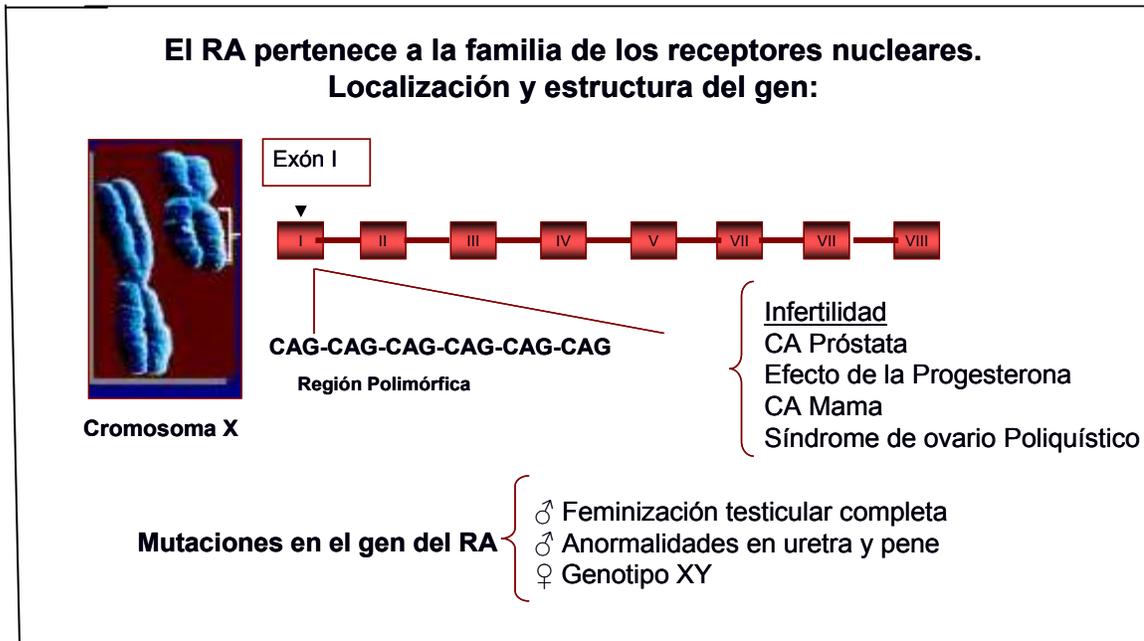


Figura 4: Representación de la estructura del Gen del Receptor de Andrógenos y la localización de las repeticiones CAG en el exón 1. En corchetes se menciona la asociación de las repeticiones CAG con algunas patologías mientras que otras mutaciones a lo largo del gen se asocian con otras.

1.3 Polimorfismos en el receptor de andrógenos

Con el creciente conocimiento del genoma humano, se ha hecho evidente que las variaciones genéticas (polimorfismos) se pueden encontrar en cualquier gen y a cualquier nivel de éstos (exones, intrones o promotor y regiones no codificantes). De manera que respecto a la localización de nuevos polimorfismos en genes de hormonas proteicas o en los receptores de éstas también se ha hecho evidente. Algunos de estos polimorfismos pueden tener implicaciones fisiológicas mínimas aunque en algunos otros casos, éstos se han relacionados a patologías específicas.

La incidencia de tales polimorfismos dentro de un gen dado varían entre un 15 a un 30% entre la población normal. Esto indica que por lo general, estos cambios no tienen un efecto grave en la población. Sin embargo, algunas de las variantes que afectan la eficiencia de la función de la proteína en la que se localizan pueden tener una consecuencia patológica, la cual se manifestará clínicamente dependiendo de la severidad en la que se altera la eficiencia de la actividad de la proteína. Por ejemplo, en el caso de los receptores hormonales (que es el tema que nos interesa en ese proyecto), puede ser que el efecto no llegue a ser deletéreo, sin embargo puede ser capaz de modificar ligeramente el sistema de retroalimentación endocrina y finalmente modificar la acción hormonal con alteraciones clínicas manifiestas.³⁵

Un aspecto muy interesante de los efectos de los polimorfismos es que a veces, a pesar de que se ubican en un mismo gen, éstos pueden tener consecuencias muy variables dependiendo de su localización dentro de éste. (Por ejemplo, algunos polimorfismos afectarán ligeramente la eficiencia funcional de una proteína, mientras que otros estarán asociados a la eliminación completa de la función). Por otro lado, otro aspecto interesante es el que demuestra como un mismo polimorfismo puede estar asociado a dos patologías diferentes (por ejemplo el polimorfismo de ApoB asociado a Diabetes Mellitus y a Alzheimer.

Lo anterior lo podemos hacer aun más complicado si pensamos que la presencia de un polimorfismo en cada población o grupo étnico puede tener repercusiones diferentes en la modificación de la actividad de la proteína, dependiendo del componente genético global de los individuos (ver tabla 1).

Lo que hace necesaria la caracterización genética de cada población para determinar si la presencia de un polimorfismo dado pudiera estar asociado o no con una patología particular. En última instancia, la caracterización de dicho polimorfismo puede servir para determinar su frecuencia en la población y en estudios posteriores determinar si éste tiene alguna correlación patológica.³⁶

En el caso del RA, se ha descrito que existe un polimorfismo de repetición variable en tándem de tripletes CAG que ha sido asociado a infertilidad masculina (ver tabla 2) y más recientemente se ha descrito, que este mismo polimorfismo puede estar asociado a la edad del establecimiento del cáncer de próstata en los varones^{37,38} Ambos hallazgos han sido muy conflictivos y aunque algunos autores confirman estas asociaciones, algunos otros las rechazan.

Por ejemplo, Tut³⁹ y cols. y Dowsing⁴⁰, y cols., en trabajos independientes, asociaron la extensión de la secuencia de poliglutaminas (repeticiones CAG) con defectos en la espermatogénesis, y más recientemente otro estudio de Mifsud y cols.⁴¹ mostró que hombres que presentaban 26 o más repeticiones CAG en la secuencia del gen RA tenían un riesgo de 7 veces mayor de ser azoospermicos. Consistente con la relación inversa entre la longitud de repeticiones CAG y la función de los RA, algunos laboratorios y grupos de trabajo han demostrado que la longitud de repeticiones CAG se ha encontrado en los RA de pacientes con defectos en la espermatogénesis. En una población de Singapur de origen asiático mixto, pacientes con repeticiones de

CAG de más de 28 en el primer exón del gen de RA tenían más de 4 veces aumentado el riesgo de espermatogénesis reducida. Esto también fue observado en poblaciones australianas⁴² japonesas⁴³, norteamericanas⁴¹ y francesas⁴⁴.

Otros estudios *In Vitro* han demostrado una relación inversa entre la longitud de repeticiones CAG y la función de los RA: una expansión progresiva de repeticiones CAG en el RA causa una disminución lineal de la función trans-activadora⁴⁵. Además, se han encontrado que los alelos cortos (con poco número de repeticiones) están asociados con tumores dependientes de andrógenos, por lo que algunos autores lo han relacionado con el cáncer de próstata.

Las repeticiones cortas de CAG aumentan la androgenicidad de los RA y resultan en anormalidades que estimulan altamente al tejido prostático, siguiendo de un aumento en el riesgo de desarrollo de tumoración en edades tempranas⁴⁶, aumentando el grado del tumor y extensión extra-prostática en el cáncer de próstata.

Estos datos sugieren la hipótesis de que la longitud de CAG reduce la actividad intrínseca de la actividad RA, continuando con una disminución en la espermatogénesis e infertilidad masculina (ver figura 5). Sin embargo, estos datos no fueron corroborados en otros estudios, como fue el caso de poblaciones como Suecia⁴⁷, Alemania⁴⁸, Holanda⁴⁹ y Dinamarca⁵⁰ donde la relación no ha sido estadísticamente significativa en el tamaño de repeticiones

CAG y la disminución en la espermatogénesis. Combinando datos provenientes de estudios europeos tampoco fue posible encontrar alguna diferencia en las distribuciones de longitud de repeticiones de CAG entre hombres fértiles e infértiles.

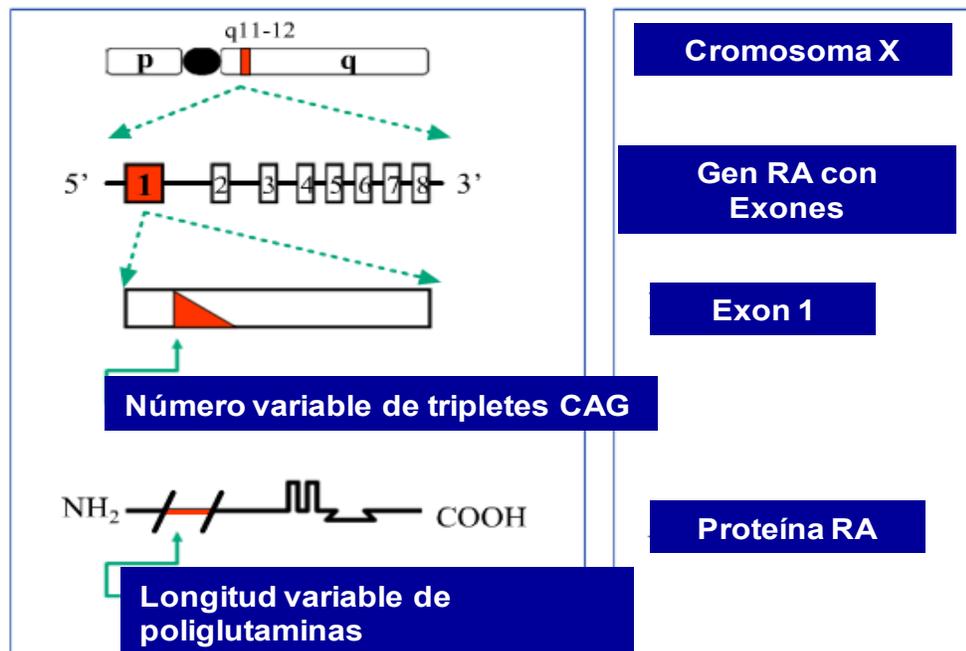


Figura 5. Esquema que muestra la estructura del gen del receptor de andrógenos. En color rojo se identifica la posición del exón 1 en el gen, donde se ubican las repeticiones CAG que al traducirse generan una secuencia variable de glutaminas en la región NH terminal de la proteína.

La causa de la disparidad en los diferentes estudios aún no está clara, pero podría estar relacionada con la influencia de diferencias étnicas. Como resultado de diferentes estudios tanto en poblaciones europeas como asiáticas donde los rango de repeticiones CAG son distintos, es concebible que las variaciones en la longitud de repeticiones CAG podrían ser más toleradas en poblaciones europeas donde el rango de repeticiones es más amplio comparado con las poblaciones asiáticas donde la variación del rango de

repeticiones de CAG es más estrecha y podría ser más significativo en términos de alteraciones funcionales en los RA.^{51,52}

Alternativamente, debido a que el impedimento de la espermatogénesis tiene una etiología multifactorial, una larga repetición de CAG podría ser un factor significativo sólo cuando otros factores que influyen negativamente en la espermatogénesis estén también presentes (ver figura 6).⁵³

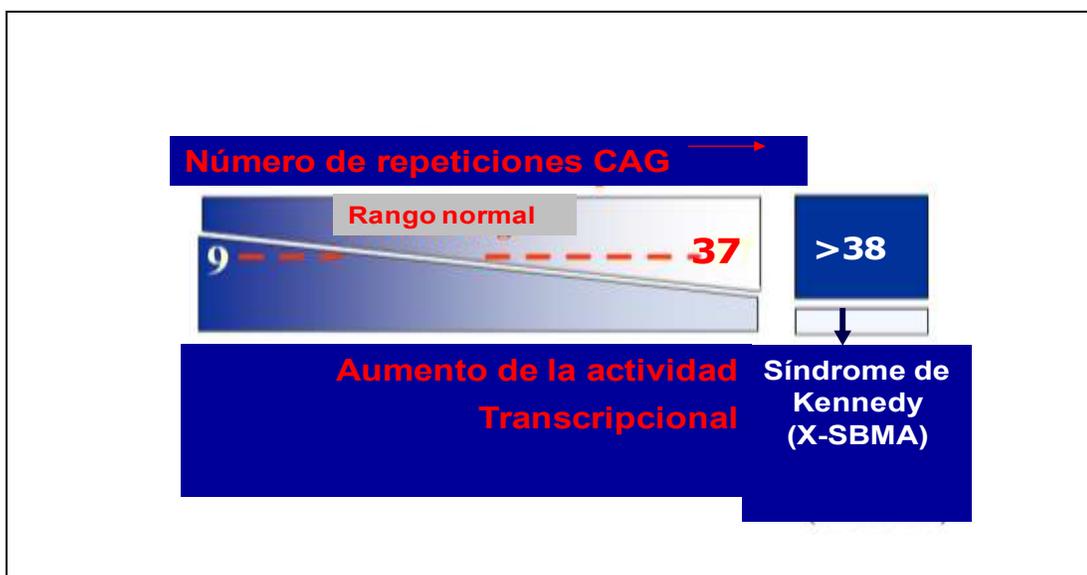


Figura 6. Modulación del efecto genómico de la testosterona por la longitud del número de repeticiones CAG en el receptor de andrógenos

Estudios recientes han proporcionado más información hacia el mecanismo molecular de cómo el tracto CAG afecta la competencia funcional de los RA. El área de trans-activación del RA es importante para la función normal del RA proporcionando la función esencial AF-1 e interactuando con co-activadores, pues fue demostrado que con el aumento de repeticiones CAG se reprime la

co-activación mediada por la proteína p160 (tales como AIB1, SCR-1a, GRIP1)⁵⁴. Esto demostró que la pérdida parcial de la función RA (con 65 repeticiones CAG) es debido a la eliminación de la proteína RA mutada porque es preferentemente dirigida para degradación mediante la vía de la ubiquitina/protosoma^{40,43}.

En resumen, y considerando el área de interés de este proyecto, en la tabla 1 se menciona algunos trabajos que se han realizado hasta la fecha en los que han tratado de correlacionar el número de repeticiones CAG del RA y alteraciones en su función. (ver tabla 2)

Tabla 2. Estudios del número de repeticiones CAG en el gen del RA en varones con infertilidad masculina idiopática, cáncer de próstata y otras patologías.

Autor (es)	Hallazgos:
<i>La Spada (1991)</i> ⁵³ y <i>Dejager y cols (2002)</i> ⁵⁴	Expansión del número de repeticiones CAG (>40) en enfermedad de Kennedy (caracterizada por debilidad muscular progresiva, poca virilización, producción deficiente de esperma, atrofia testicular y fertilidad reducida)
<i>Chamberlain (1994)</i> ⁵⁵	Correlación positiva entre el número de repeticiones CAG y la pérdida de la función del RA.
<i>Coetzee (1994)</i> ³⁸	Correlación entre el RA y el establecimiento del Cáncer de Próstata
<i>Choong (1996)</i> ⁵⁶	Relación inversa entre la longitud de segmento de repeticiones y los niveles de la proteína (RA), en pacientes con infertilidad masculina idiopática.
<i>Hardy (1996)</i> ³⁷	Correlación entre el número de repeticiones del RA y la edad de establecimiento del Cáncer de Próstata
<i>Dowsing (1993)</i> ⁴⁰ y <i>Tut (1997)</i> ³⁹	Asociación entre aumento en el número de repeticiones CAG e infertilidad masculina idiopática.
<i>Giwerzman y cols (2000)</i> ⁵⁷ <i>Dadze y cols (2000)</i> ⁴⁸	No encontraron relación entre el tamaño de la expansión CAG del RA y la producción alterada de espermatozoides.
<i>Tateno (2001)</i> ⁵⁸	No encontraron asociación entre el número de repeticiones CAG del RA con infertilidad masculina idiopática.
<i>Mifsud (2001)</i> ⁴¹ y <i>Casella (2003)</i> ⁵⁹	Se encontró que repeticiones CAG de 26 o más, en el RA, aumentaban 7 veces el riesgo de ser infértil.
<i>Beilin, J y Cols. (2003)</i> ⁶⁰	No encontraron asociación en un estudio de casos y controles en Australia, del polimorfismo CAG del RA en pacientes con cáncer de próstata.
<i>Correa-Cerro, L., y Cols. (1999)</i> ⁴⁴ .	No encontraron asociación entre los polimorfismos (CAG) _n CAA y GGN en el RA en pacientes con cáncer de próstata en la población Francesa-Alemana.
<i>Giovannucci, E., y Cols. (1997)</i> ⁶¹ , y <i>(1996)</i> ⁶²	Si encontraron asociación entre el polimorfismo CAG en el RA en pacientes con cáncer de próstata.
<i>Alevizaki M. y cols (2005)</i> ⁶³	Encontraron asociación entre la enfermedad de arterias coronarias y las repeticiones CAG más cortas del RA. Este es uno de los primeros trabajos que analizan ésta asociación

Como puede observarse al analizar la tabla anterior, y como se ha venido discutiendo, no existe una opinión consensuada sobre la relación del polimorfismo CAG del RA con la infertilidad masculina. Sin embargo, lo que sí es evidente es la variabilidad que existe en el número de repeticiones CAG dependiendo de las poblaciones estudiadas.

X. ANTECEDENTES DIRECTOS

Como se mencionó anteriormente al hablar sobre la importancia del estudio de los polimorfismos, es evidente que en una primera instancia es necesario la caracterización de los polimorfismos en cada grupo étnico para determinar su frecuencia en la población; y en estudios posteriores determinar si éstos tienen alguna correlación patológica.

A pesar de la amplia gama de información sobre este tópico, a la fecha (en una revisión de la literatura hecha hasta junio del 2007), no existe ningún estudio sobre el número de repeticiones CAG del RA en poblaciones hispanas, o específicamente en nuestra población mexicana; lo cual sería sumamente interesante. Pues se ha reportado que dependiendo del origen étnico, se han descrito diferentes rangos en el número de repeticiones CAG para poblaciones fértiles, el cual puede variar de 8 a 30 repeticiones entre blancos americanos, de 8 a 39 repeticiones entre europeos y de 11 a 31 repeticiones en asiáticos.⁵⁶

Por otro lado, debe contemplarse que de existir alguna relación entre el número de repeticiones CAG y la infertilidad masculina en nuestra población, y en vista del éxito de la aspiración de espermias testiculares en los programas de fertilización *In Vitro* y al éxito conseguido en la concepción del método ICSI en hombres azoospermicos⁷, el tamizaje para mutaciones en el RA y un apropiado consejo pre-concepción deberá ser ofrecido en todos los hombres infértiles.

Por lo anteriormente descrito, en este trabajo nos propusimos hacer un análisis del polimorfismo CAG del RA para determinar el número de repeticiones que existen en individuos fértiles de nuestra población y posteriormente determinar si existe alguna correlación entre la longitud de las repeticiones y la infertilidad masculina.

XI. JUSTIFICACIÓN

Dadas las diferencias étnicas descritas en la literatura mundial sobre el número de repeticiones CAG del RA y como en poblaciones latinoamericanas no existen antecedentes de estudios de esta naturaleza, este trabajo analizó el número de repeticiones CAG del RA en individuos sanos (fértiles) y sujetos con infertilidad masculina de origen idiopático en nuestra población. Esto nos permitió establecer la existencia de la relación del número de repeticiones del CAG entre estos dos grupos de pacientes. Los datos obtenidos no dieron pautas de tratamientos específicos y efectivos, además del consejo genético para instruir a las parejas afectadas de infertilidad.

XII.OBJETIVO

Conocer el número promedio de repeticiones CAG en el RA en una población de varones fértiles (grupo control) y compararla con el número de repeticiones que se observen en un grupo de pacientes con infertilidad masculina de origen idiopático para determinar si existe una correlación entre la longitud del fragmento CAG y la infertilidad masculina idiopática en nuestra población.

XIII. HIPÓTESIS

HIPÓTESIS H1

El número de repeticiones CAG en el RA está relacionada con azoospermia y oligozoospermia implicadas en infertilidad masculina de origen idiopático.

HIPÓTESIS Ho

El número de repeticiones CAG en el RA no está relacionada con azoospermia y oligozoospermia implicadas en infertilidad masculina idiopático.

XIV. ESTRATEGIA GENERAL

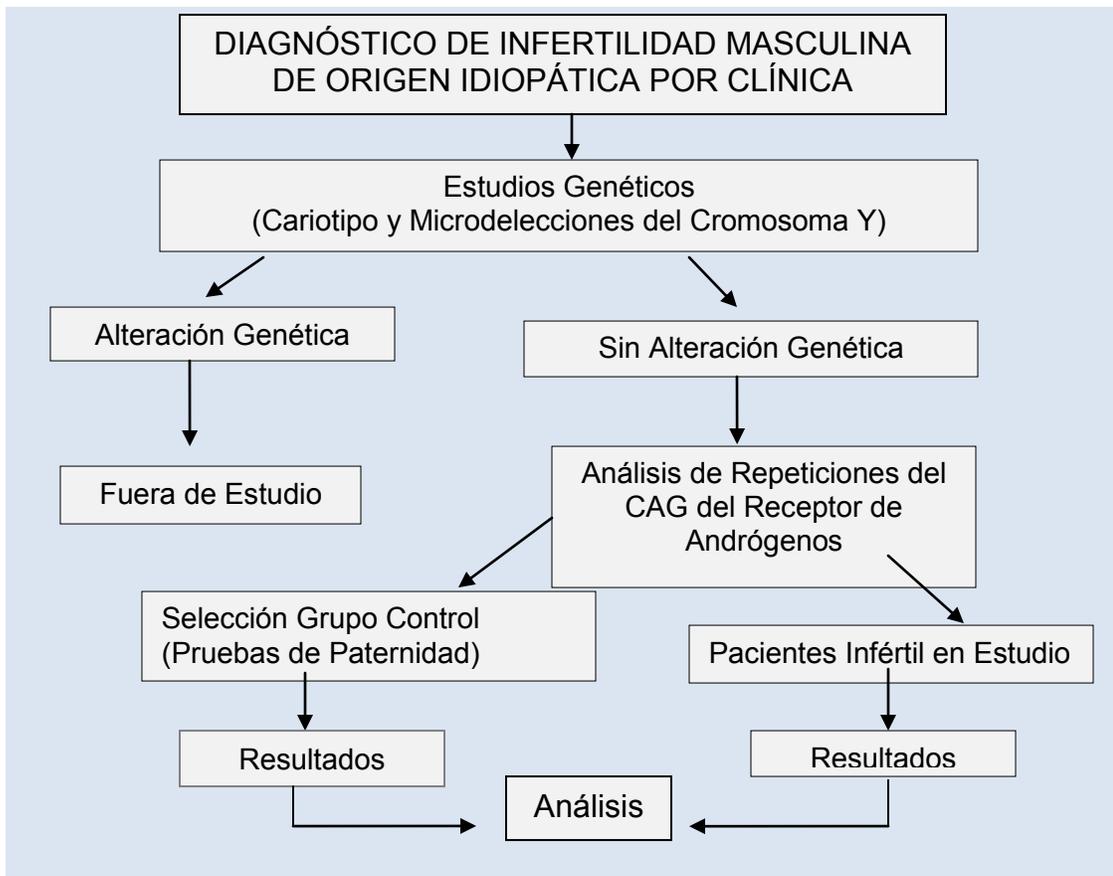


Figura 7: Descripción de la Estrategia general

XV. DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGÍA

7.1 Área donde se desarrolló el trabajo.

Los pacientes con infertilidad masculina fueron diagnosticados y reclutados en el Servicio de Urología y Unidad de Andrología del Hospital Universitario “José Eleuterio González” de la U.A.N.L. Los estudios moleculares se realizaron en el laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. Este estudio se llevó a cabo en un período de un año, en donde se recolectaron las muestras y a la par se realizó el análisis molecular de cada una de ellas.

7.2 Selección de pacientes y controles fértiles

7.2.1 Selección del grupo control: El grupo control lo conformaron 46 varones con fertilidad comprobada mediante pruebas moleculares estándares para identificación de individuos, empleando los marcadores de repeticiones cortas en tándem (STRs de las siglas en inglés). Estos marcadores son universales y han sido estandarizados a nivel mundial. Son distribuidos por la compañía Apply-Biosystems, por lo que se siguieron las instrucciones del proveedor. En general, a partir del DNA extraído de cada trío [sujeto fértil control, su pareja y un hijo(a)], se realizó la amplificación por PCR de los 13 diferentes STRs, que están distribuidos en el genoma, y son altamente polimórficos. Los productos amplificados se visualizan en gel de agarosa, y posteriormente se resuelven en geles de poliacrilamida al 6%.

Los geles se tiñen con solución de nitrato de plata y se analizan para determinar la presencia de los diferentes alelos y compararlos con el resto del trío para determinar o descartar la paternidad (ver figuras 8 y 9).

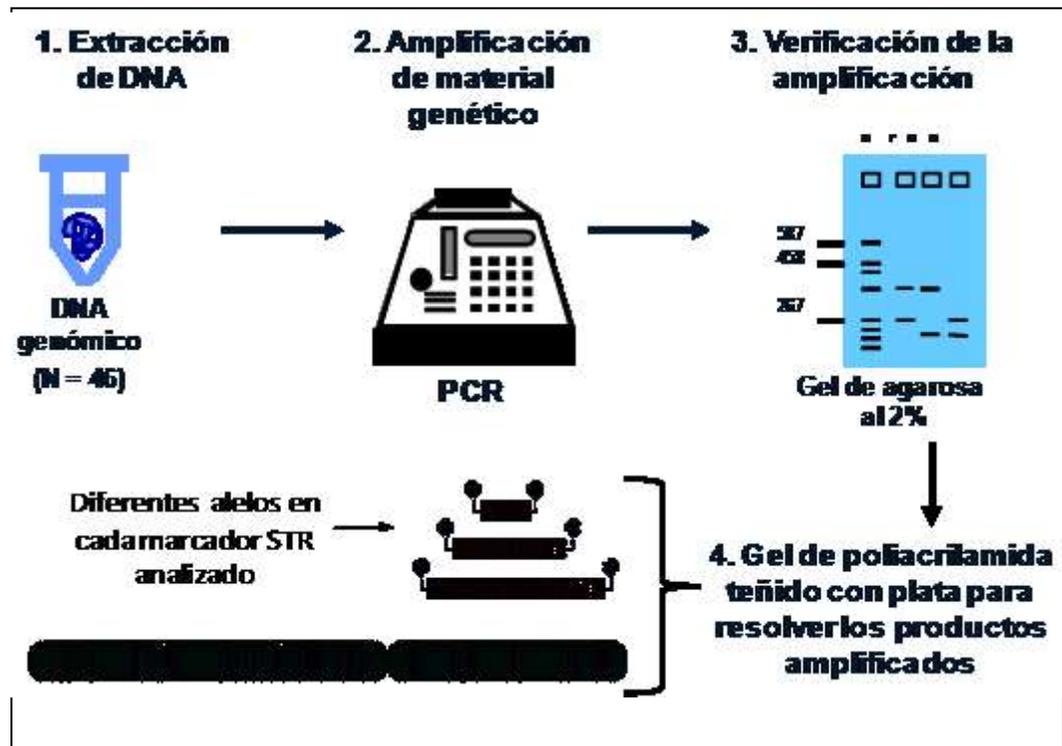


Figura 8. Estrategia general para la amplificación de marcadores STRs en el análisis de sujetos fértiles.

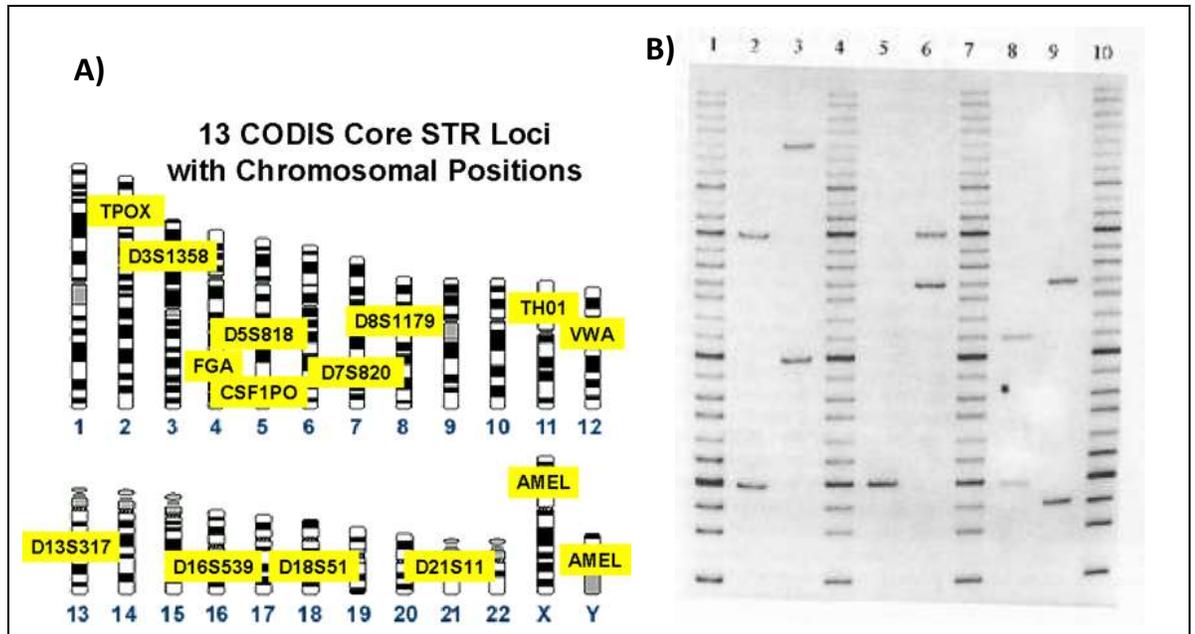


Figura 9: **A)** Distribución cromosómica de los 13 marcadores STRs utilizados para los estudios de paternidad en los sujetos controles y **B)** Ejemplo de los geles de acrilamida teñidos con plata para visualizar los marcadores analizados.

7.2.2 Criterios de inclusión y exclusión de los pacientes

- a) Se incluyeron en este estudio sujetos mayores de 18 y hasta 50 años de edad, con infertilidad masculina de origen idiopático, que tuvieron oligozoospermia ($<5 \times 10^6/\text{ml}$) o azoospermia no obstructiva.
- b) Se excluyeron los pacientes con infertilidad de causa conocida como: varicocele, hipogonadismo hipogonadotrópico, alteraciones cromosómicas u otra causa conocida de infertilidad.
- c)

7.2.3 Selección de pacientes:

La selección de la muestra se realizó de la siguiente manera: En el Servicio de Urología del Hospital Universitario se valoran aproximadamente 350 pacientes con infertilidad masculina al año.

El 30% son Azoospermicos (95 pacientes al año) y de éste 30%, el 40 % son de origen idiopático (38 pacientes). De un 30% de pacientes con oligozoospermicos severa* (95 pacientes al año) el 20% son de origen idiopático (19 pacientes). La suma de los azoospermicos (n = 38) y los oligozoospermicos severos (n = 19) nos generan un grupo de aproximadamente 57 pacientes con azoospermia y oligozoospermia de origen idiopático, por año.

**oligozoospermia de menos de 5 millones de espermias por mililitro.*

7.2.3 Características de los pacientes colectados: Se reclutaron en total 62 pacientes con oligozoospermia y azoospermia no obstructiva de origen idiopático, previamente examinados y valorados por la Unidad de Andrología del Servicio de Urología de la UANL, mediante historia clínica andrológica completa, consistente en una anamnesis general y específica al problema de infertilidad y examen físico general y específico en el área genital, valorando proporciones eunocoides, distribución de la grasa corporal ,distribución del vello púbico, tamaño y consistencia de los testículos, epidídimo, conductos deferentes e integridad morfológica y anatómica del pene. Análisis seminal (espermograma) con dos muestras separadas a intervalos de 15 días y 3 días de abstinencia sexual, para el análisis de la muestra seminal se hace por masturbación y se siguieron los parámetros indicados de las OMS además de la determinación de hormonas (FSH, LH y Testosterona) en ayunas y a primera hora de la mañana.

Todos los sujetos en estudios, controles y pacientes infértiles firmaron una carta de consentimiento antes de hacerse la toma de las muestras (ver anexo 1). La colección de los pacientes se realizó durante un año y la muestra del cálculo se realizó por conveniencia en base a la cantidad de pacientes que se valoran al año con infertilidad masculina de origen idiopático, y considerando también los tamaños de muestras de trabajos publicados por otros autores (con menos tamaño de muestra).

7.3 Estudios moleculares

7.3.1 Extracción de DNA: Después de los estudios de paternidad a cada sujeto control y a cada paciente se le extrajo una muestra de 2 a 5 ml de sangre, la cual se anticoaguló con EDTA. A partir de cada una de las muestras se extrajo el DNA mediante el método de TSNT (de las siglas. **T**risma Base, **S**DS, **N**aCl y **T**riton), el cual consiste en la liberación del material genético mediante solventes orgánicos como fenol y cloroformo. El material genético liberado se mantiene en solución amortiguadora acuosa de TSNT para posteriormente precipitarlo con etanol al 70%. La solución con el precipitado se centrifuga para recuperar una pastilla que se resuspende en una solución amortiguadora de Tris y EDTA (TE). El DNA en solución se cuantifica mediante espectrometría a una densidad óptica de 260 y 280 nm. El DNA cuantificado se almacena a -20° C hasta su uso.

7.3.2 Diseño de oligonucleótidos: El análisis se realizó mediante amplificación por PCR de la región correspondiente al exón 1 del RA. Para esto se diseñaron iniciadores específicos que cubran dicha región polimórfica. Para el diseño de los oligonucleótidos, la secuencia del exón 1 se tomó a partir de la base de datos del NCBI (Gene Bank). Los oligonucleótidos se diseñaron mediante el programa computacional OLIGO versión 4.0 y el programa Amplify versión 1.2.

7.3.3 Optimización de las condiciones de amplificación: Para la amplificación por PCR primeramente se realizó la optimización de cada uno de los parámetros (concentración de DNA, temperaturas de alineamiento y extensión, tiempos óptimos de extensión, concentraciones de $MgCl_2$ y de oligonucleótidos, etc.), hasta obtener la amplificación de un producto único de 260 pares de bases (pb). Los productos amplificados se analizaron en un gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio (ver figura 10)

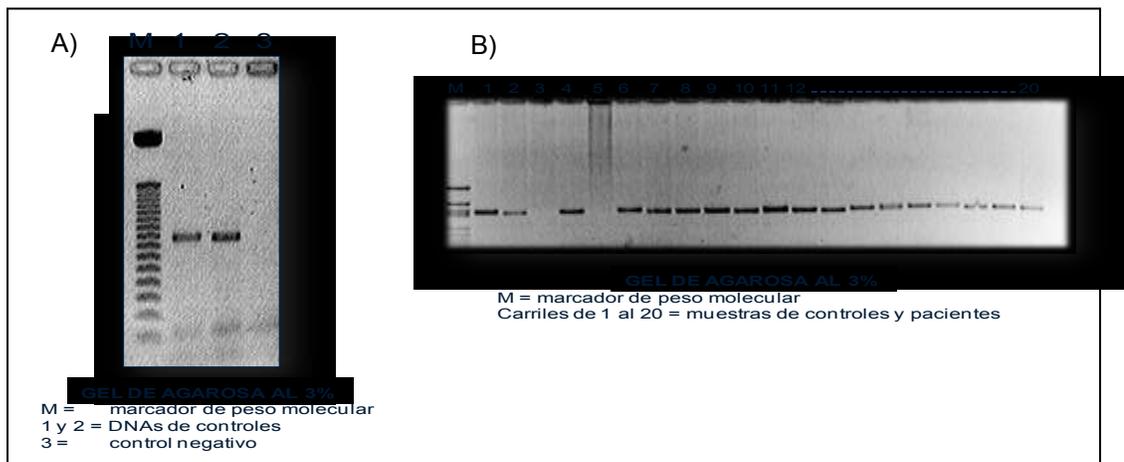


Figura 10. Estandarización de la amplificación del exón 1 del receptor de andrógenos. A) Gel de Agarosa al 3%, M= marcador de peso molecular, 1 y 2= DNAs de controles, 3= Control negativo. B) Gel de Agarosa al 3%, M= Marcador de peso molecular, Carriles de 1 al 20= Muestras de controles y pacientes.

7.3.4 Análisis de las repeticiones CAG en geles de poliacrilamida: Los productos de PCR se resolvieron en geles de poliacrilamida al 6% teñidos con plata siguiendo las condiciones estándares y semejantes a las que se utilizaron para resolver los STRs de los estudios de paternidad. Inicialmente se amplificaron y resolvieron los productos de los sujetos controles. Una vez obtenidos los diferentes patrones electroforéticos se seleccionaron aquellos que presentaron diferentes patrones de corrimiento y de esta manera seleccionar a las variantes del número de repeticiones entre los sujetos controles. (ver figura 11)

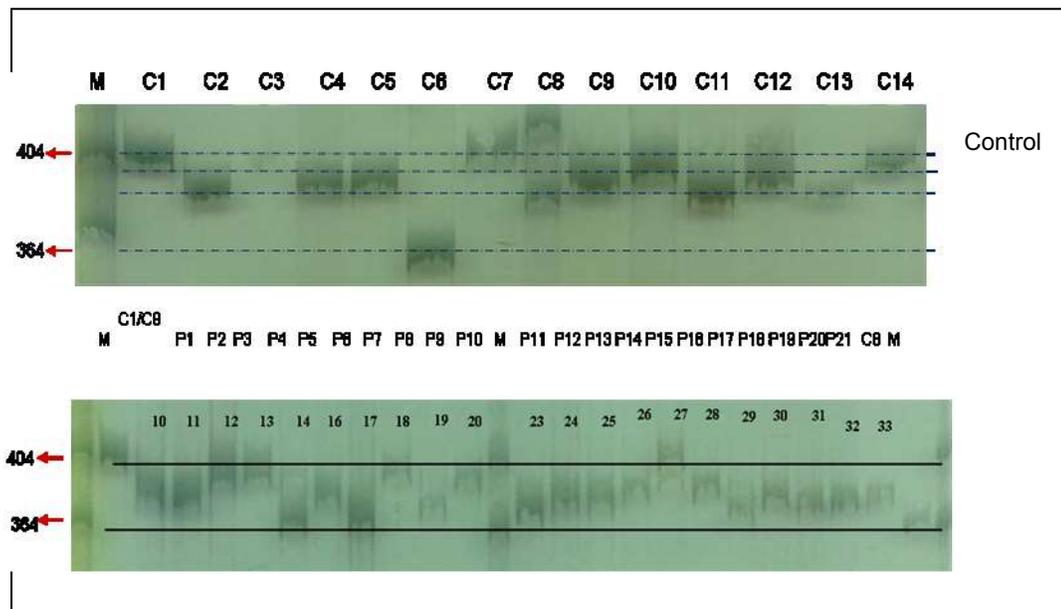


Figura 11. Geles de poliacrilamida teñidos con plata. Se muestran los diferentes patrones de migración obtenidos en los productos amplificados del receptor de andrógenos y resueltos en geles de poliacrilamida teñidos con plata. (M= Marcador de peso molecular, C= Control, P= Pacientes).

Las muestras con diferencias en los patrones de migración electroforético se seleccionaron y analizaron mediante secuenciación para determinar el número exacto de repeticiones en cada una.

7.3.5 Secuenciación de productos amplificados. Como estrategia general, todos los productos amplificados por PCR se purificaron utilizando un estuche comercial de purificación de fragmentos de DNA de la compañía Promega y estos se secuenciaron mediante la técnica de terminadores marcados, utilizando un secuenciador automático (ABI 3130) y utilizando los reactivos de estuches amplistr y identifiler versión 2.0 con 15 marcadores + incluyendo el gen de amelogenina para la determinación, con estuches comerciales de la misma compañía, usando mezclas de terminadores marcados (ver figura 12).

Una vez obtenido el número de repeticiones en las diferentes muestras, éstas se utilizaron como escalera de referencia para asignar el número de repeticiones en el resto de los controles y pacientes.

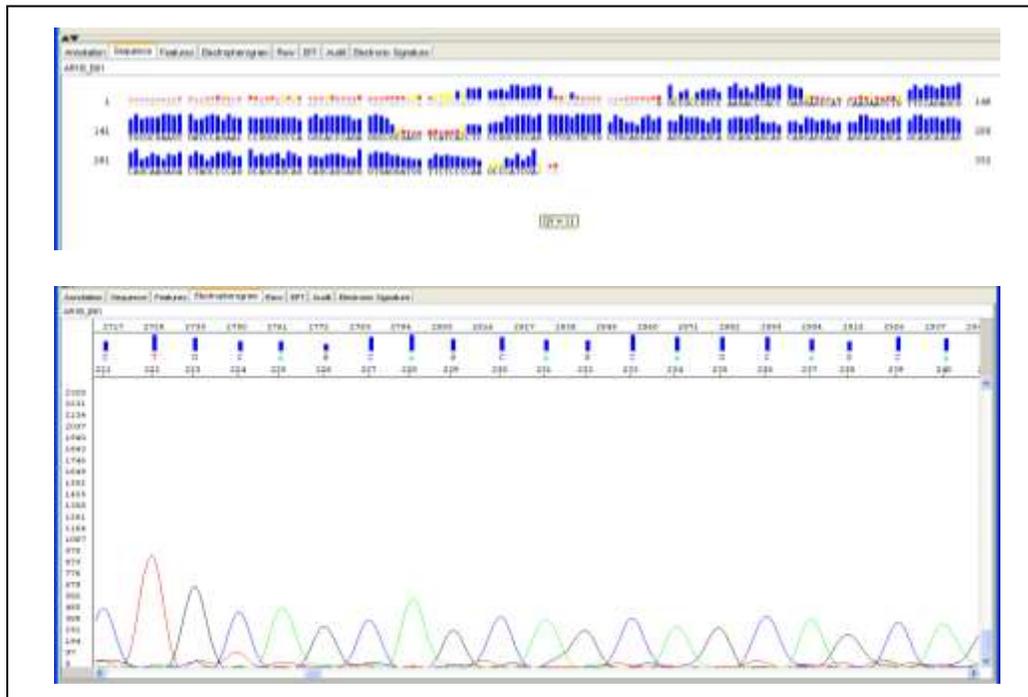


Figura12: Secuenciación y amplificación del receptor de andrógenos

VIII. Análisis de resultados: Se hizo una comparación del número de repeticiones del CAG del receptor de andrógenos entre los casos y controles (relación control: caso=1:0.75, con prueba de significancia estadística de distribución en T para datos no apareados), estableciéndose como nivel de significancia con una $p < 0.05$. Para llevar a cabo la correlación entre el número de repeticiones del receptor de andrógenos entre los casos y controles.

IX. RESULTADOS

9.1 Resultados de la selección de los controles fértiles.

Se analizaron un total de 50 tríos (padre, madre e hijo), de los cuales se probó la paternidad en 46 varones. En la figura 13 se muestra un ejemplo de los resultados de inclusión o exclusión de paternidad. Los 46 varones seleccionados se utilizaron como controles sanos para este estudio, donde se les determinó el número de repeticiones CAG junto con el grupo de pacientes infértiles.



Figura 13: Prueba de paternidad

9.2 Características epidemiológicas de las muestras

Se analizaron un total de 62 pacientes con infertilidad masculina de origen idiopático y 46 pacientes con fertilidad comprobada como grupo control.

La edad de los pacientes osciló entre los 21 y 48 años de edad con un promedio de 34.5 años. Los años de infertilidad conyugal variaron de meses hasta 22 años, obteniendo un promedio de 4.5 años de infertilidad conyugal. De los 62 pacientes con infertilidad masculina 56 (87%) tuvieron azoospermia y 6 pacientes (13%) con oligozoospermia de menos de 5 millones de espermatozoides por ml. Las biopsias testiculares realizadas para el diagnóstico de los pacientes reveló: Síndrome solo de células de Sertoli en 39 pacientes (62%), hipoespermatogénesis en 12 pacientes (18%), atrofia testicular en 8 pacientes (12%) y detención de la maduración a nivel de espermatoцитos primarios en 4 pacientes (6%). (ver figuras 14 y 15)

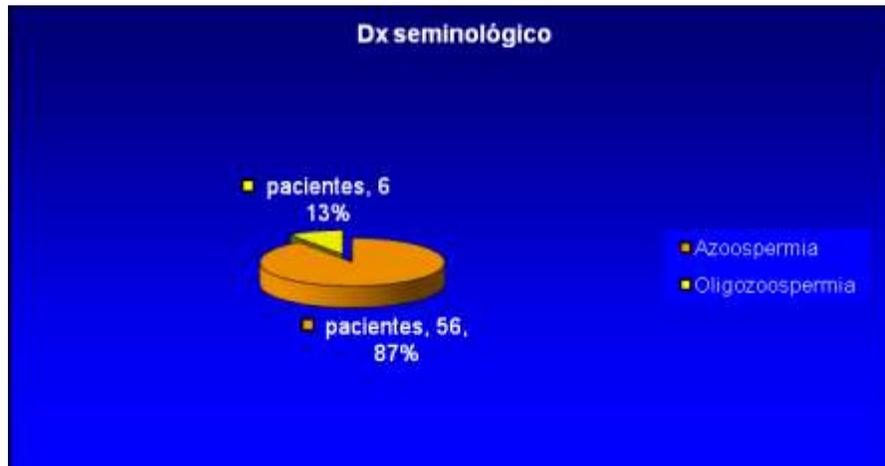


Figura 14. Diagnóstico seminológico

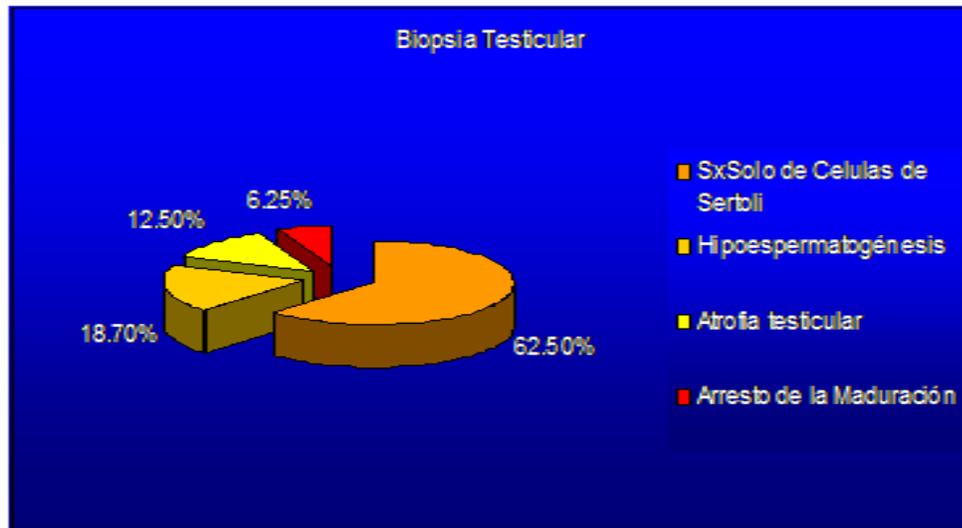


Figura 15. Biopsia testicular

De los sujetos a quienes se les analizaron el número de repeticiones CAG en el receptor de andrógenos se encontró un número de repeticiones CAG en los controles entre 18 y 30 repeticiones, con una media de 23.32 y una desviación estándar ± 2.557 , mientras que en los pacientes con infertilidad masculina de origen idiopático se encontró un número de repeticiones entre 12 y 30 repeticiones, con una media de 23.56 y una desviación estándar ± 3.006 , con una $p = 0.665$. El promedio más frecuente de repeticiones encontradas fue de 23 encontrándose este número en el 25.8% de los pacientes infértiles y en el 19.6% en los sujetos controles (tablas 3 y 4, figura 16)

Tabla 3. Número y porcentaje de repeticiones del CAG en sujetos infértiles

PACIENTES		
REPETICIONES	Numero de Sujetos (N)	% de repeticiones
30	1	1,6
29	2	3,2
28	2	3,2
27	5	8,1
26	5	8,1
25	5	8,1
24	10	16,1
23	16	25,8
22	5	8,1
21	2	3,2
20	5	8,1
19	1	1,6
18	2	3,2
12	1	1,6
Total	62	100

Tabla 4. Número y porcentaje de repeticiones del CAG en sujetos fértiles-grupo control

CONTROLES		
REPETICIONES	Numero de Sujetos (N)	% de repeticiones
30	1	2,2
29	1	2,2
28	2	4,3
26	3	6,5
25	6	13,
24	7	15,3
23	9	19,6
22	8	17,4
21	3	6,5
20	4	8,7
18	2	4,3
Total	46	100

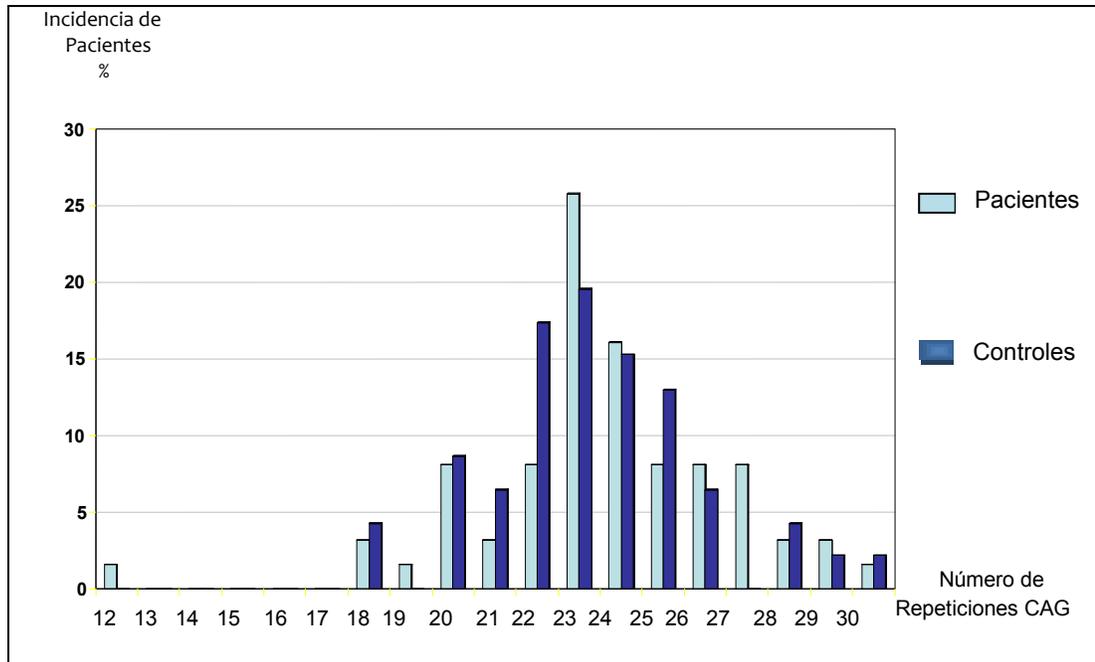


Figura 16. Gráfica de resultados

X. DISCUSIÓN

La repetición del CAG en el receptor de andrógenos y su asociación con infertilidad masculina ha sido debatida en los últimos años con publicaciones contradictorias por diferentes grupos de trabajo en el mundo, esto probablemente es debido a que el tracto del CAG del receptor de andrógenos se encuentra en un área muy polimórfica y a que varíe su expresión en distintas poblaciones étnicas.

Es interesante notar que en este estudio llevado a cabo en nuestra institución la variable de repeticiones del CAG en promedio que fue de 23 es similar en grupos fértiles e infértiles no siendo estadísticamente significativo, contradiciendo reportes de otros grupos de estudio en el mundo. Esto aumenta

aún más la discusión sobre la relevancia que tiene en número de repeticiones del CAG en el receptor de andrógenos como marcador de infertilidad masculina por lo que se sigue sugiriendo que es necesario obtener más datos de diferentes grupos étnicos con un número más grande de pacientes problemas y controles para determinar la asociación de expansión de repeticiones del CAG en el gen del receptor de andrógenos en la infertilidad masculina. Quedando en claro que la verdad en un grupo de población podría no ser la verdad en otros grupos poblacionales, sugiriendo que esto podría ser extrapolado a otros grupos de población con rasgos étnicos similares para propósitos de diagnóstico.

XI. CONCLUSIONES

Por primera vez en México se valora la asociación del número de repeticiones del CAG en la población con infertilidad masculina concluyendo la NO asociación del número de repeticiones del CAG de infertilidad masculina de origen idiopático en México. Estos resultados podrán estar extrapolados a otros grupos de población similares para fin de diagnóstico y consejo genético. Nuestros resultados están de acuerdo con otros autores en que en muchos de los casos de infertilidad masculina de origen idiopático, tienen una base multifactorial y que el número de repeticiones combinado con otros factores (aún no conocidos o identificados) de riesgos podrían llevar a la infertilidad.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ **Colston-Wentz A.** 1991. Infertilidad en: Tratado de Ginecología de Novak. Capítulo 10 Interamericana, McGraw-Hill, 11a. Edición. Pags: 231-264.
- ² **Joneses HW Jr,** and Toner JP. 1993. .The infertile couple. Review. *N. Engl. J. Med.* 2,329(23):1710-5..
- ³ **The ESHRE Capri Workshop Group.** 2000. Optimal use of infertility diagnostic tests and treatments. *Human Reproduction* 15(3):723-732
- ⁴ **Thonneau P,** Quesnot S, Ducot B, Marchand S, Fignon A, Lansac J, Spira A. 1992. Risk factors for female and male infertility: results of a case-control study. *Hum Reprod.* 7(1):55-8.
- ⁵ **Fauser BC,** Hsuch AJW. 1995. Genetic basis of human reproductive endocrine disorders. *Hum Reprod* 10: 826-846.
- ⁶ **Bhasin, S.,** Mallidis, C. and Ma, K. (2000) The genetic basis of infertility in men. Baillieres Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab., 14, 363-388
- ⁷ **Caserta D,** Baldi M, Marci R, Cutrupi F, Di Stefano M, Moscarini M. 2002. A new molecular and cytogenetic approach to sterility. A review of the literature. *Minerva Ginecol.* 54(1):25-32.
- ⁸ **Krausz, C.** and McElreavey, K. (1999) Y chromosome and male infertility. *Front. Biosci.,* 15, E1-E8.
- ⁹ **Calleja Macias IE,** Martinez Garza SG, Gallegos Rivas MC, Ortiz López R, Gómez Guerra L, Barrera Saldana HA, Gutierrez Gutierrez AM. Y chromosome micro-deletion identification in infertile males. *Ginecol Obstet Mex.* 2003 Jan;71:25-31.
- ¹⁰ **Adachi, M.,** Takayanagi, R., Tomura, A., Imasaki, K., Kato, S., Goto, K., Yanase, T., Ikuyama, S. and Nawata, H. (2000) Androgen-insensitivity síndrome as a posible coactivator disease. *N. Engl. J. Med.,* 343, 856-862.
- ¹¹ **Silver SJ,** Patricio P, Asch RH. Quantitative evaluation of testicular histology in men with congenital absence of the vas deferens undergoing epididymal sperm aspiratio. *Hum Reprod* 1990; 5: 89-93.
- ¹² **Denning CR,** Sommers SC, Quigley HJ. Infertility in males with cystic fibrosis. *Pediatrics* 1968; 41:7-17.
- ¹³ **Brinkmann, A.O.** and Trapman, J. (2000) Genetic analysis of androgen receptors in development and disease. *Adv. Pharmacol.,* 47, 317-314.
- ¹⁴ **Culig Z,** Hobish A, Cronauer MV, et. al. 1993. Mutant Androgen Receptor detected in an advanced-stage prostatic carcinoma is activated by adrenal androgens and progesterone. *Mol. Endocrinol.* 7:1541-150.
- ¹⁵ **Weinbauer G.F.,** Gromoll J, Simoni M y Nieschlag E. Physiology of the testicular function 2000. En Nieschlag E. and Bhre H.M.. *Andrology: Male reproduction Health and Dysfunction.* Ed. Springer. 2nd Edition. Cap.3, pag.23 a57
- ¹⁶ **McKee T y McKee J.** 2003. Integración del Metabolismo. En: *Bioquímica: La base molecular de la vida.* Edit. McGraw Hill. Cap. 16.pag. 530 a 561.
- ¹⁷ **Trounson A,** Bongso A. 1996. Fertilization and development in humans. *Curr Topics Dev Biol* 32:59-101.
- ¹⁸ **Hiort, O.,** Holterhus, P.M., Horter. T., Schulze, W., Kremke, B., Bals-Pratsch. M., Sinnecker, G.H. and Kruse, K. (2000) Significance of mutations in the androgen receptor gene in males with idiopathic infertility. *J. Clin. Endocrinol. Metab.,* 85, 2810-2815
- ¹⁹ On line Mendelian Inheritance in Man (OMIM). Acc. # 313700 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=313700>
- ²⁰ **Lubahn, D. B.;** Joseph, D. R.; Sullivan, P. M.; Willard, H. F.; French, F. S.; Wilson, E. M.: 1988. Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science* 240: 327-330.
- ²¹ **Shang, Y.;** Myers, M.; Brown, M. : Formation of the androgen receptor transcription complex. *Molec. Cell* 9: 601-610, 2002.

- ²² **Brinkmann AO**, Faber PW, van Rooij HC, Kuiper GG, Ris C, Klaassen P, van der Korput JA, Voorhorst MM, van Laar JH, Mulder E, et al. The human androgen receptor: domain structure, genomic organization and regulation of expression.. *J Steroid Biochem.* 1989;34(1-6):307-10
- ²³ **Doesburg. P.**, Kuil, C.W., Berrevoets, C.A., Steketee, K., Faber. P.W., Mulder. E., Brinkmann A.O. and Trapman. J. (1997) Functional in vivo interaction between the amino-terminal, transactivation domain and the ligand binding domain of the androgen receptor. *Biochemistry*, 36, 1052-1064
- ²⁴ **Fiscbeek, K.H.** (1997) Kennedy disease. *J. Inheri. Metab. Dis.*, 20, 152-158 Ghadessy, F.J., Lim, J., Abdullah, A.A., Panet-Raymond, V., Choo, C.K., Lumbroso, R., Tut, T.G., Gottlieb, B., Pinsky, L., Trifiro, M.A. and Yong, E.L., (1999) Oligospermic infertility associated with an androgen receptor mutation that disrupts interdomain and coactivator (TIF") interactions, *J. Clin. Invest.*, 103, 1517-1525.
- ²⁵ **Heinclin, C.A.** and Chang, C. (2002). Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocr. Rev.* 23, 175-200
- ²⁶ **He, B.**, Kempainen, J.A., Voegel, J.J., Gronemeyer, H. And Wilson, E.M. (1999) Activation function 2 in the human androgen receptor ligand binding domain mediates interdomain communication with the NH(2) terminal domain. *J. Biol. Chem.*, 274, 37219-37225.
- ²⁶ **Hsing A W** et al. *Cancer Res* 2000 Sep 60:5111-6
- ²⁸ **Platz EA** et al. *J Natl Cancer Inst* 2000 92:2009-17
- ²⁹ **Belin J** et al. *Cancer* 2001 92:941-9
- ³⁰ **Zitzmann** et al. *J Clin Endocrinol Metab* 2001
- ³¹ **Gromoll** et al. in preparation
- ³² **Ribeiro ML** et al. *Braz J Med Biol Res* 2002 35:205-13
- ³³ **Kittles RA** et al.. *Hum Genet* 2001 109:253-61
- ³⁴ **Panz VR** et al. *Endocrine* 2001 15:213-6
- ³⁵ **Brookes, A. J.** 1999. The essence of SNPs. *Gene* 234: 177–186
- ³⁶ **Cargill M.**, Altshuler D, Ireland J., Sklar P., Ardlie K., Patil N., Lane Ch. R., Lim E. P, Kalyanaraman N., Nemesh J., Ziaugra L., Friedland L., Rolfe A., Warrington J., Lipshutz R., Daley G. Q., & Lander E. S. 1999. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nature Genetics*. 22:341. (Nature America Inc. • <http://genetics.nature.com>)
- ³⁷ **Hardy DO**, Scher HI, Bogenreider T, Sabbatini P, Zhang ZF, Nanus DM, Catterall JF. Androgen receptor CAG repeat lengths in prostate cancer: correlation with age of onset. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996 Dec;81(12):4400-5
- ³⁸ **Coetsee GA**, Ross RK. 1994. Prostate cancer and the androgen receptor. *J. Natl. Cancer Inst.* 86:872-873.
- ³⁹ **Tut TG**, Ghadessy FJ, Trifiro MA, Pinsky L, Yong EL. Long polyglutamine tracts in the androgen receptor are associated with reduced trans-activation, impaired sperm production, and male infertility.
- ⁴⁰ **Dowsing AT**, Yong EL, Clark M, McLachlan RI, de Kretser DM, Trounson AO. Linkage between male infertility and trinucleotide repeat expansion in the androgen-receptor gene. *Lancet.* 1999 Aug 21;354(9179):640-3.
- ⁴¹ **Mifsud A**, Choon AT, Fang D, Yong EL. Prostate-specific antigen, testosterone, sex-hormone binding globulin and androgen receptor CAG repeat polymorphisms in subfertile and normal men. *Mol Hum Reprod.* 2001 Nov;7(11):1007-13.
- ⁴² **Beilin, J., Harewood, L., Frydenberg, M., Mameghan, H., Martyres, R. F., Farish, S. J., Yue, C., Deam, D. R., Byron, K. A. & Zajac, J. D.** (2001) A case-control study of the androgen receptor ge CAG repeat polymorphism in Australian prostate carcinoma subjects. *Cancer* 92, 941-949.
- ⁴³ **Sasagawa, L., Suzuki, Y., Ashida, J., Nakada, T., Muroya, K. and Ogata, T.,** (2001) CAG repeat length analysis and mutation screening of the androgen receptor gene in Japanese men with idiopathic azoospermia. *J. Androl.* 22, 804-808
- ⁴⁴ **Correa-cerro, L.,** Wohr, G., Haussler, J., Berthon, P., Drelon, E., Mangin, P. Et al. (1999). (CAG)_n, CAA and GGN repeats in the human androgen receptor gene are not associate

- with prostate cancer in a French-German population. *European journal of Human Genetics* 7, 357-362.
- ⁴⁵ **Matias, P.M.**, Donner, P., Coelho, R., Thomaz, M., Peixoto, C., Macedo, S., Otto, N., Joschko, S., Scholz, P., Wegg, A., Baster, S., Schafer, M., Egner, U., and Carrondo, M.A., (2000) Structural evidence for ligand specificity in the binding domain of the human androgen receptor. Implications for pathogenic gene mutations. *J. Biol. Chem*, 275, 26164-26171.
- ⁴⁶ **Hsing, A.W.**, Gao, Y.T., Wu, G., Wang, X., Deng, J., Chen, Y.L., Sesterhenn, A., Mostofi, F.K., Benichou, J. and Chang. C. (2000) Polymorphic CAG and GGN repeat Lengths in the androgen receptor gene and prostate cancer risk: a population based case control study in China. *Cancer Res.*, 60, 5111-5116.
- ⁴⁷ **Giwerzman YL**, 1988. Xu C, Arver S, Pousette A, Reneland R. No association between the androgen receptor gene CAG repeat and impaired sperm production in Swedish men. *Clin Genet.* Nov;54(5):435-6.
- ⁴⁸ **Dadze S**, Wieland C, Jakubiczka S, Funke K, Schroder E, Royer-Pokora B, Willers R, Wieacker PE. 2000. The size of CAG repeats in exón 1 of the Androgen Receptor gene shows no significant relationship to impaired spermatogenesis in a infertile Caucasoid sample of German origin. *Mol. Hum. Rep.* 6:207-214
- ⁴⁹ **von Eckardstein, S.**, Syska, A., Gromoll, J., Kamischke, A., Simoni, M. And Nieschlag, E., (2001) Inverse correlation Between sperm concentration and number of androgen receptor CAG repeats in normal men *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86, 2585-2590.
- ⁵⁰ **Van Golde, R.**, Van Houwelingen, K., Kiemeneij, L., Kremer, J., Tuerfings, J., Schalken, J., and Meuleman, E., (2002) Is increased CAG repeat Length in the androgen receptor gene a risk factor male subfertility? *J. Urol.*, 167, 621-623.
- ⁵¹ **Irvine, R.A.**, Ma. H., Yu, M.C., Ross, R.K., Stallcup, M.R. and Coetzee, G.A. (2000) Inhibition of p 160-mediated coactivation with increasing androgen receptor polyglutamine length. *Hum. Mol. Genet.*, 9, 267-274.
- ⁵² **Lim, J.**, Ghadessy, F.J., Abdullah, A.A., Pinsky, L., Trifiro, M. and Yong, E.L., (2000a) Human androgen receptor mutation disrupts ternary interactions between ligand, receptor domains, and the coactivator TIF2 (transcriptions intermediary factor 2). *Mol. Endocrinol.*, 14, 1187-1197.
- ⁵³ **La Spada AR**, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fishbeck KH.E 1991. Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature.* 1991 Jul 4;352(6330):77-
- ⁵⁴ **Dejager, S.**, Bry-Gaullard, H., Bruckert, E., Eymard, B., Salachas, F., LeGuern, E., Tardieu, S., Chadarevian, R., Giral. P. And Turpin, G.A. (2002) A comprehensive encocrine description of Kennedy's disease revealing androgen insensitivity linked to CAG repeat length. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 87 3893-3901.
- ⁵⁵ **Chamberlain NL**, Driver ED, Miesfield RL. 1994. The length and localization of CAG repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect trans-activation function. *Nucleic Acids Res.* 22:3181-3186.
- ⁵⁶ **Choong CS**, Quigley CA, French FS, Wilson EM. 1996. A novel missense mutation in the amino-terminal domain of the human androgen receptor gene in a family with partial androgen insensitivity syndrome causes reduced efficiency of protein translation. *J Clin Invest.* 98(6):1423-31.
- ⁵⁷ **Giwerzman, A.**, Kledal, T., Schwartz, M., Giwerzman, Y.L., Leffers, H., Zazzi, H., Wedwll, A. and Skakkeback, N.E. (2000) Preserved male fertility despite decreased androgen sensitivity caused by a mutation in the ligand-binding domain of the androgen receptor gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85, 2253-2259
- ⁵⁸ **Stefeno T**, Sasagawa I, Ashida J, Nakada T, Ogata T. 2000. Absence of Y-chromosome microdeletions in patients with isolated hypospadias. *Fertil Steril* 74:399-400.
- ⁵⁹ **Casella R**, Maduro MR, Misfud A, Lipshultz LI, Yong EL, Lamb DJ. 2003. Androgen receptor gene polyglutamine length is associated with testicular histology in infertile patients. *J Urol.* 169(1):224-7
- ⁶⁰ **Beilin, J., Harewood, L.**, Frydenberg, M., Mameghan, H., Martyres, R. F., Farish, S. J., Yue, C., Deam, D. R., Byron, K. A. & Zajac, J. D. (2001) A case-control study of the androgen

- receptor ge CAG repeat polymorphism in Australian prostate carcinoma subjects. *Cancer* 92, 941-949.
- ⁶¹ **Giovannucci, E.**, Stampfer, M. J., Krithivas, K., Brown, M., Dahl, D., brufsky, A., Talcott, J., Hennekens, C. H. & Kantoff, P. W. (1997) The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 94, 3320-3323.
- ⁶² **Giovannucci, E.**, Platz, E. A., Stampfer, M. J., Chan, A., Krithivas, K., Kawachi, I., Willett, W. C. & Kantoff, P.W. (1999b) The CAG repeat within the androgen receptor gene and benign prostatic hyperplasia. *Urology* 53, 121-125.
- ⁶³ **Alevizaki M**, Cimponeriu AT, Garofallaki M, Sarika HL, Alevizaki CC, Papamichael C, Philippou G, Anastasiou EA, Lekakis JP, Mavrikakis M. The androgen receptor gene CAG polymorphism is associated with the severity of coronary artery disease in men. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003 Dec;59(6):749-55.
- ⁶⁴ **Raijpert-De Meyts**. E., Leffers, H., Petersen, J.H., Andersen, A.G., Carlsen, E., Jorgensen, N. And Skakkeback, N.E., (2002) CAG repeat length in androgen-receptor gene and reproductive variables in fertile and infertile men. *Lancet*, 359, 44-46.

XIII. ANEXO 1

SERVICIO DE UROLOGÍA Y UNIDAD DE ANDROLOGÍA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO “DR. JOSÉ E. GONZÁLEZ” Y EL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA

CONSENTIMIENTO INFORMADO

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

Determinación de repeticiones del CAG en el receptor de andrógenos y su relación con la infertilidad masculina.

Estimado paciente:

Se extiende una invitación a participar en el proyecto de investigación Determinación de repeticiones del CAG en el receptor de andrógenos y su relación con la infertilidad masculina la cual es dirigido por el Dr. Lauro S. Gómez Guerra jefe del Servicio de Urología y Unidad de Andrología del Hospital Universitario (Teléfono: 83 33 17 13).

La infertilidad masculina afecta un 15 a 20% de las parejas y de estas en la mitad de las ocasiones el varón es la causa de tal situación. Se calcula que alrededor de un 40% de las causas de infertilidad en el hombre son de origen desconocido. Se sabe que los factores genéticos están involucrados en la mayor parte de los casos del origen desconocido de la infertilidad en el hombre. Actualmente con los avances de ingeniería genética y biología molecular es posible conocer el origen exacto de la infertilidad en el hombre, y esto es sumamente importante diagnosticarlos en vista de los avances en la medicina reproductiva.

Si usted desea contribuir voluntariamente a este estudio, su médico le hará un examen clínico completo, y se le realizará exámenes de sangre para el estudio de las alteraciones genéticas que afectan su fertilidad solicitando su consentimiento para usar estas muestras para nuestra investigación. Estas muestras serán examinadas con mayor detalle en el laboratorio de bioquímica de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. Necesitamos su permiso para el análisis de la muestra y guardar las mismas para futuros estudios. Usted puede aceptar o rechazar que las guardemos para investigaciones futuras. Si decide que no quiere dar una muestra, o que no sea utilizada para estudios futuros, su decisión no afectara de ninguna manera la atención medica que va a recibir.

Si acepta donar su muestra para este estudio, esta será usada para que los científicos puedan aprender mas sobre las causas de infertilidad en el hombre y solo será usada para esta investigación medica únicamente. Los resultados de este estudio no interferirán en su cuidado medico.

Para garantizar su privacidad, en lugar de su nombre utilizaremos un número para marcar la muestra que será utilizado para identificar el reporte de su muestra. Toda la información recolectada ser asegurada en archivos del Servicio de Urología del Hospital Universitario de la U.A.N.L., para futuros estudios. Toda la información acerca de su muestra será confidencial en los términos permitidos por la ley de investigaciones.

En cualquier momento usted puede informarle a los investigadores que desea salir del estudio y ellos procederán a destruir su muestra en el momento que usted indique. El proyecto de esta investigación ha sido aprobado por los Comité de Investigación y Ética del Hospital Universitario y Facultad de Medicina de la U.A.N.L.

Declaración del participante para el almacenamiento de la muestra:

Si usted entiende completamente la información que se le ha entregado sobre el estudio y ha decidido participar en él, por favor firme a continuación. Antes de firmar asegúrese que se la hayan contestado todas sus preguntas y dudas, si tiene alguna pregunta o duda sobre sus derechos a participar en esta investigación, llame al Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. al 83 48 57 81. Si usted decide participar en esta investigación se le entregará una copia de este consentimiento informado.

Si acepto participar en dar una muestra de sangre para que sea usada _____ en este estudio.

Si acepto para que mi muestra sea almacenada para estudios futuros. _____

Firma de la persona que da el consentimiento

Fecha

Normalmente la valoración y toma de muestra no involucra complicaciones, pero si usted sufre de cualquier herida como resultado de este estudio, tenga claro que no se ha hecho ningún arreglo para dar tratamiento gratis o cualquier otro tipo de pago. Sin embargo, usted tendrá a su disposición todas las facilidades para tratamiento de urgencia y los servicios profesionales que requiera, así como los disponibles en la comunidad en general. Usted puede reportar cualquier herida al Dr. Lauro S. Gómez Guerra al (81) 83 33 17 13 y al comité de Investigación y Ética y Hospital Universitario y Facultad de Medicina de la UNAL al (81) 83 48 57 81.