



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

**“Análisis de polimorfismos en los receptores de
Estrógenos y Andrógenos en un grupo de pacientes
con infertilidad masculina”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

JOSÉ MANUEL HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

ASESORES: Dra. HAYDEÉ ROSAS VARGAS
Dr. RAMÓN M. CORAL VAZQUEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Análisis de polimorfismos en los receptores de estrógenos
y andrógenos en un grupo de pacientes con infertilidad
masculina".

que presenta el pasante: José Manuel Hernández Hernández
con número de cuenta: 9606401-4 para obtener el título de :
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 18 de Mayo de 2004

PRESIDENTE	<u>CPB. Ma. Esther Revuelta Miranda</u>	
VOCAL	<u>Ira. Sandra Díaz Berriga Arceo</u>	
SECRETARIO	<u>Dr. Ramón M. Coral Vázquez</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>CPB René Danién Santos</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MG. Rosa Isela Alvarez González</u>	

A mis padres

Ma. Guillermina Hernández Flores

José Manuel Hernández Jiménez

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

ÍNDICE	Página
Lista de abreviaturas	iii
Índice de tablas y figuras	iv
Resumen	v
I Introducción	1
1.1 Infertilidad :Epidemiología y Etiología	1
1.1.1 Trastornos endócrinos del eje hipotálamo-hipofisario	1
1.1.2 Trastornos vasculares	2
1.1.3 Procesos infecciosos	2
1.1.4 Trastornos genéticos	2
1.1.4.a Infertilidad masculina con un defecto genético único	3
1.1.4.b Infertilidad masculina con un defecto cromosómico	3
1.1.5 Otras causas de infertilidad masculina.	4
1.2 Receptor de Estrógenos: Estructura y organización.	4
1.3 Estrógenos y su función en el sistema reproductor masculino.	6
1.4 Receptor de Andrógenos: Estructura y organización.	8
1.5 Andrógenos y su función en el sistema reproductor masculino.	9
1.6 Mecanismo de acción de los receptores nucleares	10
1.7 Definición de polimorfismo genético.	11
1.8 Polimorfismos en el Receptor de Estrógenos- α	12
1.9 Polimorfismos en el Receptor de Andrógenos	12

1.10 Expansión de trinucleótidos repetidos.	13
II Justificación	16
III Objetivos	16
3.1 Objetivo general	16
3.2 Objetivos particulares	16
IV Metodología	17
4.1 Grupos de estudio	17
4.2 Obtención de DNA genómico	17
4.3 Análisis de polimorfismos en el receptor de Estrógenos- α	18
4.3.1 PCR	18
4.3.2 RFLP's	19
4.4 Análisis de trinucleótidos repetidos (CAG) $_n$ en el receptor de Andrógenos.	20
4.4.1 PCR	20
4.4.2 GeneScan	20
4.4.3 Secuenciación de trinucleótidos repetidos	21
V Resultados	22
VI Discusión	31
VII Conclusiones	35
VIII Referencias	36

Índice de tablas y figuras	Página
Figura 1 Estructura del RE- α y RE- β humanos.	5
Figura 2 Representación esquemática del gen del receptor de andrógenos humano.	8
Figura 3 Mecanismo de acción general de los receptores nucleares.	11
Figura 4 Mecanismo de formación de los trinucleótidos repetidos.	15
Figura 5 Localización y secuencia de los sitios de restricción de las enzimas XbaI y PvuII	19
Figura 6 Análisis de genotipos en los polimorfismos Pvu II y Xba I.	22
Figura 7 Análisis por Genescan de un alelo con 28 repetidos.	26
Figura 8 Secuenciación de trinucleótidos repetidos.	26
Figura 9 Gráfico de la distribución de repetidos en el grupo control y en pacientes infértiles.	28
Figura 10 Gráfico de la distribución de repetidos en el grupo control, en pacientes azoospermicos y oligozoospermicos.	29
Figura 11 Curva ROC de repetidos CAG en el RA .	30
Tabla 1 Principales características de las isoformas del RE.	6
Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en los ensayos de PCR	18
Tabla 3 Distribución de frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo Xba I en diferentes poblaciones	23
Tabla 4 Distribución de frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo Pvu II en diferentes poblaciones	23
Tabla 5. Distribución de frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo Pvu II en el receptor de Estrógenos- α .	25
Tabla 6. Distribución de frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo Xba I en el receptor de Estrógenos- α .	25
Tabla 7 . Datos hormonales de pacientes azoospermicos y oligozoospermicos	28

Lista de abreviaturas

AMH	Hormona antimulleriana
DM	Distrofia miotónica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP's	Desoxirribonucleótidos trifosfato
Fra X	Síndrome del X frágil
FRDA	Ataxia de Friedreich
HD	Enfermedad de Hungtinton
HRE	Elementos de respuesta a hormonas
Kb	Kilobase
KDa	Kilodaltones
MJD SCA-3	Enfermedad espinocerebelar Machado-Joseph ataxia tipo 3
mM	Milimolar
ng	Nanogramos
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RA	Receptor de Andrógenos
RCLB	Amortiguador de lisis de células rojas
RE- α	Receptor de Estrógenos- α
RE- β	Receptor de Estrógenos- β
RFLP's	Polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto.
SBMA	Atrofia muscular espinal y bulbar
TAF-1	Función de activación de la trascripción 1
TDF	Factor de diferenciación testicular
μ l	Microlitro

RESUMEN

La infertilidad masculina es responsable de cerca del 40% de los problemas de infertilidad en una pareja. Debido a su carácter multifactorial, se han estudiado las posibles causas de esta patología encontrando que un porcentaje considerable de éstas corresponden a un origen genético evidente. Sin embargo, con base en el papel fundamental de los andrógenos y estrógenos sobre el desarrollo y mantenimiento del tracto reproductor masculino, se han realizado estudios encaminados a determinar si polimorfismos en los genes que codifican los receptores de éstas hormonas contribuyen al desarrollo de infertilidad masculina.

Se ha descrito que la extensión en el número de trinucleótidos repetidos CAG en el exón 1 del receptor de andrógenos está directamente relacionado con el desarrollo de azoospermia y oligozoospermia en poblaciones de distintas etnias. Por otro lado, los polimorfismos Xba I y Pvu II en el intrón 1 del receptor de estrógenos- α , han sido asociados con infertilidad masculina. Con base en éstos antecedentes, en este estudio se analizó la asociación de éstos polimorfismos en un grupo de pacientes infértiles mexicanos, clínicamente diagnosticados con azoospermia y oligozoospermia idiopática.

El análisis del número de trinucleótidos repetidos CAG en el exón 1 del receptor de andrógenos no mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los pacientes infértiles. Del mismo modo, la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos Pvu II y Xba I no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio.

Nuestros resultados indican que la presencia de los polimorfismos Xba I y Pvu II en el receptor de estrógenos- α y el número de trinucleótidos repetidos CAG en el gen del receptor de andrógenos no constituyen un factor de riesgo para el desarrollo de infertilidad masculina en la muestra analizada.

I INTRODUCCIÓN

1.1 Infertilidad: Etiología y Epidemiología

Infertilidad se define como la incapacidad de tener hijos después de 12 meses de relaciones sexuales sin ningún tipo de protección anticonceptiva (Rowe et al., 1993).

La infertilidad se clasifica como primaria cuando nunca se ha logrado un embarazo, y secundaria, cuando se han logrado embarazos previos (Pérez, 2002; Rowe et al., 2000).

Se estima que la infertilidad es un problema que afecta al 15% de las parejas en edad reproductiva. Cerca del 40% de los problemas de infertilidad lo constituyen factores femeninos, el 40% se atribuyen a factores masculinos, aproximadamente del 5 al 10 % lo constituyen factores en ambas parejas y el 5 al 10% restante se atribuyen a factores de etiología desconocida (Comhaire, 1997; Forti et al., 1998).

Aunque no existen datos estadísticos a nivel mundial que permitan conocer el origen de la infertilidad masculina y su frecuencia, es posible tener una aproximación por medio del análisis de las evaluaciones realizadas a pacientes con infertilidad en regiones específicas que acuden a unidades de medicina reproductiva. Con base en estos datos, las alteraciones del factor masculino se dividen en:

1.1.1 Trastornos endocrinos del eje hipotálamo - hipofisario

Constituyen menos del 10% de las causas de infertilidad en el hombre; entre las más importantes se encuentran las alteraciones tiroideas y de las suprarrenales, trastornos hipotalámicos e hipofisarios y enfermedades agudas y crónicas asociadas a hipogonadismo. En general, el resultado de dichas alteraciones es la afección del funcionamiento testicular, alteración de la espermatogénesis y esteroidogénesis, así como la disminución de libido a causa de la disminución en la secreción de gonadotropinas (Seminara et al., 2000).

1.1.2 Trastornos vasculares

El varicocele es la presencia de varices en el plexo pampiniforme, así como en la venas del grupo anterior del cordón espermático. Su incidencia en hombres infértiles varía entre el 20 y 39%. El mecanismo por el que el varicocele altera la espermatogénesis no se conoce con certeza, pero se señalan como factores incidentes el aumento en la temperatura testicular, el reflujo de sustancias tóxicas que el propio testículo elimina, la alta concentración de catecolaminas y el aumento de la presión intratesticular (Seminaria et al., 2000).

1.1.3 Procesos infecciosos

Una causa frecuente de infertilidad es el daño producido por infecciones locales o sistémicas. La mas frecuente es la orquitis posparotiditis, que inicia alrededor de dos semanas después de un cuadro de parotiditis, por lo general el compromiso es unilateral, y aunque hay alteración en la espermatogénesis, ésta no se afecta notablemente en su cuenta total por la producción del testículo contralateral, aunque el 17% de los casos la orquitis es bilateral y en la mitad de ellos hay infertilidad. Otros factores etiológicos de orquiepididimitis infecciosa son los gonococos, *Mycobacterium* y *Treponema pallidum*. Otros agentes infecciosos que producen infertilidad son *Micoplasma* y *Chlamydia* que aunque no disminuye la producción espermática, se transmite a la mujer, en quien causa daño tubario grave (Sigman y Howards, 1992).

1.1.4 Trastornos genéticos

Existen diferentes formas de clasificación de la infertilidad masculina con bases genéticas, Pérez (2002), la clasifica de la siguiente manera:

- ❖ Infertilidad masculina con un defecto genético único.
- ❖ Infertilidad masculina con defectos cromosómicos (estructurales o numéricos).

De acuerdo con ésta clasificación, un trastorno genético o cromosómico (numérico o estructural) puede dañar la producción hormonal y, por ende, la estimulación de la espermatogénesis, siendo un evento pretesticular, o alterar el control del proceso espermatogénico (evento testicular) así como el transporte espermático (evento pos-testicular).

1.1.4.a Infertilidad masculina con un defecto genético único

Este tipo de defectos genéticos, también llamados trastornos mendelianos, se deben a un alelo mutante o a un par de alelos mutantes en un solo sitio y su herencia puede ser dominante o recesiva. Entre las enfermedades más frecuentes de esta modalidad se encuentran: el síndrome de Kallman (gen KAL, locus p22.3) caracterizada por pubertad retrasada, testículos pequeños y paladar hendido; fibrosis quística (gen CFTR, locus 7q31.2), en la que se encuentran los conductos Wolffianos mal desarrollados, ausencia congénita de vasos deferentes e insensibilidad a los andrógenos. La característica principal de los pacientes con fibrosis quística es azoospermia y oligozoospermia, así como diferentes grados de feminización testicular.

1.1.4.b Infertilidad masculina con un defecto cromosómico

La incidencia de las anomalías cromosómicas en hombres infértiles varía entre el 2-20%. Las anomalías cromosómicas pueden ser numéricas o estructurales y resultan de mutaciones de novo en la línea de células germinales paternas. Entre los defectos numéricos se encuentran las poliploidías o aneuploidías, que se presentan como resultado de una no separación cromosómica (no disyunción) o por rezago anafásico de un cromosoma durante la anafase de la división celular. Estas fallas pueden presentarse tanto en la meiosis como en la mitosis, y en caso de afectar la meiosis pueden ocurrir en la meiosis I o II y por supuesto, durante la espermatogénesis. Las anomalías estructurales son consecuencia de la ruptura cromosómica (Mak et al., 1996).

Alrededor del 15% de los hombres azoospermicos y el 5% de los oligozoospermicos cursan con un cariotipo anormal. En los primeros la anomalía cromosómica más común es el síndrome de Klinefelter (47, XXY), en los segundos, son más frecuentes las anomalías cromosómicas Robertsonianas y translocaciones recíprocas. En ambos grupos de pacientes se encuentra una región del cromosoma Y (región AZF) donde son más frecuentes las deleciones causantes de azoospermia. Esta región se encuentra en el locus Yq11.23 y las microdeleciones se pueden localizar en uno de los tres sitios a, b o c que constituyen la región AZF (Prior et al., 1997).

1.1.5 Otras causas de infertilidad masculina

En este grupo se clasifican los trastornos inmunológicos como la presencia de anticuerpos antiespermatozoides; factores neurológicos ocasionados por traumatismos, enfermedades degenerativas o procesos infecciosos que pueden desencadenar disfunción eyaculatoria, azoospermia y oligozoospermia por medio de la alteración del epitelio germinal; factores ambientales como el estrés emocional o físico acentuados, alcohol, tabaquismo, dietas restrictivas, la radiación diagnóstica o terapéutica y medicación que pueden alterar la espermatogénesis. Los trastornos idiopáticos son una entidad que abarca una serie de alteraciones de naturaleza desconocida cuyo dato principal es la azoospermia (Pérez, 2002).

1.2 Receptor de Estrógenos.

Estructura y Organización

Los receptores de estrógenos (REs) fueron caracterizados por primera vez por Jensen y Desombre durante la década de 1970 (O'Donnel et al., 2001). Los REs, pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares, en la que se agrupan además, receptores de otras hormonas esteroides, hormonas tiroideas, vitamina D y retinoides, así como un gran número de receptores denominados huérfanos, debido a que se desconoce su ligando específico (Mangelsdorf et.al., 1995). Desde 1996, una segunda forma de receptor de estrógeno fue reportada en varias especies incluyendo la rata, el ratón y el humano (Tremblay et al., 1997; Kuiper et al., 1996). Este receptor descubierto recientemente fue nombrado receptor de estrógenos beta (RE- β), por lo que al receptor conocido anteriormente se le denominó receptor de estrógenos alfa (RE- α) (O'Donnel et al., 2001).

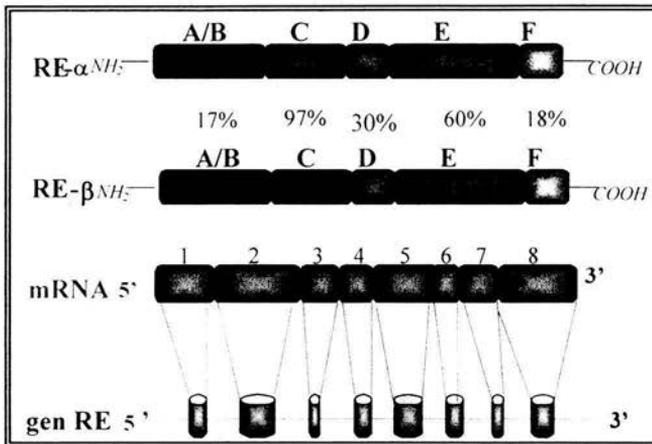


Figura 1. Estructura del RE- α y RE- β humanos. Ambos genes miden aproximadamente 140 Kb y su mRNA contiene ocho exones. Se muestran los dominios funcionales más altamente conservados entre las hormonas esteroideas. A/B: el dominio N-terminal contiene la región funcional de activación transcripcional independiente de ligando; el dominio C, de unión al DNA, la región bisagra D, el dominio E que contiene el dominio de unión al ligando y a la región funcional de activación transcripcional dependiente del ligando. Se indica el porcentaje de homología entre los dominios funcionales de los RE's.

Los genes humanos del receptor de RE- α y RE- β (figura 1) se localizan en los loci 6q25.1 y 14q22-24, respectivamente. Su tamaño es de 140 kilobases (Kb) dentro de los que se encuentran contenidos 8 exones cuya función es la siguiente: el exón 1 codifica el dominio de activación de la transcripción; los exones 2-3 codifican el dominio de unión al DNA y los exones 4-8 codifican el dominio de unión al ligando. (Suzuki, 2002). El gen humano del RE- α codifica una proteína de 595 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 66 KDa, mientras que el del RE- β codifica una proteína de 485 aminoácidos, y tiene un peso molecular estimado de 54 KDa. Ambos receptores consisten de seis dominios funcionales. El dominio N-terminal (A/B), es el menos conservado entre ambas proteínas (17% de homología) y contiene una región crítica para las funciones de transactivación del receptor y varios sitios de fosforilación que son importantes en el proceso de activación de la proteína, especialmente en los procesos donde el receptor es activado en ausencia de hormona (Couse et al., 1999); el dominio C es el más altamente conservado entre los receptores de estrógeno (97% de homología), así como entre los diferentes receptores nucleares. Este dominio se compone de nueve residuos de cisteínas que son invariablemente conservados entre los diferentes

receptores esteroideos, de los cuales, ocho están ordenados alrededor de dos iones de Zn^{2+} para formar dos dedos de zinc que le confieren al receptor la capacidad de unirse específicamente al ADN. La unión a una secuencia específica en el ADN está determinada por la composición de aminoácidos localizada entre estos dos dedos de zinc. El dominio D, no ha sido bien caracterizado, pero se sabe que participa en la unión a la proteína chaperona de choque térmico hsp90, la cual permanece unida al receptor mientras éste se encuentre en un estado inactivo y contiene señales de localización nuclear de los REs. El dominio E (60% homología) funciona como dominio de unión al ligando. Otras funciones de este dominio incluyen una función de activación de la transcripción (TAF-2), dimerización, interacción con otras proteínas co-activadoras o co-represoras de la transcripción, fosforilación y localización nuclear. (Michaela Luconi et al., 2002).

Tabla 1. Principales características de las isoformas del Receptor de Estrógenos.

	RE-alfa	RE-beta
LOCUS	6q25.1	14q22-24
GEN	140 Kb, 8 exones	140 Kb, 8 exones
PROTEÍNA	66 KDa, 595 a.a.,	54 KDa, 485 a.a.
EXPRESIÓN	Hígado, tejido adiposo, músculo esquelético, pituitaria, hipotálamo, conductos deferentes, epidídimo, células de Leydig	Próstata, cerebro, cerebelo y corteza cerebral, vejiga, vesículas seminales, células de Sertoli y testículos

1.3 Estrógenos y su función en el sistema reproductor masculino.

Existe una considerable especificidad tisular en la expresión de los REs (tabla 1). El RE- α se expresa en mayor proporción en útero, hígado, riñón, tejido adiposo, músculo esquelético, pituitaria e hipotálamo (Saunders et al., 2001); mientras que el RE- β se encuentra en ovario, glándulas mamarias, útero así como en algunas regiones del cerebro, incluyendo el sistema límbico, cerebelo y corteza cerebral (Couse et al., 1997; Saunders et al., 2001). Mientras que el RE- β se encuentra muy difundido en órganos sexuales masculinos accesorios como próstata, vejiga, vesículas seminales y testículos, el RE- α se localiza principalmente en conductos deferentes; ambos receptores se expresan en epidídimo y células de espermatogonia. (Pentikainen et al., 2000).

Al igual que la progesterona, los estrógenos han sido considerados como hormonas sexuales femeninas por excelencia y su papel en la regulación del desarrollo y mantenimiento del sistema reproductor masculino ha sido objeto de estudio en años recientes (Greco et al., 1994). Sin embargo se sabe que los estrógenos juegan un papel importante en diferentes procesos fisiológicos como mineralización y crecimiento óseo, regulación del tono vascular, masculinización y comportamiento sexual, adhesión plaquetaria, adipogénesis, etc. (Sharpe et al., 1998).

Los estrógenos se sintetizan en dos diferentes tipos celulares del sistema reproductor masculino: las células de Sertoli y las células de Leydig, en las que se expresa la enzima aromataasa P450, cuya función es catalizar la síntesis de estrógenos por medio de la aromatización de andrógenos. Se ha reportado que la concentración de estrógenos testicular es igual o mayor que la concentración sérica (Hess 2000), lo que sugiere un papel fundamental en el funcionamiento del sistema reproductor masculino.

Hess y col. (2001) sugieren que los estrógenos regulan procesos de reabsorción de fluidos en el tracto reproductor masculino con base en las siguientes observaciones: a) los estrógenos se encuentran en altas concentraciones en los fluidos del rete testicular; b) los conductos deferentes contienen la mas alta concentración de REs- α que en cualquier otro órgano estudiado y c) en los conductos deferentes se reabsorben cerca del 90% de los fluidos lumbales (Lubahn et al., 1993). Con el desarrollo del modelo knockout para el receptor de estrógenos- α , se demostró que el ratón macho adulto es infértil y que la alteración o pérdida del RE- α afecta la función del sistema reproductor masculino, disminuyendo la concentración y motilidad de los espermatozoides en túbulos deferentes y epidídimo. (Eddy et al., 1996). Se ha reportado que los estrógenos regulan la expresión de la proteína N-caderina, a nivel testicular (MacCalman et al., 1994), lo que sugiere que la alteración o pérdida de un RE- α funcional puede alterar su expresión, impidiendo los contactos célula-célula, esenciales para el mantenimiento apropiado de la distribución de fluidos. La acumulación paulatina de líquidos en éste tejido provoca un incremento en la presión intratesticular y compromete gradualmente el flujo sanguíneo (Lee et al., 2000); como consecuencia la parte superior de los túbulos seminíferos se inflaman, causando primero un incremento en el volumen testicular y después una degeneración progresiva con drástica reducción de la espermatogénesis y engrosamiento testicular (Hess 2003; Hess et al., 1997)

1.4 Receptor de Andr6genos

Estructura y organizaci3n

El receptor de andr6genos (RA) es un factor de activaci3n de la transcripci3n, miembro de la familia de receptores nucleares (Abdulmageed et al., 2002; Mangelsdorf et al., 1995). El gen del RA se localiza en el brazo largo del cromosoma X en la posici3n Xq11-12 (Jenster et al., 1991), mide aproximadamente 90 kilobases y contiene 8 exones en un mRNA de 2757 pb. El ex3n 1 mide aproximadamente 1586 pb y codifica el dominio de activaci3n de la transcripci3n independiente del ligando, los exones 2-3 miden 152-117 pb y codifican el dominio de uni3n al DNA, y los exones 4-8 de tama1o aproximado de 134-288 pb, codifican el dominio de uni3n al ligando (figura 2) (Lund et al., 2003).

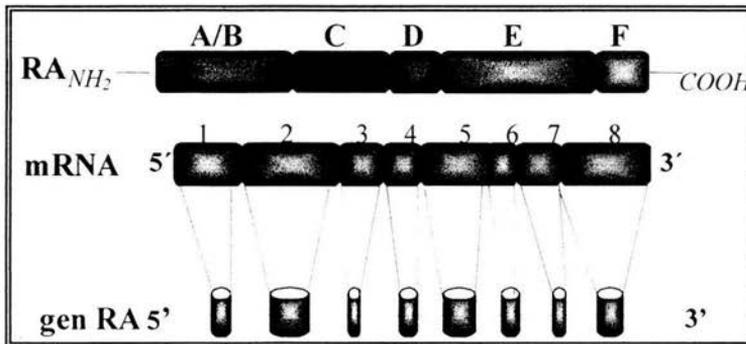


Figura 2. Representaci3n esquemática del mRNA y la prote3na del RA. El mRNA consiste de ocho exones que son transcritos a partir de un gen de aproximadamente 90 Kb y codifica una prote3na con 4 dominios funcionales: A/B, el dominio N-terminal contiene la regi3n funcional de activaci3n transcripcional independiente de ligando; el dominio C, de uni3n al DNA, la regi3n bisagra D, el dominio E que contiene el dominio de uni3n al ligando y la regi3n funcional de activaci3n transcripcional dependiente del ligando.

El RA es una prote3na de 918 aminoácidos con un peso molecular estimado de 110 KDa (Abdulmageed et al., 2002). El dominio de uni3n a la hormona se localiza cerca de la regi3n carboxilo terminal e incluye una regi3n hidrof3bica que constituye el sitio de uni3n a los andr6genos, los dos andr6genos que naturalmente se unen a este sitio son la testosterona y 5 α -dihidrotestosterona, esta uni3n induce cambios conformacionales en la prote3na que son

determinantes para la interacción con factores de transcripción, coactivadores y corepresores que son ensamblados en el complejo de transcripción y determinan qué genes son regulados por andrógenos, actuando como mecanismos de regulación transcripcional. El dominio de unión al DNA se compone de 68 aminoácidos, siendo ésta región la más altamente conservada entre los miembros de la familia de receptores nucleares. La estructura terciaria de ésta región de la proteína resulta de la formación de dos dedos de zinc, formados por cuatro residuos de cisteína asociados de forma coordinada a cada dedo de zinc, que se unen al DNA en el surco mayor. El primer dedo de zinc le confiere especificidad y el segundo dedo de zinc contribuye a incrementar la afinidad durante la unión al DNA. El receptor de andrógeno se une a una secuencia específica del DNA conocida como elemento de respuesta a andrógenos. El dominio de activación de la transcripción localizado en la región amino terminal (TAF-1) interactúa con factores de transcripción y factores accesorios como represores o coactivadores. Un segundo dominio funcional de transactivación (TAF-2), se localiza en la región de unión al ligando. Sobre células blanco, los andrógenos actúan de forma específica con el dominio de unión al ligando del RA. Esto inicia la activación en cascada de cambios conformacionales del RA y su translocación al núcleo celular. Antes de la unión del receptor al DNA blanco, ocurre la homodimerización de dos proteínas de RA de forma independiente del ligando. Esto es mediado por diferentes secuencias situadas en el segundo dedo de zinc del dominio de unión al DNA. El homodímero de RA se une a los elementos de respuesta a andrógenos, que usualmente consisten de dos secuencias palindrómicas cerca del promotor de genes regulados por andrógenos. Por medio de un rearrreglo de la cromatina, es posible la interacción directa con otros factores de transcripción y coactivadores o corepresores; el resultado es la modulación de la transcripción de genes blanco dependientes de ésta hormona. (Hiort et al., 1998; Abdulmageed et al., 2002).

Los receptores de andrógenos se expresan en próstata, testículo, huesos, laringe, células hematopoyéticas, cerebro y células del folículo piloso.

1.5 Andrógenos y su función en el sistema reproductor masculino

La diferenciación sexual se puede subdividir en tres estadios principales que se regulan subsecuentemente: la aparición del sexo genético, el desarrollo del sexo gonadal y finalmente el desarrollo del sexo somático (Hughes, 2001). En el embrión masculino, el brazo corto del cromosoma Y, contiene un gen que se expresa en células gonadales justo antes de la diferenciación

sexual, y que es responsable de la producción del factor de diferenciación testicular (TDF). La presencia del TDF, contribuye a la diferenciación del testículo fetal, evento que inicia con la formación de cordones seminíferos, túbulos seminíferos, la aparición de las células de Sertoli y las células de Leydig. El desarrollo del sexo gonadal finaliza con el descenso de los testículos desde la cavidad abdominal hacia el escroto por medio del canal inguinal. Hay dos secreciones testiculares importantes en el desarrollo del tracto reproductor masculino normal: la hormona anti-Mülleriana (AMH), sintetizada por las células de Sertoli, y la producción de andrógenos (testosterona y androstenediona), sintetizados por las células de Leydig. Por un lado la AMH produce regresión de los conductos Müllerianos (Lane et al., 1998), estructuras internas del tracto reproductor femenino análogas a las existentes en el tracto reproductor del feto masculino. Por otro lado la integración de los conductos de Wolf y su posterior desarrollo a epidídimo, vasos deferentes, vesículas seminales, próstata, pene y escroto son consecuencia de los efectos producidos por los andrógenos, así como del desarrollo de los caracteres secundarios en la pubertad como el alargamiento de la laringe y el oscurecimiento vocal, crecimiento y distribución de vello axilar y púbico y el mantenimiento de libido en el varón adulto. Otros efectos biológicos de los andrógenos en el varón son la regulación del crecimiento óseo, del músculo esquelético, distribución del tejido adiposo, acciones sobre el sistema nervioso central como diferenciación del área preóptica, hipotálamo y corteza cerebral (Hiipakka et al., 1995).

1.6 Mecanismo de acción de los receptores nucleares

El mecanismo de acción de los receptores nucleares establece que en ausencia del ligando, el receptor se encuentra secuestrado en un complejo multiproteico inhibitorio dentro del núcleo de las células blanco (McKenna et al., 1999). La unión del ligando induce un cambio conformacional en el receptor y promueve la homodimerización y la unión altamente afín a secuencias específicas del ADN llamadas elementos de respuesta a hormonas (HRE), los cuales actúan como potenciadores localizados dentro de regiones reguladoras de genes blanco (Robyr et al., 2000). Se ha descrito que las interacciones receptor nuclear - coactivador, estabilizan la formación de un complejo de preiniciación de la transcripción y facilitan la relajación necesaria de la cromatina en los HRE. Dependiendo del contexto celular, el receptor nuclear unido al ADN, ejerce efectos represores o activadores en la expresión de genes involucrados (Julie et al., 2002) (figura 3).

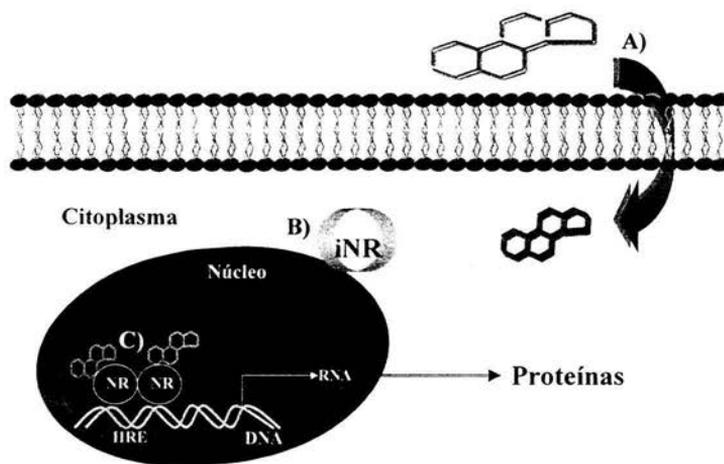


Figura 3. Mecanismo general de acción de los receptores nucleares. A) Ingreso del ligando específico a través de la membrana, B) su asociación con el receptor nuclear y la homodimerización del complejo ligando-receptor; cambio conformacional, y C) unión a los elementos de respuesta a hormonas, que permitirán la regulación en la transcripción de genes blanco.

1.7 Definición de Polimorfismo genético

Un polimorfismo genético se define como la presencia de variaciones alélicas provocadas por cambios en la secuencia de nucleótidos en el DNA, inserciones o deleciones o cambios en el número de repetidos dispuestos en tandem a lo largo de una secuencia específica. Un alelo se define como polimórfico si está presente en la población con una frecuencia igual o mayor al 1%.

El estudio de los polimorfismos permite conocer o hallar genes que contribuyen al desarrollo de enfermedades mediante varios mecanismos. Algunos polimorfismos genéticos pueden producir diferencias en la función o en la regulación de proteínas y contribuir al proceso patológico alterando sitios donadores de splicing, dando lugar a una proteína anormal, o alterando la secuencia promotora de algún gen y como consecuencia afectando la expresión y regulación de la proteína, entre muchos otros mecanismos.

De éste modo los cambios en la secuencia de ADN tienen inferencia directa sobre las características individuales, la variación fenotípica, predisposición a enfermedades y la respuesta al medio ambiente. Esta diversidad no se encuentra limitada al nivel de los polimorfismos de manera individual, sino a combinaciones de éstos, lo que en conjunto es responsable de la variabilidad entre las diferentes poblaciones y sus rasgos fenotípicos (The International SNP Map Working Group, 2001).

1.8 Polimorfismos en el Receptor de Estrógenos- α

Se han descrito polimorfismos en diferentes regiones del gen del RE- α . En el intrón 1 se han encontrado polimorfismos que se asocian con osteoporosis (Han et al., 1997) e hipertensión arterial en población asiática (Lehrer et al., 1993; Zuppan et al., 1992); en el exón 1 del RE- α se han descrito sitios polimórficos en los codones 10 y 87, en el codón 243 del exón 3 y codón 325 del exón 4 reportados por Iwase y col. (1996) asociados con cáncer de mama.

Suzuki y col. (2002) describieron el polimorfismo C325G en el exón 4 del RE- α relacionado con azoospermia en pacientes infértiles asiáticos. Kukuvtis y col. (2002) analizaron los polimorfismos XbaI y PvuII en el intrón 1 del RE- α en población griega, encontrando relación con infertilidad masculina, en pacientes oligozoospermicos y azoospermicos.

1.9 Polimorfismos en el Receptor de Andrógenos

Dentro del exón 1, que forma parte del dominio de activación de la transcripción en la región amino terminal, se encuentran secuencias polimórficas de trinucleótidos repetidos (CAG) $_n$ y (GGC) $_n$, que producen residuos de ácido glutámico y glicina, respectivamente. La longitud de los repetidos CAG es diferente en cada grupo étnico (Casella et. al., 2001), y la expansión y contracción de éstos repetidos polimórficos se han asociado con diferentes enfermedades. Estudios recientes han permitido establecer un rango de repetidos normal que varía de 9 a 37 tripletes, aunque se han encontrado diferencias significativas entre grupos étnicos. En población africana se

encontró que el rango de tripletes en hombres sanos es de entre 18 a 20, en hombres caucásicos de 21-23 y en asiáticos de entre 22-24. (Edwards et al., 1992; Hsing et al., 2000; Platz et al., 2000; Kuhlenbäumer et al., 2001). El mecanismo propuesto para el desarrollo de una condición patológica causada por el aumento en el número de repetidos CAG, indica que los residuos de poliglutamina inhiben la actividad de ciertos factores de transcripción, mediante su asociación inespecífica, disminuyendo la actividad transcripcional de genes blanco. En pacientes con enfermedad de Kennedy, enfermedad neuromuscular asociada con baja virilización, oligozoospermia o azoospermia y fertilidad reducida, se han encontrado mas de 30 unidades de repetidos CAG en el RA (Lund et al., 2003). Por otro lado, un bajo número de repetidos facilitan la activación de genes blanco, lo que acelera la proliferación de células prostáticas e incrementa el riesgo del desarrollo de condiciones patológicas como el cáncer. Como en otras enfermedades causadas por repetición de tripletes de nucleótidos, la longitud de estos tripletes tiende a expandirse en las siguientes generaciones, provocando un incremento en la gravedad del fenotipo y la anticipación de la enfermedad (Choong et al., 1998).

Se han reportado variaciones en sitios polimórficos del RA, sobre todo asociadas con insensibilidad a andrógenos. Cuatro variaciones en la región de unión a la hormona, en el primer exón han sido descritas, en uno de éstos polimorfismos se encontró la sustitución Pro390Ser asociada con azoospermia, mientras que en otro caso, la variación Ala645Asp se asoció con hipospadias distales (Tsukada et al., 1994). Así mismo se ha reportado una delección en el exón 4, en una persona con azoospermia. De todas las mutaciones reportadas, la infertilidad como resultado del desarrollo anormal de la espermatogénesis se presentó en nueve sitios diferentes, entre los que destacan expansiones de glicinas en el exón 1, Asn233Lys, delección completa del exón 4, Asn727Lys y Gln798Glu en el exón 2 (Hiort et al., 2003.).

1.10 Expansión de trinucleótidos repetidos

En 1991 se descubrió un nuevo tipo de mutación genética, conocida como mutación dinámica o expansión. Esta alteración consiste en el incremento desregulado del número de trinucleótidos o tripletes repetidos. Durante la década pasada se identificaron cerca de 20 enfermedades causadas por expansiones de trinucleótidos repetidos. En general, la expansión de estos tripletes continúa en la descendencia del individuo afectado, resultando en el incremento en la

severidad de la enfermedad y/o en la aparición a edad más temprana de ésta, fenómeno clínicamente conocido como “anticipación” (Mitas et al., 1997; Ashley et al., 1995).

Con base en las características específicas de las mutaciones, estas enfermedades fueron divididas en dos subgrupos, denominados tipo I y tipo II (Paulson et.al., 1996; Reddy et.al., 1997). El grupo que corresponde al tipo I incluye enfermedades asociadas con pérdida de neuronas del tallo cerebral y médula espinal. Las enfermedades de este grupo son: la corea de Huntington (HD), la atrofia muscular espinal y bulbar (SBMA), la enfermedad espinocerebelar Machado-Joseph ataxia tipo 3 (MJD SCA 3) y las ataxias espinocerebelares tipos 1, 2 y 6. Todas estas enfermedades contienen expansiones de tripletes repetidos CAG en las regiones codificantes de los genes respectivos, lo que da como resultado la síntesis de regiones de poliglutaminas en las proteínas mutantes. A pesar de que estas enfermedades están relacionadas con el daño a diferentes regiones del cerebro, contienen características que sugieren la presencia de un mecanismo común; 1) existe una relación entre la gravedad del fenotipo y el número de repetidos y 2) con excepción de la SBMA, todas son enfermedades autosómicas dominantes.

El tipo II incluye el síndrome del X frágil (Fra X), la ataxia de Friedreich (FRDA) y la distrofia miotónica (DM). Estas enfermedades se caracterizan por una complejidad de síntomas que involucran diferentes tejidos. Las secuencias de los tripletes repetidos presentes en estas enfermedades son diferentes en cada caso, pueden presentarse tripletes CCG, CTG o GAA. Estas enfermedades presentan localizaciones específicas de los repetidos, de modo que pueden encontrarse en el extremo 5' no traducido, en el extremo 3' no traducido o en regiones intrónicas.

Una característica importante entre los dos tipos de enfermedades causadas por la expansión de tripletes es la longitud de los mismos; para el grupo I, los individuos afectados presentan generalmente entre 40 y 70 repetidos, en tanto que para el tipo II el tamaño de los repetidos va desde 50 hasta varios miles (Timchenko, 1999).

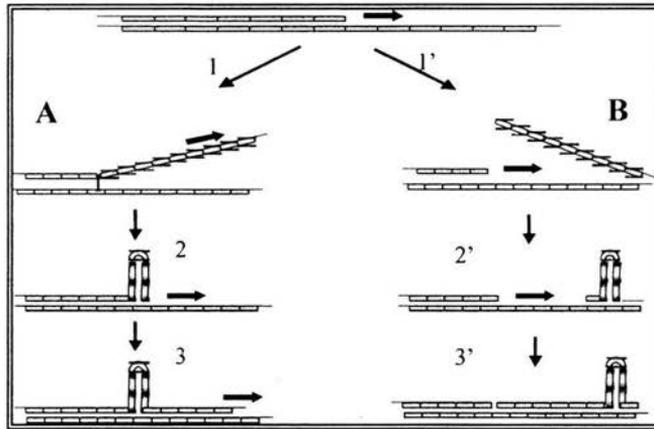


Figura 4. Mecanismo de formación de los trinucleótidos repetidos. A) Durante la replicación de un segmento de trinucleótidos (en rectángulos), el cebador y la cadena molde se disocian (1). La reasociación ocurre con la formación de un "loop" en la cadena inicial (2), la síntesis continúa con el "loop" sin reparar (3) lo que resulta en la adición de nucleótidos. B) Desplazamiento de un fragmento de Okazaki. Se desplaza el extremo 5' del fragmento de Okazaki vecino (1'), las cadenas desplazadas forman horquillas (2') que al continuar la síntesis y la ligación resultan en la expansión de nucleótidos (3') (Moore et al., 1999).

Un modelo que explica la expansión de repetidos se basa en el posible "resbalamiento" de la DNA polimerasa durante la replicación (Balakumaran et al., 2000). En éste modelo la disociación del DNA que contiene secuencias repetitivas durante la replicación, está seguida por reasociación inadecuada o mal alineada de las dos cadenas (figura 4), generando un "loop" no apareado. Si éste "loop" no es reparado, el resultado es la adición de nucleótidos (si el loop es generado en la cadena sentido) o deleción de nucleótidos (si el "loop" es generado en la cadena molde). En un segundo modelo se establece que las expansiones ocurren durante el desplazamiento en la síntesis de un fragmento de Okazaki (Richards et al., 1994; Gordenin et al., 1997; Wells et al., 1998). Estructuras secundarias formadas por los loops desalineados o por las cadenas sencillas desplazadas podrían aumentar la inestabilidad de los repetidos y predisponer a expansión o contracción, dependiendo de su orientación con respecto al origen de replicación de DNA (Cleary et al., 2002).

II JUSTIFICACIÓN

Existen múltiples causas de infertilidad masculina que incluyen diferentes etiologías. Sin embargo un porcentaje considerable de casos se atribuyen a factores genéticos; de ahí el interés por establecer si algunos polimorfismos en receptores de estrógenos y andrógenos constituyen un factor de riesgo para el desarrollo de esta patología en una muestra de población mexicana mestiza.

Por otra parte el incremento en el uso de técnicas de reproducción asistida hace necesario el estudio de posibles determinantes genéticos en el desarrollo de infertilidad, ya que existe el riesgo de transmitir los defectos genéticos hacia la descendencia por medio de éstas alternativas de reproducción asistida.

III OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Analizar los polimorfismos XbaI y Pvu II del intrón 1 del gen del receptor de estrógenos- α y el número de trinucleótidos (CAG) repetidos en el exón 1 del gen del receptor de andrógenos, para determinar su relación con infertilidad masculina en una población mexicana mestiza.

3.2 Objetivos particulares

- ❖ Establecer las condiciones óptimas para los ensayos de GeneScan y RFLP's para el análisis del número de trinucleótidos CAG en el gen del receptor de andrógenos y los polimorfismos Pvu II y Xba I en el gen del receptor de estrógenos- α , respectivamente.
- ❖ Determinar la frecuencia del polimorfismo PvuII y XbaI en el receptor de estrógenos- α en una muestra de población mestiza mexicana y en hombres azoospermicos y oligozoospermicos.
- ❖ Determinar el número de tripletes repetidos (CAG) en el gen del receptor de andrógenos en hombres fértiles mexicanos, así como en hombres azoospermicos y oligozoospermicos.
- ❖ Determinar si la presencia de los polimorfismos estudiados representa un factor de riesgo para el desarrollo de infertilidad masculina.

IV METODOLOGÍA

4.1 Grupos de estudio

Se analizó con previo consentimiento informado el DNA de una muestra de población abierta de 115 mestizos mexicanos sanos, 60 hombres y 55 mujeres de entre 25-45 años de edad, recolectadas en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, con el objeto de determinar la frecuencia genotípica de cada uno de los polimorfismos a estudiar. Por otro lado, se analizó un grupo de 56 pacientes clínicamente diagnosticados con azoospermia y oligozoospermia idiopática, provenientes de la unidad de Andrología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, para establecer la posible correlación de los polimorfismos obtenidos en éste grupo, frente a los obtenidos en un grupo de 52 hombre fértiles seleccionados de la muestra de población abierta.

Se excluyeron del estudio a los pacientes con hipogonadismo hipogonadotrófico, síndromes obstructivos del tracto urogenital, microdeleciones en el brazo largo del cromosoma Y, y anomalías cromosómicas. El grupo control de hombres fértiles se conformó por hombres con por lo menos un hijo concebido de manera natural, sin técnicas de reproducción asistida.

4.2 Obtención de DNA genómico

El DNA genómico se obtuvo de linfocitos de sangre periférica anticoagulada con EDTA, mediante el método de altas sales. Aproximadamente 5-7 ml de sangre se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 minutos y se separaron los glóbulos blancos de la interfase con una pipeta Pasteur. Los glóbulos rojos remanentes se eliminaron mediante lavados con solución de lisis RCBL (Tris-HCl 10 mM pH = 7.6, MgCl₂ 5mM y Na Cl 10 mM). La pastilla de glóbulos blancos se resuspendió con 180 µl de NaCl 5mM y se agregaron 100 µl de SDS al 10%, se agitó e incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 600 µl de NaCl saturado, se agitó e incubó a temperatura ambiente y se centrifugó durante 15 minutos a 1500 rpm. El sobrenadante se transfirió a un tubo de 1.5 ml estéril y el DNA se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto. El DNA se separó mediante centrifugación de la solución alcohólica y se lavó con etanol al 70%. Posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente. Por último el DNA se resuspendió con 50 µl de agua desionizada estéril y se almacenó a 4°C hasta su análisis.

A todas las muestras obtenidas se les realizó un análisis espectrofotométrico mediante lecturas a 260 y 280 nm. La concentración de DNA se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$[\text{DNA}(\text{ng}/\mu\text{l})] = (A_{260})(\text{dilución}^{-1})(50\text{ng}/\mu\text{l})$$

Considerando que 1 densidad óptica a 260 nm equivalen a 50 ng/μl de DNA. La relación 260/280 indica la pureza del DNA obtenido. Se considera que las relaciones comprendidas entre 1.8 y 2.0 unidades de D.O₂₆₀ son las óptimas.

Para determinar la calidad de las muestras de DNA se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio [0.5μg/μl].

4.3 Análisis de polimorfismos en el receptor de Estrógenos-α

4.3.1 PCR

Se mezclaron 100 ng de DNA, 10 pmol de cada oligonucleótido (Kukuvitis et. al., 2002), tabla 2 (Invitrogen) , 2 U de enzima taq polimerasa (Invitrogen), dNTP's 0.2 mM , MgCl₂ 3 mM, KCl 50 mM , Tris-HCl 20 mM pH =8.4 y agua destilada estéril en un volumen final de 25 μl.

Para la amplificación del intrón 1 del receptor de estrógenos-α , las condiciones de reacción fueron: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 minutos, seguidos por 30 ciclos consistentes en desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, un paso de alineamiento a 61°C por 30 segundos, una etapa de extensión a 72°C por 2 minutos y un paso final de extensión durante 5 minutos.

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en los ensayos de PCR.

Localización	Secuencia dirección 5' 3'	Nombre
Intrón 1 RE-α	S: CTGCCACCCTATCTGTATCTTTTCCTATTCTCC	ESTRO.F
	A: TCTTTCTCTGCCACCCTGGCGTCGATTATCTGA	ESTRO.R
Exón 1 RA	S: GCCTGTTGAACTCTTCTGAGC	ANDRO1.F
	A: GCTGTGAAGGTTGCTGTTCCCTC	ANDRO1.R
Exón 1 RA	S: GCCTGTTGAACTCTTCTGAGC*	REAF.F
	A: GCTGTGAAGGTTGCTGTTCCCT*	REAF.R

S: secuencia sentido; A: secuencia antisentido

*Oligonucleótidos marcados con el fluorocromo FAM en el extremo 3'

4.3.2 RFLP

El ensayo de restricción consistió en la digestión con las enzimas XbaI y PvuII (Yaich et al., 1992; Ki Ok et al., 1997) de cada producto de PCR, correspondiente al intrón 1 del RE- α (figura 5).

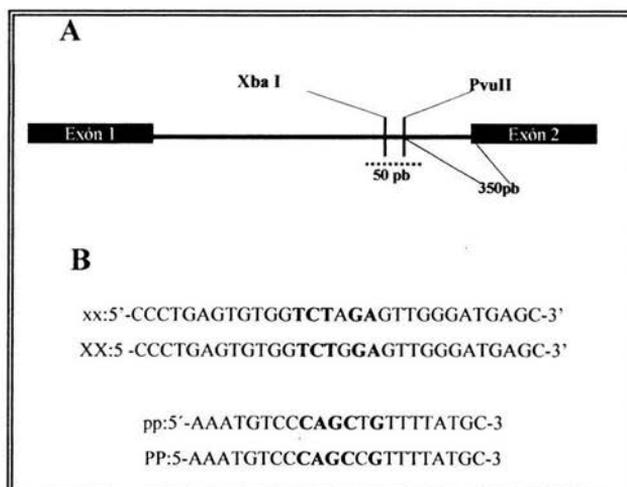


Figura 5. Localización y secuencia de los sitios de restricción de las enzimas XbaI y PvuII. A) El sitio de restricción de XbaI se localiza aproximadamente a 50 pb de distancia del sitio de restricción de la enzima PvuII y a aproximadamente 350 pb antes del exón 2. B) XX indica la ausencia de corte enzimático debido al cambio en una base (A>G) en la secuencia de reconocimiento de XbaI. PP indica la ausencia de corte enzimático debido al cambio (T>C) en la secuencia de reconocimiento de PvuII.

Cada producto de PCR (1347 pb), se dividió en partes iguales; por un lado, se preparó una reacción de 25 μ l en la que se agregaron 10 μ l de DNA, 4 U de enzima PvuII (New England BioLabs), 2.5 μ l de buffer de dilución (NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1mM) y agua destilada estéril, en cuya digestión se obtuvieron productos de 436 y 936 pb. Por otra parte se agregaron 10 μ l de DNA, 2 U de enzima Xba I (New England BioLabs), 2.5 μ l de buffer de dilución (NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1mM), BSA y agua destilada estéril en un volumen final de 25 μ l, en cuya digestión se obtuvieron productos de 391 y 981 pb.

Las reacciones de restricción se incubaron a 37 °C durante 2 horas y se analizaron en un gel de agarosa al 1.5%.

4.4 Análisis de trinucleótidos repetidos (CAG)*n* en el receptor de Andrógenos.

4.4.1 PCR

Las condiciones de reacción para la amplificación del exón 1 del RA fueron las siguientes: una etapa inicial de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, seguidos de 32 ciclos consistentes en un paso de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, una etapa de alineamiento a 65°C durante 1 minuto, una extensión por un minuto a 72 °C y un paso final de extensión a 72°C por 5 minutos. Se mezclaron 100 ng de DNA, 10 pmol de cada oligonucleótido (Tabla 2) (La Spada et al., 1991) (Invitrogen), 10 pmol de cada oligonucleótido marcado con el fluorocromo FAM en el extremo 3' (Invitrogen), en una relación 3:1; 1 U de enzima taq polimerasa (Invitrogene), dNTP's 0.2 mM, MgCl₂ 3 mM, KCl 50 mM , tris-HCl 20 mM pH =8.4 y agua destilada estéril en un volumen final de 25 µl.

4.4.2 GeneScan

GeneScan (PE Applied Biosystems) es un software útil para la determinación del tamaño de fragmentos de DNA separados electroforéticamente en un secuenciador automático de DNA.

El análisis mediante GeneScan consistió en agregar 12 µl de formamida desionizada y 0.5 µl del estándar interno TAMRA 500 (PE Applied Biosystems) por cada 1µl de producto de PCR. La mezcla se desnaturalizó en termoblock a 95°C durante 5 minutos y se inyectó en el equipo de secuenciación automática (PE Applied Biosystems) con un tiempo de corrida de 30 minutos para cada muestra.

El número de trinucleótidos (CAG) repetidos en el producto de PCR se obtuvo mediante la diferencia de tamaño de una muestra con un número conocido de tripletes mediante secuenciación automática, y el tamaño obtenido para cada muestra.

4.4.3 Secuenciación de DNA

Para conocer el número exacto de repetidos CAG en una muestra que sirviera como referencia para obtener el tamaño de los alelos en los grupos de estudio, se secuenció el producto de PCR correspondiente a la región de repetidos (CAG) en el RA de dos muestras diferentes. Para ello se siguió la siguiente metodología.

Se purificó la banda correspondiente al producto de PCR con el reactivo GelExtraction kit (Marligen Biosciences). Se mezclaron 40 ng del producto purificado, 4 μ l de dRhodamine Terminator Cycle Sequencing kit (PE Applied Biosystems), 0.32 pmol de oligonucleótido (tabla 2) y agua destilada estéril en un volumen final de 20 μ l. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: desnaturalización inicial de 98 °C durante 5 min. y 25 ciclos consistentes en desnaturalización durante 10 seg. a 98 °C, alineamiento durante 5 seg. a 65 °C y extensión durante 4 min. a 60 °C. El producto de PCR se purificó mediante columna (QiaGen) y se concentró a sequedad. Después se resuspendió en formamida y se cargó en un gel de secuenciación (PE Applied Biosystems). Por último se analizó y contó el número de repetidos en la muestra secuenciada (figura 8).

V RESULTADOS

Análisis de polimorfismos Xba I y PvuII en el receptor de estrógenos- α .

El análisis de polimorfismos en el RE- α se realizó mediante la restricción de los productos de PCR con las enzimas Pvu II y Xba I. Los productos de restricción fueron observados en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio (figura 6).

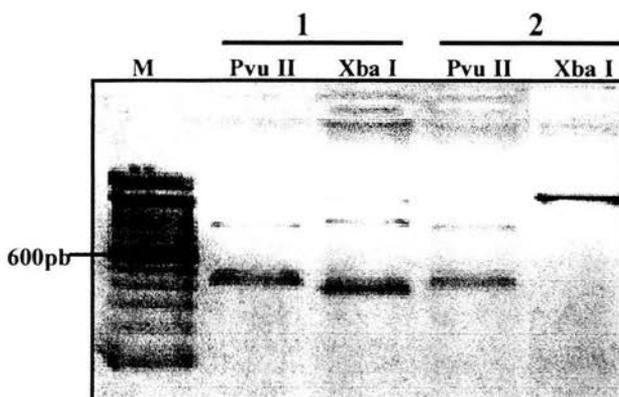


Figura 6. Análisis de genotipos en los polimorfismos Pvu II y Xba I. En el caso 1 se muestra un homocigoto para el alelo silvestre con Pvu II (pp) y heterocigoto cuando se restringe con Xba I (Xx). En el caso 2 se observa un heterocigoto con la enzima Pvu II (Pp) y un homocigoto para el alelo mutante con Xba I (XX). M : marcador de 100 pb.

Del análisis de restricción de ADN, se obtuvieron las frecuencias genotípicas y alélicas de cada polimorfismo en una muestra de población abierta de 115 mestizos mexicanos (tablas 3 y 4). Las frecuencias genotípicas del polimorfismo Xba I en la muestra de mestizos mexicanos fueron las siguientes: (XX) 27%, (Xx) 71%, (xx) 10%, mientras que las frecuencias alélicas fueron: (X) 0.62 y (x) 0.37. Las frecuencias genotípicas del polimorfismo Pvu II fueron: (PP) 10.4%, (Pp) 38.2% y (pp) 51.3%, las frecuencias alélicas fueron (P) 0.29 y (p) 0.70. Estas frecuencias se compararon con las frecuencias reportadas en poblaciones asiática y griega (Ki Ok et. al., 1997; Kukuvtis et al., 2002).

Tabla 3. Distribución de frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo Xba I en diferentes poblaciones

Población	XX	Xx	xx	total	X	x	total	Referencia
Mestiza mexicana	31 (27%)	82 (71.3%)	2 (1.7%)	115	144 (62%)	86 (37%)	230	<i>Presente estudio</i>
Asiática (Corea)	18 (7.3%)	72 (29%)	158 (63.7%)	248	108 (21%)	388 (78%)	496	<i>Ki Ok et al., 1997</i>
Griega	10 (15.6%)	28 (43.7%)	26 (40.6%)	64	48 (37%)	80 (63%)	128	<i>Kukuvtitis et. al., 2003</i>

Comparación de frecuencias genotípicas entre población Mexicana mestiza y Coreana, $\chi^2_{\alpha 0.05} = 115; P < 0.001$.

Comparación de frecuencias genotípicas entre población Mexicana mestiza y Griega, $\chi^2_{\alpha 0.05} = 20.8; P < 0.001$.

Tabla 4. Distribución de frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo Pvu II en diferentes poblaciones

Población	PP	Pp	pp	total	P	p	total	Referencia
Mestiza mexicana	12 (10.4%)	44 (38.2%)	59 (51.3%)	115	68 (29%)	162 (70%)	230	<i>Presente estudio</i>
Asiática (Corea)	35 (14.1%)	136 (54.8%)	77 (31.1%)	248	206 (41%)	290 (58%)	496	<i>Ki Ok et. al., 1997</i>
Griega	18 (28.2%)	25 (39%)	21 (32.8%)	64	61 (48%)	67 (52%)	128	<i>Kukuvtitis et. al., 2003</i>

Comparación de frecuencias genotípicas entre población Mexicana mestiza y Coreana, $\chi^2_{\alpha 0.05} = 115; P < 0.001$.

Comparación de frecuencias genotípicas entre población Mexicana mestiza y Griega, $\chi^2_{\alpha 0.05} = 20.8; P < 0.001$.

El análisis de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos en los grupos de pacientes infértiles y grupo control se realizó mediante la prueba de χ^2 (*software Analys-it, 2003*). Las frecuencias genotípicas del polimorfismo Xba I en el grupo de hombres fértiles (control) fueron las siguientes: (XX) 33.9%, (Xx) 64.1%, (xx) 1.88%; las frecuencias alélicas fueron: (X) 0.66 y (x) 0.33 (tabla 5). Las frecuencias genotípicas en el grupo de hombres azoospermicos fueron: (XX) 41.46%, (Xx) 58.5%, (xx) 0%, y las frecuencias alélicas: (X) 0.70 y (x) 0.30. Las frecuencias obtenidas en el grupo de hombres oligozoospermicos fueron: (XX) 42.85%, (Xx) 57.1%, (xx) 0%, mientras que las frecuencias alélicas: (X) 0.71 y (x) 0.29. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($\chi^2_{\alpha 0.05} = 0.45$; $P = 0.5023$) cuando se compararon el grupo de hombres controles fértiles y el grupo de pacientes azoospermicos y oligozoospermicos en el polimorfismo Xba I (tabla 5).

Para el polimorfismo Pvu II (tabla 6), las frecuencias genotípicas obtenidas en el grupo control fueron las siguientes: (PP) 7.58%, (Pp) 33.9% y (pp) 58.5%, las frecuencias alélicas obtenidas fueron (P) 0.24 y (p) 0.75. Las frecuencias genotípicas obtenidas en el grupo de pacientes azoospermicos fueron: (PP) 12.19%, (Pp) 19.51% y (pp) 68.29%, las frecuencias alélicas fueron (P) 0.22 y (p) 0.78. En el grupo de pacientes oligozoospermicos la frecuencia genotípica fue (PP) 0%, (Pp) 78.57% y (pp) 21.42%, mientras que las frecuencias alélicas fueron (P) 0.39 y (p) 0.60.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($\chi^2_{\alpha 0.05} = 0.25$; $P = 0.6171$) cuando se compararon las frecuencias genotípicas del grupo de hombres fértiles con los pacientes azoospermicos y oligozoospermicos para el polimorfismo Pvu II.

Análisis de trinucleótidos (CAG)*n* en el receptor de Andrógenos.

El análisis de trinucleótidos repetidos en el RA mediante GeneScan indica el tamaño completo de cada producto de PCR (figura 7). Para conocer el número exacto de tripletes fue necesario realizar la secuenciación automática de una muestra (figura 8) que sirvió como referencia cuando se obtuvo el tamaño de los alelos en las muestras de cada uno de los grupos estudiados.

Tabla 5. Distribución de frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo Xba I en el receptor de estrógenos- α .

Grupo	XX	Xx	Xx	total	X	x	total
Control ¹	18 (33.9%)	34 (64.1%)	1 (1.88%)	53	70 (66%)	36 (33%)	106
Azoospermicos ²	17 (41.46%)	24 (58.5%)	0 (0%)	41	58 (70%)	24 (30%)	82
Oligozoospermicos ³	6 (42.85%)	8 (57.1%)	0 (0%)	14	20 (71%)	8 (29%)	28

Comparación de frecuencias alélicas entre el grupo control y azoospermicos,

$$\chi^2_{\alpha 0.05} = 0.45; P = 0.5023$$

Comparación de frecuencias alélicas entre el grupo control y oligozoospermicos,

$$\chi^2_{\alpha 0.05} = 2.04; P = 0.1532$$

Tabla 6. Distribución de frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo Pvu II en el receptor de estrógenos- α .

Grupo	PP	Pp	pp	total	P	p	total
Control ¹	4 (7.58%)	18 (33.9%)	31 (58.5%)	53	26 (24%)	80 (75%)	106
Azoospermicos ²	5 (12.19%)	8 (19.51%)	28 (68.29%)	41	18 (22%)	64 (78%)	82
Oligozoospermicos ³	0 (0%)	11 (78.57%)	3 (21.42%)	14	11 (39%)	17 (60%)	28

Comparación de frecuencias alélicas entre el grupo control y azoospermicos,

$$\chi^2_{\alpha 0.05} = 0.25; P = 0.6171.$$

Comparación de frecuencias alélicas entre el grupo control y oligozoospermicos,

$$\chi^2_{\alpha 0.05} = 0.45; P = 0.5023$$

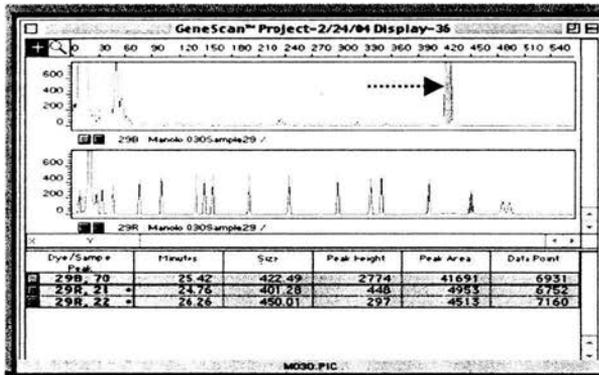


Figura 7. Análisis por Genescan de un alelo con 28 repetidos. En el electroferograma superior se observa un pico correspondiente al producto de PCR con un tamaño de 422 pb (flecha). En el electroferograma inferior se observa la separación del estándar interno (marcador) de 500 pb.

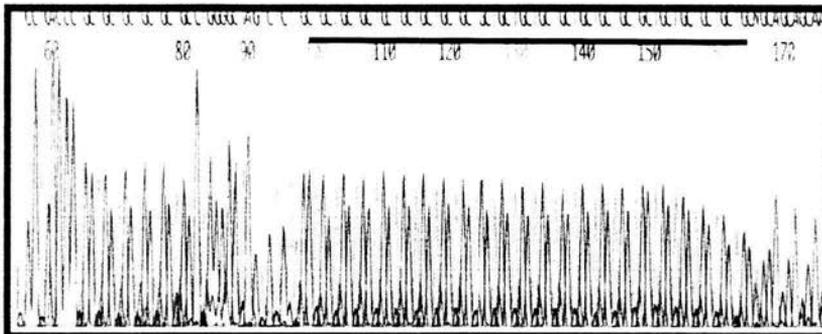


Figura 8. Secuenciación de trinucleótidos repetidos. Se muestra la secuencia del alelo analizado mediante GeneScan en la que se observan 28 repetidos (CAG)

Se analizó la distribución de la longitud de trinucleótidos repetidos CAG en el RA por medio de GeneScan, en las muestras de 52 hombres fértiles y 55 hombres infértiles, de éste último grupo 41 hombres azoospermicos y 14 oligozoospermicos. El análisis estadístico de trinucleótidos repetidos entre los grupos de estudio se realizó mediante la prueba de *t de student* con un nivel de significancia del 95%.

Se determinó que el promedio de repetidos (CAG) en el exón 1 del RA en el grupo control, fue de 27.36 ± 2.09 , con un rango de 23 a 31 repetidos, en el grupo de pacientes oligozoospermicos, el promedio de repetidos fue de 28.37 ± 1.29 , con un rango de 26 a 32, mientras que en el grupo de pacientes azoospermicos, el promedio de repetidos fue de 27.91 ± 2.7 , con un rango de 23 a 34 repetidos (figura 10).

La longitud de los repetidos CAG, fue mayor en el grupo de pacientes oligozoospermicos que en el grupo de hombres fértiles usando la prueba t ($t = 1.7 > 1.67 \alpha = 0.05; P = 0.093$), sin embargo éstas diferencias no fueron altamente significativas. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la longitud de los repetidos en los pacientes azoospermicos comparados con el control de hombres fértiles. En la figura 9, se observa que la mayoría de los sujetos del grupo control fértil tiene una longitud de 29 repetidos (21.15%), mientras que en el grupo de pacientes infértiles, el tamaño mas frecuente fue de 28 repetidos (19.64%). En la figura 10, se observa la distribución de los repetidos en lo pacientes azoospermicos y oligozoospermicos.

En cada grupo de estudio se determinó la concentración sérica de las hormonas FSH, LH y Testosterona (Tabla 8). En ninguno de los grupos de pacientes infértiles se encontraron valores anormales para éstas determinaciones.

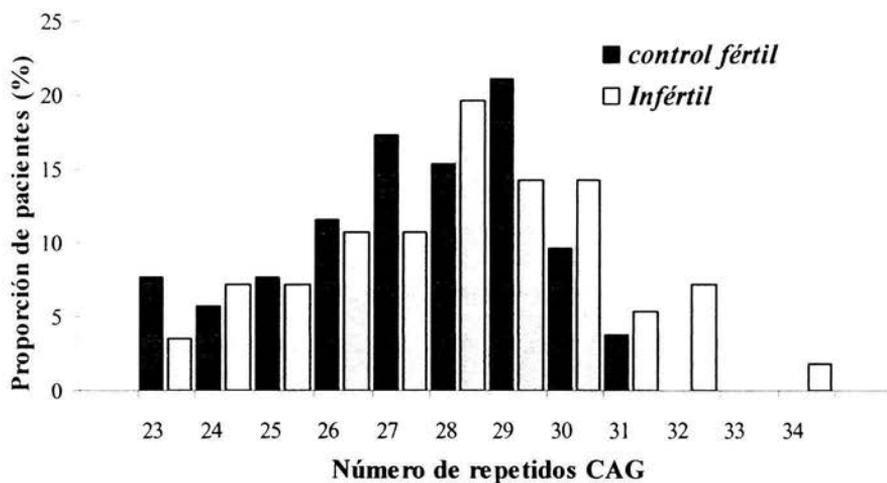


Figura 9. Gráfico de la distribución del número de trinucleótidos repetidos CAG en el receptor de andrógenos, en pacientes infértiles y en un grupo de controles fértiles.

Tabla 7. Datos hormonales de pacientes azoospermicos y oligozoospermicos.

Determinación	Azoospermicos	Oligozoospermicos	Valores normales *
FSH (mUI/ml)	9.6 ± 4.8	5.49 ± 2.3	1.6-17.8
LH (mUI/ml)	13.08 ± 7.3	2.29 ± 1.54	1.4-11.1
Testosterona (ng/dL)	552.4 ± 202.2	320.5 ± 89.7	270-1100

* Kukuvtis et al., 2002.

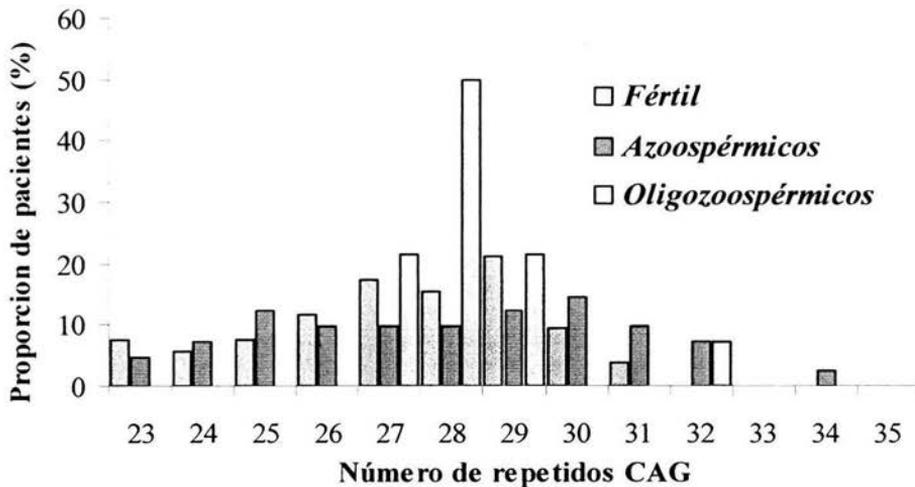


Figura 10. distribución de los trinucleótidos repetidos CAG en el receptor de andrógenos, en un grupo de pacientes azoospermicos, un grupo de pacientes oligozoospermicos, así como en un grupo control de hombres fértiles.

Con el objeto de conocer el número de tripletes (CAG) en el gen del RA a partir del cual podría representar un factor de riesgo para el desarrollo de infertilidad en la muestra analizada, se construyó una curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) (figura 11) (Mengual et al., 2003). Con base en éste análisis se determinó el límite de 28 repetidos debido a que en éste punto se maximiza el valor de sensibilidad (0.58) y especificidad (0.65), con un área bajo la curva de 0.0553 ($P= 0.1043$). Se agruparon los pacientes con < 28 repetidos y los pacientes con ≥ 28 repetidos y se compararon con los controles fértiles con < 28 repetidos y con ≥ 28 repetidos mediante análisis de chi cuadrada ($\chi^2 \alpha = 0.05$).

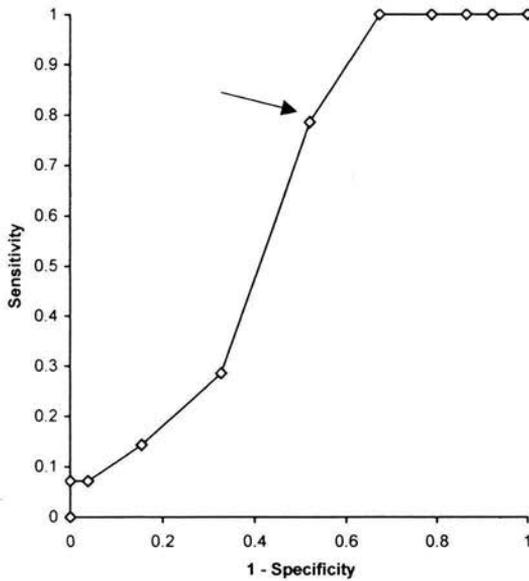


Figura 11 . Curva ROC de los repetidos CAG en el RA. Se indica el punto de corte (28 repetidos) en el que se maximiza el valor de especificidad y sensibilidad (flecha).

El resultado de éste análisis indica que no hay diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($P = 0.5179$), por lo que se determinó que la presencia de éste numero de repetidos en la muestra analizada de pacientes no representa un factor de riesgo para el desarrollo de oligozoospermia.

VI DISCUSION

Desde la caracterización del receptor de estrógenos- α (Ponglikitmongkol et al., 1988), se ha intentado determinar si diferentes polimorfismos a lo largo del gen representan un factor de riesgo o contribuyen al desarrollo de varias patologías como cáncer de próstata, cáncer de mama, osteoporosis y en años recientes, con base en el entendimiento de las bases moleculares de acción de los estrógenos en el funcionamiento de tracto reproductor masculino, con infertilidad.

Eddy y cols., (1996) han reportado que los estrógenos son responsables, por medio de su receptor alfa, de regular varios procesos como la reabsorción de los fluidos luminales a nivel de epidídimo y conductos deferentes, regular la motilidad espermática, el metabolismo oxidativo y la longevidad, y que la reducción en la cantidad de espermatozoides es consecuencia de una alteración en alguno de éstos mecanismos a través de la alteración del receptor, lo que repercute definitivamente en la ausencia de fertilidad en ratones machos “knockout” para ésta proteína. Con base en éstos reportes, analizamos en éste estudio la posible asociación de polimorfismos en el RE- α con infertilidad masculina en pacientes con azoospermia y oligozoospermia idiopática.

Al analizar las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos Pvu II y Xba I en el intrón 1 del gen del RE- α no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los pacientes infértiles (tablas 5 y 6) , aunque es interesante que en el grupo de pacientes oligozoospermicos no se hayan encontrado homocigotos mutantes (PP). En el grupo de pacientes azoospermicos, las frecuencias genotípicas son muy parecidas a las observadas en el grupo control y de manera interesante, el genotipo más frecuente es el homocigoto silvestre (pp). Cuando se comparan las frecuencias alélicas en los tres grupos de estudio, no se encuentran diferencias significativas ya que en todos los grupos estudiados predomina el alelo silvestre (p).

Con respecto al polimorfismo Xba I, no se encontraron individuos con el genotipo homocigoto silvestre (xx) en ninguno de los dos grupos de pacientes infértiles analizados, mientras que el genotipo (Xx) se encontró con mayor frecuencia en los tres grupos estudiados. Las frecuencias alélicas no muestran diferencias significativas entre los tres grupos estudiados, observándose con mayor frecuencia el alelo mutante (X). Kukuvtis y cols., (2002) observaron que en población griega, el genotipo homocigoto silvestre (xx) se encontró con menor frecuencia en

pacientes azoospermicos con respecto al grupo control, del mismo modo el alelo mutante fue significativamente más frecuente que el alelo silvestre, sugiriendo que la disminución del alelo silvestre contribuye al desarrollo de azoospermia en la población analizada. Estos resultados no son consistentes con los que hemos observado en la muestra de nuestra población, y nos sugiere que la correlación entre el polimorfismo XbaI e infertilidad masculina es dependiente del grupo étnico analizado, ya que las frecuencias alélicas en nuestro grupo control, difieren significativamente del grupo control analizado por Kukuivitis.

Aunque el objetivo de éste estudio es determinar si polimorfismos en el RE- α y el RA constituyen un factor de riesgo para el desarrollo de anomalías de la espermatogénesis en un grupo de pacientes con infertilidad masculina, es interesante determinar las frecuencias genotípicas y alélicas en una muestra de la población mexicana mestiza, ya que éstos datos son útiles en estudios de genotipificación de poblaciones mexicanas y también como referencia para futuros análisis poblacionales.

Las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos Pvu II y Xba I, se muestran en las tablas 3 y 4. Se compararon dichas frecuencias con poblaciones asiática y griega (Kukuivitis et al., 2003; Ki Ok et al., 1997) debido a que no se han reportado éstos datos en ninguna población mexicana. En la población mestiza mexicana, la frecuencia del genotipo heterocigoto (Xx) es mayor que el genotipo homocigoto mutante (XX) y éste mayor que el homocigoto silvestre (xx), por lo que el alelo mutante también se encuentra con mayor frecuencia en ésta muestra. Cuando se comparan las frecuencias alélicas entre las tres poblaciones, encontramos que el alelo mutante, se encuentra con mayor frecuencia en mexicanos mestizos que en las poblaciones asiáticas y griega, aunque no difieren significativamente. Por otra parte, el análisis del polimorfismo Pvu II muestra que en los individuos mestizos mexicanos el genotipo más frecuente es (pp), mientras que en griegos y asiáticos es (Pp), sin embargo, el alelo más frecuente en las tres poblaciones es el silvestre (p). Esto se debe a que las poblaciones asiática y griega tienen un elevado número de individuos heterocigotos que contribuyen al aumento de la frecuencia del alelo silvestre.

Por otra parte con el objeto de determinar si el número de trinucleótidos (CAG) repetidos en el RA es un factor que contribuye al desarrollo de infertilidad, se obtuvo el número de repetidos en pacientes azoospermicos, oligozoospermicos y en un grupo de hombres fértiles. Es interesante que la media de repetidos en nuestro grupo control, sea mayor que el reportado en hombres fértiles en

varios estudios. En población japonesa el rango normal es de 16 a 31 repetidos, con un promedio de 21.4 (Komori et al. 1999), en población australiana de 17 a 25 repetidos, con un promedio de 20.5 (Dowsing et al. 1999), en población estadounidense de 8 a 27 repetidos, con promedio de 20.7 (Mifsud et al. 2002) y en población española de 15 a 34 repetidos con promedio de 22.4 (Mengual et al. 2003), mientras que en nuestro grupo control es de 23 a 31 repetidos con un promedio de 27.36.

El análisis de los trinucleótidos (CAG) repetidos entre los grupos de estudio, no mostró diferencias significativas. Se realizó un análisis estadístico preliminar con la prueba t de student para comparar los promedios del número de repetidos en cada grupo, observándose diferencias entre el grupo control y los pacientes oligozoospermicos ($t = 1.7 > 1.67_{\alpha=0.05}; P = 0.093$). Sin embargo las diferencias encontradas no son altamente significativas, ya que el valor observado es por muy poco superior al valor esperado de t , por lo que se analizó la curva ROC como un método estadístico mas sensible. En ésta prueba se obtuvo el punto de corte de 28 repetidos, que fue útil para analizar si un número mayor de 28 repetidos representa un factor de riesgo para desarrollar infertilidad, el resultado de esta prueba muestra que no existen diferencias significativas entre los hombres infértiles y el grupo control. Esta metodología se utilizó debido a la poca diferencia estadísticamente significativa obtenida mediante la prueba t de student y siguiendo el análisis realizado por Mengual y col., (2003) quienes analizaron los datos reportados en la literatura como un modo de unificación de criterios en éste tipo de análisis.

Mengual y cols., (2003) determinaron un punto de corte de 23 repetidos en población española, encontrando que más de 23 repetidos representan un factor de riesgo para el desarrollo de azoospermia y que 27 repetidos incrementan 4.06 veces el riesgo de desarrollar esta patología. Estos resultados no son consistentes con los obtenidos en este estudio, ya que se determinó un punto de corte de 28 repetidos, y el análisis de χ^2 cuadrada no muestra diferencias significativas ($\chi^2_{\alpha=0.05} = 0.42, P = 0.5179$) entre los pacientes infértiles y el grupo control. El número promedio de repetidos (CAG) en el grupo control fue de 27.36, de manera interesante, este valor es mucho mayor que lo reportado no sólo en hombres azoospermicos, sino también mayor que el numero promedio de repetidos en hombres sanos en los estudios realizados hasta el momento. Esto puede sugerir que el desarrollo de infertilidad como causa de un número elevado de tripletes es dependiente del grupo étnico y no independiente como sugiere Mifsud (2001), quien estudió el número de repetidos en poblaciones de Estados Unidos y Singapur, encontrando que las diferencias

en la longitud de los repetidos está significativamente asociada con infertilidad masculina de manera independiente del origen étnico (Mifsud et al., 2001).

Es importante señalar que las muestras con el número más grande y más pequeño de repetidos fueron secuenciadas para validar el método de análisis utilizado.

En resumen, nuestros resultados nos indican que la presencia de los polimorfismos Xba I y Pvu II en el RE- α y el número de trinucleótidos repetidos CAG en el gen del RA no constituyen un factor de riesgo para el desarrollo de infertilidad masculina en la muestra analizada. Sin embargo es posible que la influencia de factores ambientales o polimorfismos en otros genes involucrados en el desarrollo y regulación del sistema reproductor masculino, contribuyan al desarrollo de ésta patología, como lo han sugerido Ferlin y col. (2004), quienes analizaron el efecto combinado del número de trinucleótidos repetidos CAG y GGC en el gen del RA, encontrando diferencias estadísticamente significativas en la distribución de éste haplotipo entre los pacientes infértiles y el grupo control.

VII CONCLUSIONES

1. La presencia de los polimorfismos Pvu II y Xba I en el RE- α y el número elevado de trinucleótidos (CAG) repetidos en el RA no representa un factor de riesgo para el desarrollo de infertilidad masculina, en la muestra analizada.
2. El número promedio de repetidos CAG en el RA en una muestra de hombres mestizos mexicanos sanos, es de 27.36, mayor al reportado en todos los estudios realizados hasta ahora.
3. El número de repetidos CAG del gen del RA no está asociado con infertilidad masculina en una muestra de pacientes mestizos mexicanos con azoospermia y oligozoospermia idiopática.

VIII REFERENCIAS

Abdulmaged M.T., Noel Kim, Kweonsil Min, Munarriz Ricardo, Golstein Irwin. (2002) *Role of androgens in female genital sexual arousal: receptor expression, structure and function*. Fertility and Sterility. 77(4):11-15.

Ashley JCT, Warren ST. (1995) *Trinucleotide repeat expansion and human disease*. Ann. Rev. Genet.,. 29:703-728.

Balakumaran, B. S., C. H. Freudenreich, and V. A. Zakian. (2000) *CGG/CCG repeats exhibit orientation-dependent instability and orientation-independent fragility in Saccharomyces cerevisiae*. Hum. Mol. Genet. 9:93–100.

Ferlin A, Bartoloni L., Rizzo G, Roverato A, Garolla A, Foresta C. (2004) *androgen receptor gene CAG and GGC repeats lengths in idiopathic male infertility*. Mol Hum Reprod. 25:1440-1456.

Casella R., Maduro R.M., Lipshultz L., Lamb DJ. (2001) *Significance of the polyglutamine tract polymorphism in the androgen receptor*. Urology , 58: 651–656.

Cavalli-Sforza, L. (1997) *Genes, peoples and languages*. PNAS. 94:7719-7724.

Cleary, J. D., K. Nichol, Y. H. Wang, and C. E. Pearson. (2002) *Evidence of cis-acting factors in replication-mediated trinucleotide repeat instability in primate cells*. Nat. Genet. 31:37–46.

Comhaire, F. (1987) *Towards more objectivity in diagnosis and management of male infertility*. International Journal of Andrology, Suppl 7:1-53.

Couse JF, L.J., Grandien K, Gustafsson JA, Korach KS. (1997) *Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- α (ER α) and estrogen receptor- β (ER- β) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER α -knockout mouse*. Endocrinology, 138: 4613–4621.

Choong CS, and Wilson EM. (1998) *Trinucleotide repeats in the human androgen receptor: a molecular basis for the disease*. J Mol Endocrinol. 21: 235–257.

Dowsing AT., Young EL., Clark M., McLachlan RI. (1999) *Linkage between male infertility and trinucleotide repeat expansion in the androgen receptor gene*. Lancet. 354: 640-643.

Eddy EM, Todd FW, Bunch O. (1996) *Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility*. Endocrinology 137 (11): 4796-4804.

Forti, G., Krausz C. (1998) *Clinical review: Evaluation and treatment of the infertile couple*. J Clin Endocrinol Metab, 83:4177-88

Gordenin DA, Kunkel TA, Resnick MA. (1997) *Repeat expansion- all in a flop?*. Nat. Gen 16:116-118.

Greco TL, Duello TM and Gorski J. (1993) *Estrogen receptors, estradiol, and diethylstilbestrol in early development: the mouse as a model for the study of estrogen receptors and estrogen sensitivity in embryonic development of male and female reproductive tracts*. Endocr Rev 14:59-71.

Han KO., Moon IG., Kang YS., Chung HY. (1997) *Nonassociation of estrogen receptor genotypes with bone density and estrogen responsiveness to hormone replacement therapy in Korean postmenopausal women.* Journal of clinical endocrinology and metabolism. **82**(4):991-995.

Hess RA, Bunick D, Lee KH, Bahr J, Taylor JA, Korach KS and Lubahn DB. (1997) *A role for oestrogens in the male reproductive system.* Nature **390**:509-512.

Hess RA. (2003) *Oestrogen in the adult male reproductive tract: A review.* Reproductive biology and endocrinology. **1** (52) : 1-14.

Hess RA. (2000) *Oestrogen in fluid transport in efferent ducts of the male reproductive tract.* Rev. Reprod. **5**: 84-92.

Hiort O., Holterhus PM.(2003) *Androgen insensitivity and male infertility.* International Journal of Andrology. **26**:16-20.

Hiort O., Holterhus PM., Nietsche EM. (1998) *Physiology and pathophysiology of androgen action.* Baillière's clinical endocrinology and metabolism. **12** (1):115-132.

Hsing AW., Gao YT., Wu G., Wang. (2000) *Polymorphic CAG repeats lengths in the androgen receptor gene and prostate cancer risk: a population based case-control study in China.* Cancer research. **60**: 5111-5116.

Hughes leuan A. (2001) *Minireview: Sex differentiation.* Endocrinology . **142** (8):3281-3287.

J.F. Couse, K.S. (1999) Korach, *Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us?* Endocrine Rev. **20**: 358-417.

Iwase H., Greenman JM., Barnes DM., Hodgson S. (1996) *Sequence variants of the estrogen receptor gene found in breast cancer patients with ER negative and progesterone receptor positive tumors.* Cancer Lett. **108**: 179-184

Jenster G, van der Korb HA, van Vroonhoven C. (1991) *Domains of the human androgen receptor involved in steroid binding, transcriptional activation, and subcellular localization.* Mol Endocrinol **5**: 1396-1404.

Julie M.H., Donald P. McDonnell, Kenneth S. Korach. (2002) *Allosteric regulation of Estrogen receptor Structure, Function, and Coactivator recruitment by different estrogen response elements.* Molecular Endocrinology, **16**(3), 469-489.

Ki Ok Han, , Moon In, Kang YS, Chung HY, Min HK, Han IK. (1997) *Nonassociation of estrogen receptor genotypes with bone mineral density and estrogen responsiveness to hormone replacement therapy in Korean postmenopausal women.* J. Clin. Endocrinol. Metab., **82**: 991-995.

Komori S., Kasumi H., Kanazawa P., Sakata K., Nakata Y., Kato H., Koyama K. (1999) *CAG repeat length in the androgen receptor gene of infertile Japanese males with oligozoospermia.* Mol. Hum. Reprod. **5**:14-16.

Kuhlenbäumer G., Kress W., Ringelstein EB., Stögbauer. (2001) *Thirty seven CAG repeats in the androgen receptor gene in two healthy individuals.* Journal of Neurology. **248**:23-26

Kuiper GG, E.E., Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson. (1996) *Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary*. Proc Natl Acad Sci USA, **93**: 5925–5930.

Kukuvitis A., Georgiou I., Bouba I., Tsirka A., Giannouli CH. (2003) *Association of estrogen receptor alpha polymorphisms and androgen receptor CAG trinucleotide repeats with male infertility: a study in 109 Greek infertile men*. International journal of andrology. **25**: 149-153.

La Spada AR, Wilson EM., Lubahn DH., Hardin AE. (1991) *Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy*. Nature. **352**: 77-79.

Lane AH., Donahue PK. (1998) *New insights into Müllerian inhibiting substance and its mechanism of action*. J Endocrinol. **158**:1-6.

Lee KH, Hess RA, Bahr JM, Lubahn DB, Taylor J and Bunick D. (2000) *Oestrogen receptor alpha has a functional role in the mouse rete testis and efferent ductules* Biol Reprod. **63**:1873-1880.

Lehrer S., Rabin J., Stone J. Berkowitz GS. (1994) *Association of an estrogen receptor variant and hypertension in women*. Hypertension. **21**:439-4441.

Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS and Smithies. (1993) *Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene*. Proc Natl Acad Sci USA **90**:11162-11170.

Lund Annastiina, Juha S.T., Jaana L., Marja-Liisa, Kristina Aitoma. (2003) *Long CAG repeats in the AR gene are not associated with infertility in Finish males*. Acta Obstet Gynecol Scand.. **82**:162-166.

Lyons-Darden T., Topal M.D. (1999) *A basic sites induce triplet-repeat expansion during DNA replication in vivo*. J. Biol. Chem. **274** (37):25975-8

MacCalman CD, Blashuk OW. (1994) *Gonadal steroids regulated N-cadherin mRNA levels in the mouse testis*. Endocrinol Journal. **2** :157-163.

Mangelsdorf DJ, T.C., Beato M, Herrlich P, Schutz G, and B.B. Umesono K, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans. (1995) *The nuclear receptor superfamily: the second decade*. Cell. **83**: 835–839.

Mak V, Jarvi K. (1996) *The genetics of male infertility*. J. Urol. **156**: 1245-1257.

McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. (1999) *Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology*. Endocr. Rev. **20**: 321-344.

Mengual Lourdes, Oriola Joseph, Ascaso C, Balleca JL, Oliva R. (2003) *An increased CAG repeat length in the androgen receptor gene in azoospermic ICSI candidates*. J Androl. **24**: 279-284.

Michaela Luconi, G.F., Elisabetta Baldi. (2000) *Genomic and nongenomic effects of estrogens: molecular mechanisms of action and clinical implications for male reproduction*. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, **80**: 369–381.

-
-
- Mifsud A., Sim CK., Boettget-Tong H. (2001) *Trinucleotide (CAG) repeat polymorphisms in the androgen receptor gene: molecular markers of risks for male infertility*. *Fertil Steril*. **75**: 275-281.
- Mitas Michael. (1997) *Trinucleotide repeats associated with human diseases*. *Nucleic Acids Research*. **12**:2245-2253.
- Moore H., Greenwell PW. (1999) *Triplet repeats form secondary structures that escape DNA repair in yeast*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**:1504-15.9.
- O'Donnel L., K.M., Jones M., Simpson E. (2001) *Estrogen and Spermatogenesis*. *Endocrine Reviews*, **22**(3): 289–318.
- Paulson H.L., Fischbeck K.M. (1996) *Trinucleotide repeats in neurogenetic disorders*. *Ann Rev. Neurosci*. **19**: 79-107
- Pérez Peña Efraín. (2002) *Atención integral de la Infertilidad*. McGraw-Hill. Mexico D.F..2-18.
- Platz, EA., Rimm EB., Willett WC., Kantoff PW. (2000) *Racial variation in prostate cancer incidence and in hormonal system markers among male health professionals*. *Journal of the National Cancer institute*. **92**:2009-2017.
- Ponglikitmongkol M, Green S., Chambon P. (1988) *Genomic organization of the human oestrogen receptor gene*. *EMBO J*. **7** :3385-3388.
- Pryor JL, Kent-First M, Muallem A, Van Bergen AH, Nolten WE, Meisner L. and Roberts KP. (1997) *Microdeletions in the Y chromosome of infertile men*. *N. Engl. J. Med*. **336**: 534-539.
- Reddy P.S., Housman D.E. (1997) *The complex pathology of trinucleotide repeats*. *Curr. Opin. Cell. Biol*. **9**:364-372
- Richards, R.I. and Sutherland G.R. (1994) *Simple repeat DNA is not replicated simply* *Nat. Genet*. **6**: 114-116
- Robyr D, Wolffe AP, Wahli W. (2000) *Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity for shared tasks*. *Mol. Endocrinol* . **14**: 329-347.
- Rowe PJ, Comhaire FH, Hargneave TB, Mellow HJ. (2000) *Manual de la OMS para el estudio estandarizado y el diagnóstico de la pareja infértil*. OMS. 4ª Ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Rowe, P.J., Comhaire, F.H., Hargreave, T.B. & Mellows,H.J. (1993) *WHO Manual for the Standardized Investigation and Diagnosis of the Infertile Couple*. Press, Cambridge. Cambridge University
- Saunders PTK, Williams K, Macpherson S, Urquhart H, Irvine DS, Sharpe RM. (2001) *Differential expression of oestrogen receptor alpha and beta proteins in the testes and male reproductive system of human and non-human primates*. *Mol Hum Reprod* **7**:227–36.
- Seminara, S. B., Oliveira, L. M., Beranova, M., Hayes, F., Crowley. (2000) *Genetics of hypogonadotropic hypogonadism* . *J Endocrinol Invest* . **23**: 560-566.

-
-
- Sharpe RM. (1998) *The roles of oestrogen in the male*. Trends Endocrinol. Metab. **9**: 371-377.
- Sigman, M. and Howards, S. (1999) Male infertility . Campbell's. Urology, 6th ed. P. C. Walsh, A. B. Retik.
- Suzuki, M.D.a.I.S., M.D.a.Keiichi Itoh, M.D.a.Junko Ashida, B.Sc.aKoji Muroya, M.D.bTutomu Ogata. (2002) *Estrogen receptor alpha gene polymorphism is associated with idiopathic azoospermia*. Fertility and Sterility, **78**(6) :1341-1343.
- The International SNP Map Working Group. (2001) *A map of human genome sequencie variation 1.42 million SNPs*. Nature . **409**:928-933.
- Timchenko L.T., Caskey C.T. (1999) *Review: Triplet repeat disorders: discussion of molecular mechanisms* .Cell. Mol. Life Sci . **55**: 1432-1447
- Tremblay GB, T.A., Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins and L.F. NA, Giguere. (1997) *Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor b*. Mol Endocrinol. **11**: 353–365.
- Tsukada T., Inoue M., Tachibana S., Nakai Y., Takebe H. (1994) *An androgen receptor mutation causing androgen resistanse in undervirilized male syndrome*. Journal of Clinical endocrinology and metabolism. **79**:1202-1207.
- V. Pentikainen, K.E., L. Suomalainen, M. Parvinen, L. Dunkel. (2000) *Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis in vitro*. J. Clin. Endocrinol. Metab. **85**: 2057–2067.
- Yaich Lauren, Dupont William, Cavener DR, Parl F. (1992) *Analysis of Pvu II restriction Fragment-length polymorphism and eon structure of the estrogen receptor gene in breast cancer and peipheral blood*. Cancer Research. **52**: 77-83.
- Zuppan P., Hal JM., Lee MK. (1992) *Possible linkage of the estrogen receptor gene to breast cancer in a family with late-onset disease*. Am. J. human Genet. **48**: 1065-1068.