



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y
NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN**

**ALOPECIA ANDROGENÉTICA: ESTUDIO FAMILIAR DE
CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL
RECEPTOR DE ANDRÓGENOS**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

J A Z M Í N A R T E A G A V Á Z Q U E Z

TUTOR DE TESIS:

DR. OSVALDO M. MUTCHINICK B., INCMNSZ

COTUTOR:

Q.F.B. MARÍA A. LÓPEZ HERNÁNDEZ, INCMNSZ

COMITÉ TUTORAL:

**DR. LORENA S. OROZCO OROZCO, INMEGEN
DR. FERNANDO LARREA GALLO, INCMNSZ**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. Diciembre 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Autorización

Alumno:

M. C. Jazmín Arteaga Vázquez

Tutor:

Dr. Osvaldo M. Mutchinick Baringoltz.

Cotutor:

Q.F.B. María A. López Hernández

Responsable de la Sede:

Dr. Carlos Aguilar Salinas

Agradecimientos

Gracias mi pequeña Sara por demostrarme, aun a tu corta edad, que nada es imposible . . .

A mi esposo por todo su amor, sus enseñanzas, su tolerancia, su confianza, por impulsarme y por ser el cómplice perfecto para sortear la vida.

A mi familia por ser la inspiración mayor en esta aventura de la Genética. Gracias por su apoyo incondicional, por apoyar mi carrera desde siempre y enseñarme:
“seguro que hay sol. . .”

A mi tutor, el Dr. Osvaldo Mutchinick, por compartirme su amplia experiencia en la materia a lo largo de diecisiete años, por cobijarme con sus conocimientos invaluable sobre epidemiología e investigación médica. Pero sobretodo, gracias por enseñarme a amar la Genética.

A la Q. F. B. María López por adiestrarme en las técnicas de biología molecular que hicieron posible esta tesis, por su tolerancia y por dejarme aprender de mis errores.

A la Dra. Florencia Vargas no solo por enseñarme las bases de la metodología y estadística sino por ser ejemplo de dedicación, de un espíritu inquebrantable y por inculcarme que todo es perfectible. q.e.p.d.

Al Dr. Sergio Ponce de León por las arduas horas que empeñó en hacernos entender la estadística, por trasladar las enseñanzas del Dr. A. R. Feinstein a nuestra capacidad de entender y por mostrarme la trascendencia de la ética médica en nuestro actuar como investigadores.

Resumen ejecutivo

La alopecia androgenética (AGA) o calvicie común constituye la causa más frecuente de pérdida de cabello en el varón, es una entidad que afecta aproximadamente al 40% de la población masculina adulta. Es frecuente observar más de un individuo afectado en la misma familia del caso con AGA, sugiriendo una predisposición familiar. La heredabilidad para AGA obtenida a partir de estudios en gemelos, muestra que es cercana al 80%; sin embargo, no ha sido posible establecer un modo de herencia para este rasgo. Dentro de la etiología propuesta para AGA, el metabolismo alterado de los andrógenos es una de las principales teorías que tratan de explicar su ocurrencia. Diferentes estudios muestran que el número de repetidos de trinucleótidos CAG y GGC, presentes en el exón 1 del gen del receptor de andrógenos (*AR*), se asocian con una mayor susceptibilidad para AGA. Algunos estudios muestran que el tamaño de los repetidos CAG/GGC se correlaciona con la actividad del receptor de andrógenos. Estos repetidos son secuencias de DNA del tipo microsatélite que son polimórficos en cuanto a su tamaño o expansión. La longitud o tamaño reportado para estos polimorfismos es de 7 a 35 repetidos para el trinucleótido CAG y de 8 a 21 para el repetido GGC. El locus del gen *RA* se encuentra en Xq12, esta oportuna localización permite distinguir en el varón el tamaño de los repetidos CAG y GGC heredados por vía materna, siendo la madre quien aporta el cromosoma X a los varones. La identificación del número de repetidos CAG y GGC dentro del mismo exón del gen *RA* permite establecer la formación de haplotipos CAG/GGC en los individuos analizados, pudiendo establecer riesgo para AGA de acuerdo al tamaño de los mismos.

Con los antecedentes anteriores, el planteamiento del problema es conocer si el tamaño de los repetidos CAG y GGC se relacionan con la presencia de AGA en una muestra de hermanos, es decir, si a mayor o menor número de repetidos o la combinación de ciertos haplotipos confiere un mayor riesgo para AGA. Dado que la madre es quien aporta el cromosoma X donde se encuentra el gen *AR*, es importante saber si existe alguna segregación preferencial de los alelos maternos CAG/GGC en los hermanos con AGA comparado con los hermanos sin AGA. Partiendo de esta idea, nuestra hipótesis de trabajo establece que la concordancia entre el número de repetidos CAG y GGC del *RA* y la presencia de AGA en pares de hermanos será mayor al 70% comparada con la esperada por el azar.

Objetivo General:

Determinar la asociación entre AGA y el número de repetidos CAG/GGC del gen del Receptor de Andrógenos en una muestra de familias con al menos un varón afectado e identificar una posible segregación preferencial de los alelos cortos/cortos de CAG/GGC en sujetos con AGA

ALOPECIA ANDROGENETICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

Objetivos específicos:

1. Identificar los diferentes patrones de AGA en la muestra estudiada.
2. Conocer el número de repetidos CAG y GGC y los diferentes haplotipos posibles CAG/GGC del gen *AR* en una muestra de individuos con AGA.
3. Identificar una posible correlación entre AGA y el tamaño de repetidos CAG/GGC, conociendo los haplotipos de cada individuo.
4. Conocer si existe desequilibrio de transmisión de los repetidos CAG/GGC en varones con AGA comparado con hermanos no alopécicos, para lo cual se identificará el número de repetidos CAG/GGC en la madre de ambos.

Material y métodos: Se incluyeron 32 tríos conformados por un individuo con AGA, un hermano (con o sin AGA) y la madre de ambos. A los participantes se les realizó una encuesta clínico-genética y evaluación del grado de alopecia de acuerdo a la clasificación de Norwood-Hamilton. Se realizó secuenciación Sanger del exón 1 del gen *AR* para conocer el número exacto de repetidos CAG y GGC en cada participante. Se consideró como criterio de inclusión que la madre del trío fuera heterocigota para el haplotipo CAG/GGC, con la finalidad de analizar los patrones de segregación de los haplotipos dentro de la familia. Se empleó el coeficiente *kappa* para evaluar la concordancia entre los hermanos para el número de repetidos CAG/GGC y el fenotipo de AGA. Para el análisis de probabilidad de asociación, en presencia de desequilibrio de transmisión entre el número de repetidos y AGA se utilizó la prueba de asociación basada en familias, FBAT (Family-Based Association test).

Resultados: La muestra final incluyó 32 pares de hermanos con AGA y la madre de ambos (Tríos). La AGA es un rasgo sencillo de fenotipificar, el tipo de AGA más frecuentemente observado en los participantes de este estudio fueron los tipos II (37.5%) y I (18.8%). La mediana de edad para los 32 casos índice fue de 26 (18-59) años, de 28 (19-57) años para los hermanos concordantes para AGA y de 26.5 (18-55) años para los hermanos discordantes para AGA. La heterocigosidad para el alelo más polimórfico, CAG, fue del 82.9%. La mediana para los repetidos CAG y GGC del gen *AR* es similar a la reportada en otras poblaciones, 21.5 (15-27) para CAG y 17 (15-18) para GGC. Sin embargo, los haplotipos CAG y GGC fueron menos polimórficos a lo descrito en otros estudios. Lo anterior se atribuye principalmente al número de repetidos GGC observado en nuestros tríos. El coeficiente *kappa* para AGA y el tamaño idéntico de repetidos CAG/GGC entre hermanos resultó en una concordancia de 37.3% (IC 95% 5.0-69.0%) libre de azar, sin mostrar diferencias estadísticamente significativas. La prueba de desequilibrio de transmisión no mostró una segregación preferencial de los haplotipos CAG/GGC en los individuos con AGA, ni al considerarse la mediana de repetidos de forma dicotómica, ni al tomar en cuenta el número exacto de repetidos.

ALOPECIA ANDROGENETICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

Conclusiones: La mediana de repetidos CAG y GGC en la muestra estudiada es similar a la reportada previamente en poblaciones africana, asiática y caucásica. El número de repetidos CAG/GGC fue menos polimórfico comparado con otras poblaciones analizadas, para el repetido CAG observamos 12 alelos diferentes y para el repetido GGC sólo observamos 4 alelos. La concordancia libre de azar para el número de repetidos CAG/GGC y AGA en los pares de hermanos fue menor a la esperada por el azar ($\kappa=0.373$). El repetido CAG resultó ser un buen marcador genético para el estudio de la segregación del cromosoma X materno en AGA, con un porcentaje de heterocigosidad superior al 80%. Nuestros hallazgos sugieren que la AGA no es resultado de variaciones en un solo gen (AR), que el tamaño de repetidos CAG/GGC no se relaciona con un mayor riesgo de AGA en pares de hermanos. El presente estudio es uno de los pocos en la literatura que relaciona los haplotipos CAG/GGC en el exón 1 del gen AR en relación a la presencia de AGA, mostrando que para nuestra muestra de tríos analizados no existe dicha asociación. Probablemente la AGA sea resultado del efecto epistático en genes ligados al cromosoma X o en interacción con otros genes autosómicos (Herencia poligénica), hipótesis que aún no ha sido estudiada.

Índice

ANTECEDENTES	8
JUSTIFICACIÓN	38
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	38
HIPÓTESIS.....	39
OBJETIVO GENERAL.....	40
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
DISEÑO DEL ESTUDIO	41
MATERIAL Y MÉTODOS	42
RESULTADOS	51
DISCUSIÓN.....	59
CONCLUSIONES	69
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
ÍNDICE DE FIGURAS	79
ÍNDICE DE TABLAS	81
Apéndice 1.....	83
Apéndice 2.....	85

Antecedentes

El cabello en los mamíferos y, particularmente en la especie humana, desempeña una función biológica importante que, en conjunto con otras características somáticas como la pigmentación de la piel, contribuye a la variación fenotípica y étnica dentro de las diferentes especies. Los mamíferos comparten la presencia de folículo piloso, considerado un mini-órgano, cuyas funciones de protección térmica, camuflaje, dispersión de olores, protección contra traumas ambientales, estímulo visual, percepción sensorial, comunicación social y estética han sido y son de gran interés de estudio por diversas disciplinas. En particular en la especie humana, la pérdida del folículo piloso, especialmente en el cuero cabelludo, representa para la mayoría de los individuos de ambos sexos una desventaja estética que puede afectar psicológicamente a una proporción considerable de personas (Tobin DJ, 2010).

La alopecia androgenética (AGA) o calvicie común, calvicie hereditaria, calvicie de patrón masculino, alopecia androgénica, es la causa más común de pérdida de cabello. Fenotípicamente se reconoce por una progresión en la pérdida del pelo que tiene un patrón clásico en el varón (**figura 1**), iniciando con una disminución del mismo en la región temporal, seguida de una pérdida frontal difusa y en algunos casos, calvicie “en parche” en el vértex del cuero cabelludo (Sinclair RD, 2004; Cranwell W y Sinclair R, 2016).



Figura 1. Patrón distintivo de calvicie en la alopecia androgenética, tomado de (Tobin DJ. 2010).

Aristóteles (384-322 A.C.) fue uno de los primeros en observar que la alopecia no se presentaba en individuos eunucos ni antes de la madurez sexual y relacionó el grado de pérdida de cabello con la libido. Durante el siglo XIX algunos dermatólogos propusieron que la AGA era secundaria a dermatitis seborreica, infección por *Pityrosporum ovale* (pitiriasis capitis), “congestión” u oclusión cerebral (Otberg N et al. 2007). De acuerdo con una exhaustiva revisión histórica sobre el estudio de las bases genéticas de la alopecia, desde 1916 se consideró que la AGA era de carácter dominante en el varón y recesivo en la mujer o limitado al sexo. Harris en 1946 propone a la calvicie común como un carácter monogénico autosómico dominante y Smith y Wells en 1964 son los primeros en mencionar que se debe a un mecanismo genético multifactorial con un gen parcialmente dominante (Kuster W y Happle R, 1984).

En 1942, Hamilton estableció el papel esencial de los andrógenos en el desarrollo de la calvicie común y Ludwig (1962) en “*Der heutige Stand des Wissens über die Glatze*” combinó las palabras andrógeno y alopecia para emplear el término alopecia androgenética por primera vez. Ludwig postuló que “los andrógenos no pueden producir alopecia sin la presencia de una predisposición hereditaria y la sola predisposición hereditaria no puede producir alopecia sin la presencia de los andrógenos”.

Edad de presentación

La edad promedio de presentación de la AGA es de 30 años (Stough D et al. 2005). La prevalencia y gravedad de la AGA en el varón se incrementa proporcionalmente con la edad. Debido a que este tipo de calvicie masculina depende en gran parte de los andrógenos circulantes, esta condición no se observa en prepúberes o en individuos castrados antes de la pubertad y en las mujeres es menos frecuente y grave,

presentándose con un patrón de distribución diferente (Birch MP y Messenger AG, 2001; Olsen EA et al. 2005).

Diagnóstico de AGA y manifestaciones clínicas

El diagnóstico se realiza esencialmente a través del examen físico y una historia de pérdida de cabello que sigue el patrón definido por la escala de Norwood-Hamilton (**figura 2**), con o sin historia familiar positiva para calvicie.

La pérdida de cabello o adelgazamiento del mismo es gradual e inicia a nivel de la región temporal (recesión bitemporal), se presenta posteriormente una pérdida difusa del cabello en la región frontal seguida por alopecia en parches a nivel del vértex y por último, puede llegar a existir pérdida de todo el cabello en la región coronal. La magnitud de la alopecia se puede clasificar de acuerdo con la escala de Norwood-Hamilton, la cual establece VII tipos de progresión, tipo I: Mínima recesión de la línea del cabello, tipo II: Pérdida simétrica del cabello en las sienas (recesión bitemporal), tipo III: Pérdida de cabello más evidente en el vértex; tipo IV-V: Pérdida de cabello a nivel bitemporal (gravedad i o ii) y vértex, tipo VI: Alopecia de la región frontal, del vértex y de la coronilla y tipo VII: Escaso cabello en la región occipital y sobre la orejas. La letra “a” se agrega a los tipos III, IV y V cuando existe una recesión avanzada de la línea frontal del cabello y el término “vértex” se aplica a la calvicie con un parche de alopecia en la corona (**figura 2**).

ALOPECIA ANDROGENÉTICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

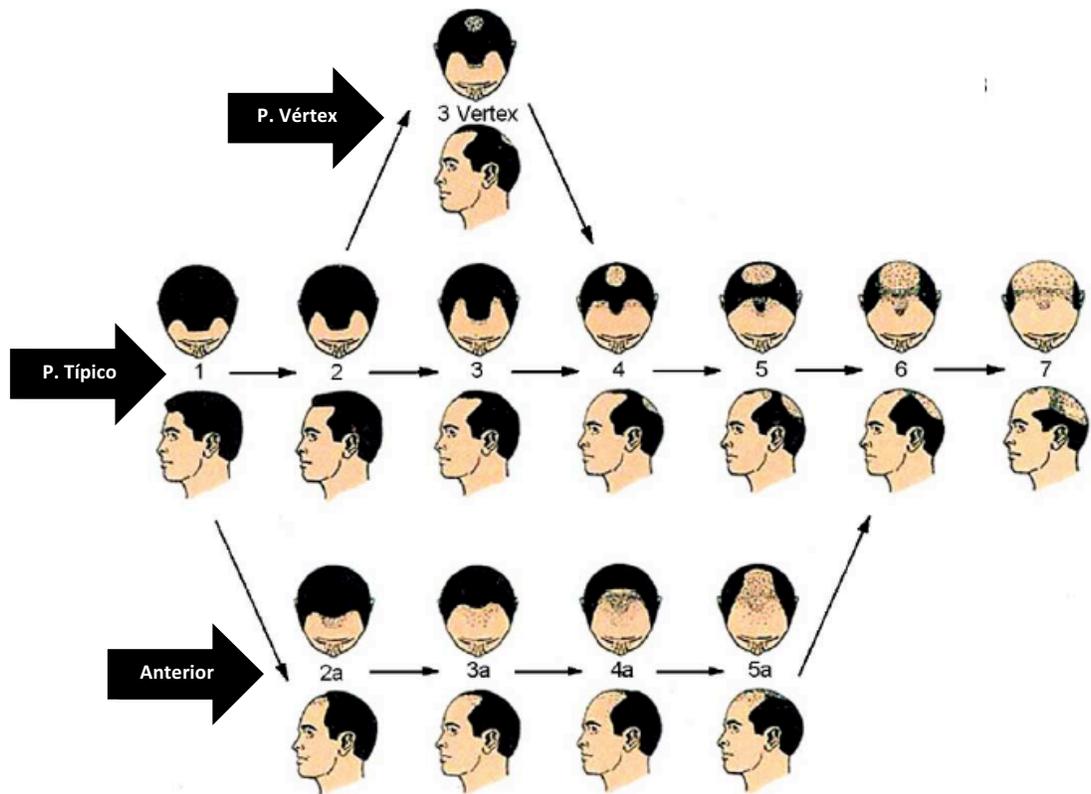


Figura 2. Clasificación de la AGA de acuerdo con la clasificación de Norwood-Hamilton. Los patrones se describen como anterior, vértex y típico.

Prevalencia:

La AGA afecta aproximadamente 30 al 40% de los hombres y mujeres en edad adulta. Algunos estudios señalan que la frecuencia es similar en hombres y mujeres aunque en estas últimas puede pasar desapercibida antes de los 40 años e incrementar alrededor de la menopausia (Cranwell W y Sinclair R, 2016; Donovan J, et al. 2018). Los primeros signos de AGA pueden aparecer ya desde la adolescencia, de un 2 a 16% de los varones de 17 a 29 años de edad presentan evidencia clínica de AGA (Wang TL et al. 2010; Lee WS y Lee HJ, 2012). Reportes en la literatura señalan una prevalencia mucho menor de AGA en mujeres, con frecuencias del 8 al 25% a la edad de 50 años (Price VH,

ALOPECIA ANDROGENETICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

1999; Rhodes T et al. 1988). Poco menos de un 15% de los individuos tiene poca o nula alopecia al llegar a los 70 años (Sinclair RD, 2004).

Aproximadamente un 30% de los individuos de raza blanca inician con calvicie a la edad de 30 años, un 50% presentan AGA a los 50 años y aproximadamente un 80% a la edad de 70 años (Ellis JA et al. 2002; Tobin DJ, 2010). En un estudio realizado en población coreana, la prevalencia total de AGA en varones fue de 14.1%. La prevalencia mostró un aumento con la edad, así en la tercera década de la vida la frecuencia fue de 2.3%, de 4% en la cuarta década, de 10.8% en la quinta, de 24.5% en la sexta y de 54.3% en la séptima (Paik JH et al. 2001).

La incidencia de AGA muestra variación inter-racial, algunos autores han reportado una prevalencia mayor del 96% en hombres caucásicos (Otberg N et al. 2007), teniendo los individuos de raza blanca una probabilidad 4 veces mayor de desarrollar calvicie prematura que los individuos de raza negra (Cranwell W y Sinclair R, 2016; Sinclair J, 2016), desarrollando los japoneses AGA aproximadamente una década más tarde que los caucásicos (Hamilton JB, 1951). La raza negra, los orientales, los nativo-americanos y los afro-americanos tienen una mayor probabilidad de preservar la línea frontal del cabello, tienen una presentación más tardía de la alopecia y la calvicie es menos extensa que en población caucásica norteamericana (Setty LR, 1970; Ishino A et al. 1997; Tang PH et al. 2000). Los afroamericanos presentan una menor prevalencia y extensión de la AGA con disminución de la pérdida del cabello de la región frontoparietal (Paik JH et al. 2001). En la **tabla 1** se muestra la prevalencia de AGA en hombres y mujeres por grupo etario.

ALOPECIA ANDROGENETICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

Tabla 1. Frecuencia de alopecia androgenética en población norteamericana y coreana

GRUPO ETARIO	VARONES		MUJERES	
	EUA	Corea	EUA	Corea
General	40.0%	14.1%	30.0%	5.6%
Primera década de la vida				
Segunda década de la vida	30.0%			
Tercera década de la vida		2.3%		0.2%
Cuarta década de la vida	50.0%	4.0%		2.3%
Quinta década de la vida		10.8%		3.8%
Sexta década de la vida		24.5%	8.0-25-0%	7.4%
Séptima década de la vida		54.3%		11.7%
70 años o más	80%	46.9%		24.7%

Modificado de: Rhodes T et al. 1988; Price VH, 1999; Paik JH et al. 2001; Ellis JA et al. 2002.

El ciclo normal del cabello

El crecimiento del cabello en el ser humano difiere del resto de los mamíferos por un patrón de actividad folicular en mosaico, es incapaz de generar crecimiento folicular de manera sincrónica o en “olas”. Cada folículo piloso es autónomo en cuanto a su crecimiento y pigmentación. El bulbo piloso presenta una de las más altas tasas de proliferación celular, sólo superado por las células hematopoyéticas y del intestino. El cuero cabelludo humano puede producir fibras de cabello funcionales más allá de los 100 años de vida (Tobin DJ, 2010). En el cuero cabelludo normal, un 80 a 90% se encuentra en fase de crecimiento, alrededor del 5% se encuentra en reposo y un 1 a 3 sufre involución (Donovan J, et al. 2018).

ALOPECIA ANDROGENETICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

Como la mayoría de los procesos biológicos el crecimiento del cabello es cíclico, constituido por tres fases: 1. *Fase anágena* o de crecimiento activo, con una duración de 2 a 7 años en la que el cabello se produce continuamente mediante la división y crecimiento de células epidérmicas productoras de queratina que rodean la papila dérmica a nivel de la base del folículo piloso (FP); 2. *Fase catágena* de involución o transición, dura en promedio 2 semanas. El FP se contrae como resultado de la apoptosis y el bulbo piloso asciende hacia la superficie de la piel perdiendo la raíz el anclaje que le permite permanecer fija al cuero cabelludo, formándose un ensanchamiento y permaneciendo el cabello en un estado de descanso y 3. *Fase telógena*, considerada una fase de receso con una duración aproximada de 5 a 12 semanas, en la cual el folículo ensanchado se desprende y al final de ésta, las células germinales comienzan a formar un nuevo bulbo piloso, el cual llegará a ser la fuente de una nueva fibra de cabello. La caída de cabello ocurre dentro de la fase telógena y el periodo inmediato se denomina fase latente (**figura 3**). En el cuero cabelludo normal aproximadamente el 90% del cabello se encuentra en fase anágena, un 1% en fase catágena y el 9% en fase telógena (Stough D et al. 2005).

En la AGA, la duración de la fase anágena disminuye en cada ciclo, mientras que la duración de la fase telógena permanece constante o se prolonga (**figura 4**), dando como resultado una disminución en la razón anágena/telógena (Ellis JA et al. 2002).

ALOPECIA ANDROGENÉTICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

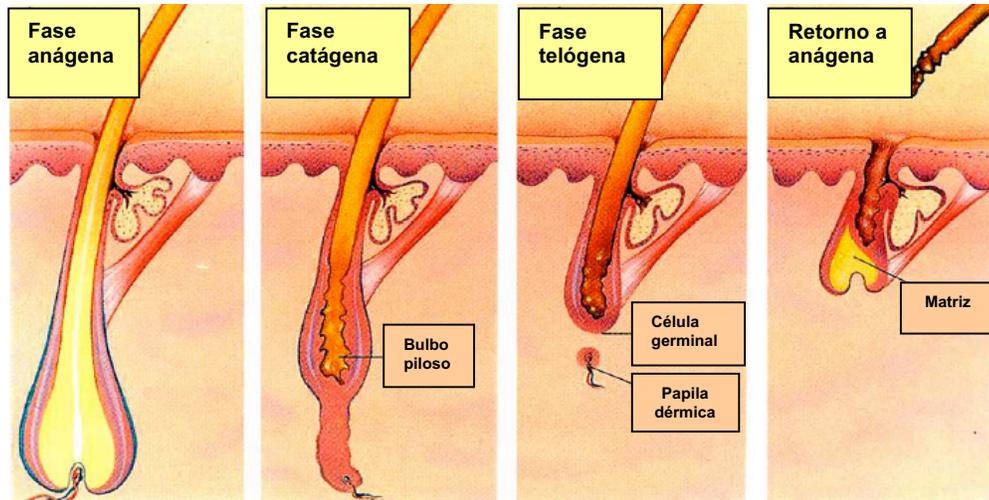


Figura 3. Elementos estructurales del cabello y ciclo normal.

Modificado de Sinclair RD, 2004.

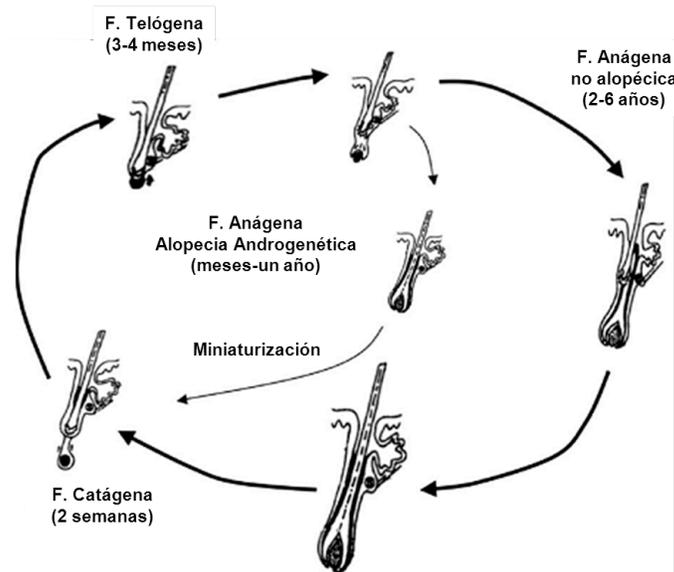


Figura 4. Acortamiento de la fase anágena en el ciclo celular del FP.

Fisiopatología

Se considera que en la etiología de la AGA en el varón se presenta una disminución progresiva en la densidad de los cabellos terminales (gruesos y pigmentados) y, consecuentemente, un incremento en la cantidad de cabello de tipo velloso (corto, fino y no pigmentado) (Whiting DA, 1998). El fenotipo de la AGA se atribuye a un proceso denominado miniaturización (MNA) del FP (Cranwell W y Sinclair R, 2016), el cual se asocia con una reducción substancial en el diámetro del cabello. La MNA puede ocurrir de manera abrupta en 1 a 3 ciclos del cabello (Whiting DA, 2001). Siendo la papila dérmica un elemento central en el mantenimiento y control del crecimiento del cabello, es muy probable que ésta sea el blanco de los eventos mediados vía androgénica, dando lugar a la MNA y a cambios en el ciclo del cabello (Randall VA, 1996; Sinclair RD, 2004). La relación constante entre el tamaño de la dermis papilar y el tamaño de la matriz del cabello sugiere que el tamaño de la papila dérmica determina el tamaño del bulbo piloso.

También se ha observado en la MNA una disminución diez veces mayor de la cantidad de células en el FP, contribuyendo a una disminución del tamaño folicular. Los mecanismos por los cuales ocurre esta disminución no se han podido dilucidar y podrían ser resultado de un incremento en la apoptosis, de una disminución en la proliferación de queratinocitos o de un desplazamiento de células con pérdida de la adhesión celular resultando en una disminución de fibroblastos en la papila dérmica (Prieto VG et al. 2002).

Los modelos tradicionales de AGA muestran la MNA folicular como un proceso secuencial que da como resultado remanente dérmico de folículos de diversos tamaños (Whiting D, 2003). Eventualmente, el cabello no alcanzará más la superficie de la piel y debido a que el tiempo que transcurre entre las fases telógena y anágena se alarga, el número de cabellos disminuye (Stough D et al. 2005).

ALOPECIA ANDROGENETICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

Se ha constatado la presencia de un infiltrado linfocítico perifolicular con depósito de colágena hasta en un 40% de los casos de AGA, mucho mayor al 10% observado en controles. De manera ocasional pueden observarse eosinófilos y mastocitos, desconociéndose aún si el grado de inflamación tiene un significado pronóstico en los individuos con AGA (Sinclair RD, 2004). Varios investigadores han descrito cierto grado de inflamación alrededor del FP (Torkamani N et al. 2014, Cranwell W y Sinclair R, 2016). Aunque la presencia de este infiltrado inflamatorio es controversial, Torkamani y cols. (2014) observaron en 5/8 especímenes de cuero cabelludo con AGA que el músculo erector degenera, comparado con 0/5 especímenes control. Al parecer es reemplazado por tejido adiposo, siendo una característica específica de AGA y no así del efluvio telógeno.

La acción de los andrógenos sobre el folículo piloso

Los andrógenos son mediadores del crecimiento de cabello terminal en todo el cuerpo. Sin la actividad de los andrógenos en el cuero cabelludo el cabello crece constitutivamente mientras que el crecimiento del vello corporal se inhibe, tal como ocurre en individuos con insensibilidad a la acción de los andrógenos. Con la actividad androgénica, individuos genéticamente predispuestos desarrollan alopecia con un patrón definido. En contraste, durante la pubertad los andrógenos causan alargamiento de cabello tipo velloso para formar folículos terminales en axilas y pubis en ambos sexos; y en la cara, pecho y extremidades en el varón. El exceso de actividad androgénica puede causar crecimiento de pelo no deseado (hirsutismo) en las mujeres, sin que se conozca el porqué de estos eventos paradójicos (Inui S e Itami S, 2011; Cranwell W y Sinclair R, 2016).

El efecto de los andrógenos sobre el crecimiento de pelo en áreas particulares del cuerpo podría en parte deberse a factores como la cantidad de receptores de

ALOPECIA ANDROGENETICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

andrógenos (RA), al incremento en la producción local de andrógenos de alta potencia y/o a una disminución en la degradación de los mismos (Kaufman KD, 2002) (figura 5).

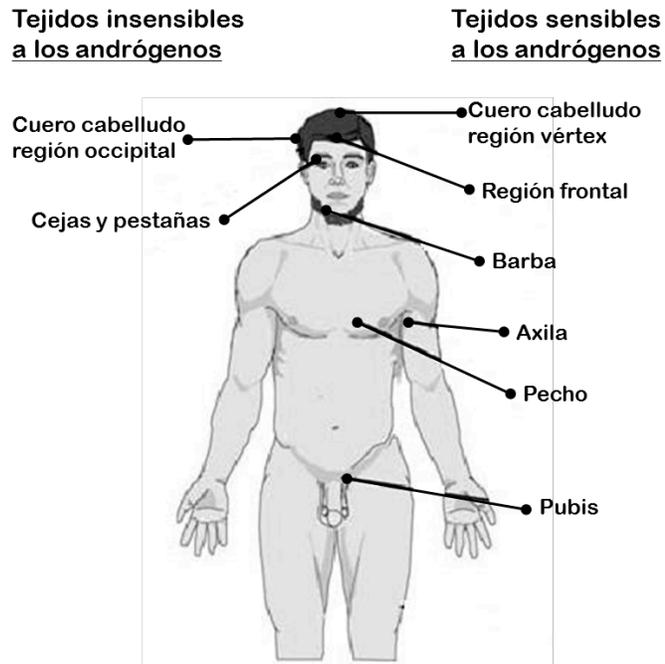


Figura 5. Efectos de los andrógenos sobre el crecimiento del cabello. Los efectos de los andrógenos son diferentes dependiendo de la localización corporal: los folículos de la barba, pecho, axilas, región púbica y de las extremidades son estimulados al final de la pubertad para formar folículos terminales; en el cuero cabelludo del varón con predisposición genética a la calvicie, los folículos pilosos se inhiben con un “patrón de distribución” característico. (Modificado de Kaufman KD, 2002).

ALOPECIA ANDROGENETICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

A pesar de que los mecanismos que participan en la MNA no se han establecido de manera definitiva, se conoce, desde los estudios realizados por Hamilton (1946), que la calvicie con patrón masculino es dependiente de los andrógenos, particularmente de la dihidrotestosterona (DHT). La DHT se sintetiza a partir de la testosterona mediante la acción de las enzimas 5- α -reductasa (5 α R) tipos 1 y 2, ambas son enzimas lipofílicas localizadas a nivel intracelular. La 5 α R tipo 2, que se expresa en el folículo piloso y la glándula prostática, parece tener un mayor efecto en la AGA que la 5 α R tipo 1 (Stough D et al. 2005). Ambas isoenzimas se expresan en el hígado, contribuyendo a los niveles circulantes de DHT. En la actualidad se desconoce el efecto de la 5 α R tipo 1 sobre el crecimiento del cabello y, a diferencia del tipo 2, no se ha caracterizado algún síndrome de deficiencia genética de esta isoenzima y su fisiología en el ser humano.

Las evidencias que apoyan el importante papel de los andrógenos en la AGA son:

- 1) La AGA no se observa en eunucos, quienes tienen cantidades menores de andrógenos, ni en varones con desórdenes de la diferenciación sexual con cariotipo 46,XY, quienes tienen una producción anormal de DHT (Griffin JE y Wilson JD, 1989). La ausencia de alopecia en individuos portadores de mutaciones con pérdida de función en el gen de la 5 α R tipo 2 sugiere un papel determinante de la DHT en la fisiopatología de la AGA.
- 2) Varones castrados entre los 20 y 43 años no muestran una progresión en la pérdida del cabello (Inui S e Itami S, 2011).
- 3) La AGA puede ser inducida con la administración de testosterona en varones castrados con predisposición genética para AGA. La suspensión de la administración de testosterona previene la progresión de la alopecia (Tosti A y Piraccini BM, 1999)
- 4) Se han reportado mujeres con pérdida de cabello y virilización secundarios a tumores secretores de andrógenos (Kaufman KD, 2002).
- 5) El cuero cabelludo contiene concentraciones excesivas de 5 α R, DHT y del receptor de andrógenos (RA) (Sawaya ME y Price VH, 1997).

6) La pérdida de cabello disminuye y en algunos casos se inhibe después de la administración de finasteride, un fármaco que impide la biotransformación de testosterona a DHT por inhibición selectiva de la actividad de la 5 α R tipo 2 (Kaufman KD et al. 1998; Tosti A y Piraccini BM, 1999; Finasteride Male Pattern Hair Loss Group, 2002; Price VH et al. 2002; Tosti A et al. 2004).

7) Estudios experimentales hechos en el macaco con cola de muñón, considerado un modelo de estudio de AGA, han mostrado resultados interesantes. El empleo de un anti-andrógeno tópico (RU58841) sobre el cuero cabelludo del macaco, bloquea la transactivación del RA e induce un mayor tiempo de fase anágena y crecimiento del cabello (Inui S e Itami S, 2011).

Metabolismo de los andrógenos

La vía metabólica de los andrógenos se inicia cuando el colesterol es biotransformado a pregnenolona, seguido de una alfa hidroxilación en el C17 por medio de la actividad de la enzima C17-20 liasa que escinde los grupos carbonos distales dejando un esteroide de 17 carbonos con una cetona C17 en el anillo distal. Estos “17-cetoesteroides” constituyen un grupo de andrógenos relativamente débiles tales como la dehidroepiandrosterona (DHEA) definida por su relativa baja afinidad al RA. Aproximadamente el 75% de la DHEA y DHEA-Sulfato provienen de la glándula suprarrenal. Estos andrógenos débiles pueden convertirse mediante reacciones enzimáticas en andrógenos más potentes como la testosterona, que es el principal andrógeno circulante. En el FP las principales vías involucradas en la conversión de andrógenos débiles a potentes se llevan a cabo a través de las enzimas 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa / DELTA^{5 \rightarrow 4}-isomerasa (3 β -HSD) y 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa. En la mayoría de los órganos blanco la testosterona puede metabolizarse a DHT a través de la acción de la 5 α R-2. La afinidad de la DHT por el RA es aproximadamente 5 veces mayor que la de la testosterona. Los andrógenos potentes como la T y DHT pueden ser removidos por conversión a andrógenos débiles, o pueden

ALOPECIA ANDROGENETICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

ser metabolizados a estrógenos a través de la vía de la aromatasa o pueden sufrir glucuronidación para formar conjugados de andrógenos que son eliminados más rápidamente de la circulación. Algunos tejidos muestran un metabolismo de los andrógenos incrementado, así como una mayor sensibilidad a la acción de éstos. En glándulas sebáceas del cuero cabelludo alopecico se ha demostrado una actividad incrementada de 3β -HSD en comparación con zonas no alopecicas (Hoffmann R y Happle R, 2000).

Hombres y mujeres jóvenes con AGA presentan concentraciones elevadas de 5α R-2 y una mayor cantidad de receptores de andrógenos (Sinclair RD, 2004) (**tabla 2**), pero concentraciones disminuidas de la enzima citocromo P450 aromatasa. La tasa de producción de DHT en varones con AGA también es mayor comparada con controles (Sawaya ME y Price VH, 1997).

Tabla 2. Concentraciones del receptor de andrógenos en cuero cabelludo.

	Receptor nuclear (fmol por mg de DNA)	Receptor citosólico (fmol por mg de proteína)
Mujeres		
<i>FP región frontal</i>	177±24	48±11
<i>FP región occipital</i>	132±20	29±10
Hombres		
<i>FP región frontal</i>	302±24	67±12
<i>FP región occipital</i>	226±20	38±12

La medición se realizó por triplicado, se muestran el promedio \pm DE (desvío estándar) para la capacidad de unión máxima expresada en fmol por mg de DNA y fmol por mg de proteína, respectivamente, en las fracciones subcelulares nuclear y citosólica para FP aislados de cuero cabelludo frontal y occipital. *Tomado de Sawaya ME y Price VH, 1997.*

El receptor de andrógenos

El RA es un típico receptor esteroideo responsable de determinar la sensibilidad de las células a la acción de los andrógenos. El RA es miembro de un grupo de receptores hormonales esteroideos tipo I, un subgrupo de la superfamilia de receptores nucleares de factores de transcripción inducidos por ligando. El RA es capaz de interactuar con motivos de DNA denominados elementos de respuesta a hormonas (Verrijdt G et al. 2003). La función de activación principal (AF-1) ha sido localizada en el dominio N-terminal (NTD). Un segundo dominio de activación se ha localizado en la parte central de la proteína, región de unión al DNA (DNA binding domain o DBD). El extremo carboxi-terminal es el dominio de unión a ligando (LBD) y contiene la función de activación secundaria (AF-2) (Inui S e Itami S, 2011; Gelmann GP, 2002; Ding D et al. 2004). Las variaciones en la actividad de AF-1 y AF-2 para producir una máxima respuesta transcripcional dependen de la presencia de polimorfismos en el promotor del gen RA, del tipo celular y de que ambas regiones puedan interactuar sinérgicamente (Kallio PJ et al. 1996). El dominio NTD contiene la región de activación transcripcional AF-1 (aa 51-211), la cual es esencial para la actividad de transactivación. La región AF-5 (aa370-394) muestra una fuerte actividad constitutiva en el LBD. El dominio DBD (tipo dedo de zinc) media la interacción con elementos de respuesta a DNA. El LBD contiene la región de activación transcripcional dependiente de ligando, el AF-2, e interactúa funcionalmente con los factores intermediarios y cofactores nucleares. Estudios recientes sugieren que la interacción entre NTD y LBD dan como resultado la formación de nuevas superficies que facilitan la interacción con los cofactores de los receptores nucleares esteroideos (Gobinet J et al. 2002).

El gen del receptor de andrógenos

El gen *AR* (MIM#313700) está conformado por 8 exones y comprende aproximadamente 90 kilobases. Se localiza en el cromosoma Xq11-12. El gen transcribe dos ARNm, de 11 y 7.5 Kb, mediante señales de poliadenilación alterna en la región 3' no traducida (Kallio PJ et al. 1996), **figura 6**. La organización genómica del *RA* se encuentra conservada a través de la evolución de los mamíferos. El exón 1 del gen *RA* codifica para el dominio N-terminal, que es la región de regulación transcripcional de la proteína; los exones 2 y 3 codifican para el dominio central de unión al DNA (DBD) y el dominio C-terminal es codificado por los exones 4 a 8 (Gelmann EP, 2002).

Se han descrito más de 1,000 mutaciones diferentes en el gen *RA* (Eissermann K et al. 2013; <ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/androgenr>), siendo el factor de transcripción más frecuentemente mutado en el humano. Sólo muy pocas mutaciones se han identificado en el extremo N-terminal del receptor (Gottlieb B et al. 2012). Las mutaciones en este gen se han asociado a enfermedades como la insensibilidad a la acción de los andrógenos (Gottlieb B et al. 2012; Mongan NP et al. 2015), la atrofia muscular bulboespinal -Enfermedad de Kennedy- (Querin G et al. 2017; Cortes CJ y La Spada AR, 2018) y al cáncer de próstata (Taplin ME et al. 1995; Kallio PJ et al. 1996; Silva-Neto B et al. 2008). Algunas de las mutaciones identificadas se asocian con cambios funcionales en la expresión del *RA* por lo que se piensa que ciertas variantes de este gen pudieran ser responsables de las alteraciones observadas en la AGA.

Variantes alélicas normales: El exón 1 contiene 2 regiones de DNA de 3 pares de bases repetidas en tándem denominadas microsatélites, éstas se consideran variantes génicas o polimorfismos. Una de estas repeticiones (CAG) resulta en un tracto de poliglutaminas (CAG)_n con una extensión de 7 a 35 repetidos en diferentes poblaciones (Chamberlain NL et al. 1994; Choong CS et al. 1996; Tut TG et al. 1997; Ellis JA y Harrap SB, 2001; Esteban E et al. 2006; Silva-Neto B et al. 2008; Tirabassi G et al. 2016). La otra variante es un

ALOPECIA ANDROGENETICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

trinucleótido (GGC) que se traduce en poliglicinas y se ha observado con una amplitud de 8 a 21 repetidos en diversas poblaciones (Ferlin A et al. 2004; Ding D et al. 2005; Esteban E et al. 2006; Radpour R et al. 2007; Tirabassi G et al. 2016). Las variaciones en el tamaño de los tractos de poliglutaminas y poliglicinas que se encuentran en el dominio de transactivación pueden modular la función del RA (Choong CS et al. 1996; Ding D et al. 2005).

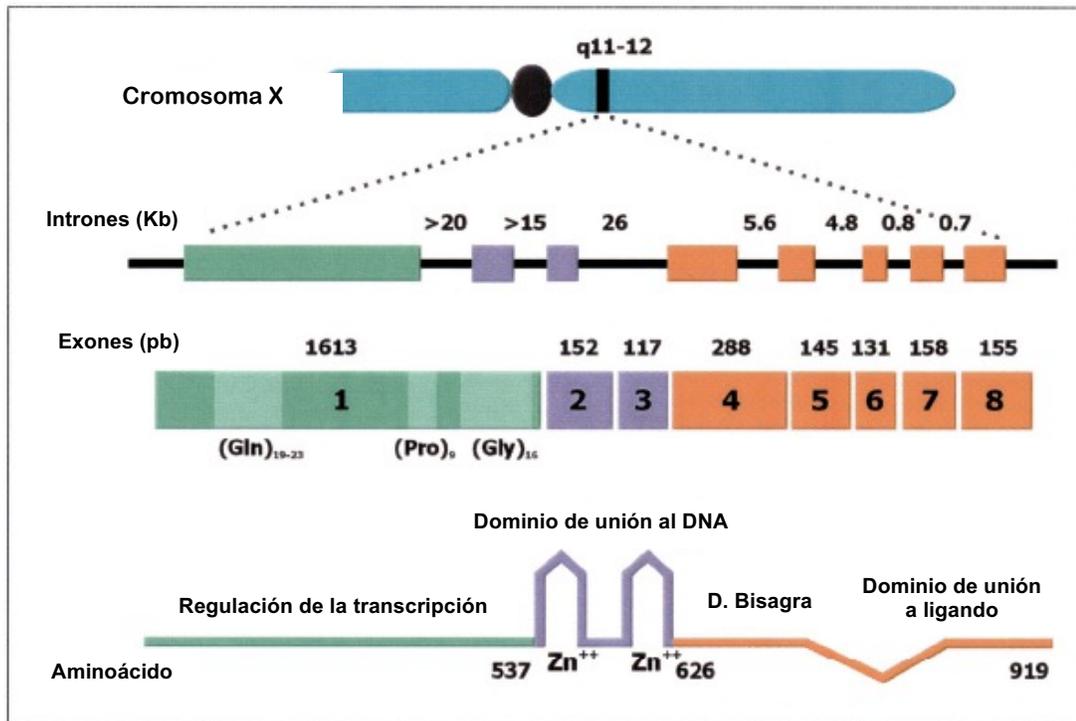


Figura 6. Estructura del gen del receptor de andrógenos y estructura secundaria de la proteína RA. El locus del gen RA se encuentra en Xq11-12. Los repetidos de trinucleótidos CAG y GGC en el exón 1 del gen se traducen en una cadena de poliglutaminas (CAG_n) y poliglicinas (GGC_n), respectivamente. El gen codifica para la proteína RA. *Modificado de Chamberlain NL et al. 1994.*

ALOPECIA ANDROGENETICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

Producto génico normal. El RA es un factor transcripcional dependiente de ligando, perteneciente a la superfamilia de receptores esteroides/nucleares, cuyos miembros comparten homología funcional y estructural básica. La unión de ligandos hidrofóbicos (testosterona y DHT) induce al RA a asumir una configuración que da lugar a la activación transcripcional y permite la transmisión de señales extracelulares e intracelulares mediante elementos de respuesta del promotor y reclutamiento de cofactores (Gobinet J et al. 2002; Gottlieb B et al. 2012).

Microsatélite CAG.

Diversos estudios señalan que la variación anormal en el número de repetidos del trinucleótido CAG puede influir *in vivo* en una variedad de rasgos sensibles a los andrógenos, incluyendo infertilidad masculina, hipertrofia y cáncer de próstata, cáncer de mama y ovario, densidad mineral ósea, composición corporal y concentraciones de lípidos en suero (Suter NM et al. 2003; Ferlin A et al. 2004; Zitzmann M et al. 2004; Zinn AR et al. 2005; Davis-Dao CA et al. 2007; Rajender S et al. 2007; Francomano D et al. 2013). La capacidad de activación transcripcional del RA puede verse reducida conforme aumenta la expansión del repetido (Kallio PJ et al. 1996; Beilin J et al. 2000; Ding D et al. 2004), (**figuras 7A y 7B**).

ALOPECIA ANDROGENETICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

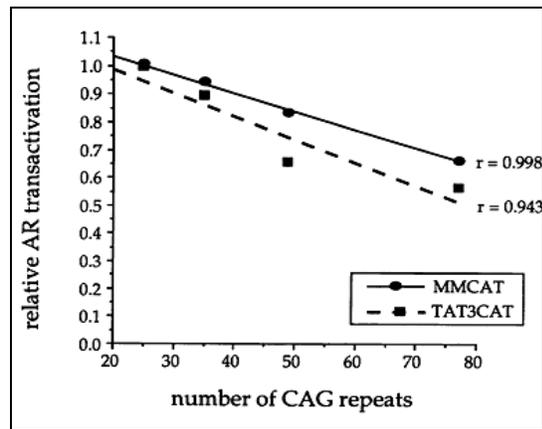


Figura 7A. Correlación del número de repeticiones CAGn del gen RA. Actividad de transactivación del RA que correlaciona de manera inversa con el número de repeticiones CAG (poliglutamina). MMCAT: plásmido reportero, TAT3CAT: gen reportero. *Fuente: Chamberlain NL et al. 1994.*

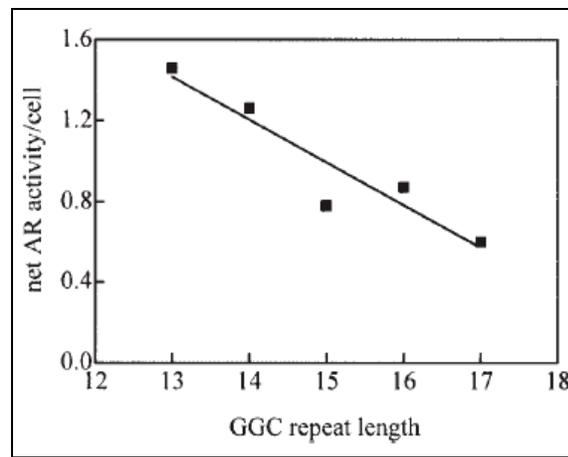


Figura 7B. Correlación del número de repeticiones GGCn del gen RA. Se observa que el número de repeticiones GGC afecta de manera inversa los niveles de proteína RA (RA total/célula). *Fuente: Ding D et al. 2005.*

ALOPECIA ANDROGENETICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

Una expansión mayor a 38 repetidos CAG se relaciona con la presencia de enfermedad de Kennedy, la cual presenta insensibilidad a los andrógenos, atrofia testicular, reducción en la producción de esperma e infertilidad (Finsterer J, 2009). Zinn y cols. (2005) y Zitzmann y cols. (2004), reportaron una asociación entre la longitud del repetido CAG y diversos aspectos del síndrome de Klinefelter. El primer grupo de investigadores observó que el tamaño del microsatélite CAG en 35 pacientes con síndrome de Klinefelter fue de 7 a 35 repetidos, correlacionándose de manera inversa con la longitud del pene ($r^2=0.24$ y $p<0.01$). Este hallazgo fue considerado como una mayor respuesta a andrógenos en sujetos con repetidos más cortos (Zinn AR et al. 2005). Zitzmann y cols. (2004) hallaron un tamaño promedio de repetidos CAG cortos de 19.4 ± 2.1 y de 23.3 ± 2.6 para repetidos largos, en 77 pacientes con síndrome de Klinefelter no tratados con testosterona. Los investigadores detectaron una inactivación preferencial del cromosoma X que portaba el alelo CAG corto. Además, la presencia de repetidos CAG largos fue predictor de ginecomastia y testículos pequeños mientras que el repetido CAG corto se correlacionó con un mejor desempeño psico-social en los individuos. Lo anterior sugiere también un efecto diferencial del RA activo dado por el tamaño del polimorfismo. Otro hallazgo importante fue la presencia de un 40% de varones homocigotos para el tamaño del repetido CAG en los pacientes comparado con un 10-15% observado en mujeres. En conclusión, establecen que existe una modulación del efecto de los andrógenos sobre el fenotipo del síndrome de Klinefelter ejercida a través del polimorfismo CAGn (tamaño) en el gen del RA y que esta modulación puede verse afectada por inactivación preferencial del alelo más corto CAG.

Una amplia revisión de la literatura (Rajender S et al. 2007) muestra la asociación *in vivo* del tamaño de los alelos CAG, con el riesgo para síndrome de ovarios poliquísticos, endometriosis, cáncer de ovario, endometrio, mama, así como de alelos cortos (rango) con el riesgo de enfermedad de Alzheimer, cáncer de colon y cáncer de cabeza y cuello. Otros estudios señalan la asociación entre el tamaño de CAG y cáncer de

mama (Suter NM et al. 2003), cáncer de próstata (Silva-Neto B et al. 2008), función sexual masculina (Tirabassi G et al. 2016), criptorquidia (Wang Y et al. 2018) e infertilidad masculina (Davis-Dao CA et al. 2007).

Microsatélite GGC

Las consecuencias funcionales en la variación del número de repetidos GGC son menos claras. Estudios experimentales muestran que la variación en el número de repetidos GGC no tiene efecto en la actividad de transactivación del RA. Sin embargo, otros estudios muestran que los niveles de la proteína RA se afectan de manera inversa conforme aumenta el número de los repetidos GGC. *In vitro*, un repetido de 13 glicinas produce 2.3 veces más proteína que un repetido de 17 glicinas, $p < 0.001$, $r = -0.94$ (**figura 7B**). Sin embargo, una longitud corta del trinucleótido GGC parece incrementar el riesgo para cáncer de próstata (Stanford JL et al. 1997; Chang BL et al. 2002). También se ha asociado un cambio en el número de repetidos GGC con un mayor riesgo para desarrollar cáncer de endometrio y menor riesgo para el cáncer de mama (Rajender S et al. 2007; Suter NM et al. 2003).

De acuerdo con la última actualización de la base de datos (<http://androgendb.mcgill.ca/>) del RA, para los polimorfismos CAGn (poliglutamina) y GGCn (poliglicina) hay 160 entradas en la base de datos que muestran que la variación en la longitud de ambos trinucleótidos está relacionada con alguna característica fenotípica, aunque la mayor parte corresponde a variaciones en el número de repetidos CAG (Suter NM et al. 2003; Radpour R et al. 2007; Silva-Neto B et al. 2008; Tirabassi G et al. 2016; Wang Y et al. 2018).

Predisposición familiar

Si bien se reconoce una agregación familiar para AGA no ha sido posible definir un modo de herencia para la misma. Osborne en 1916 sugirió que el “gen de la calvicie” se

ALOPECIA ANDROGENETICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

comportaba de manera autosómica dominante en los varones y de manera autosómica recesiva en las mujeres. Küster y Happle (Kuster W y Happle R, 1984) señalan que la prevalencia de los fenotipos de AGA corresponde a una curva de distribución *gaussiana*, la cual es típica de los rasgos con herencia poligénica, en combinación con un efecto umbral. Osborne también observó un espectro de fenotipos que seguían una distribución normal, aunado a que el riesgo de calvicie aumentaba de acuerdo con el número de familiares afectados, características compatibles con herencia poligénica (Sinclair RD, 2004). También se describe la idea de un gen dominante con penetrancia variable en el varón (Feinstein R, 2005).

En un estudio realizado por Chumlea y cols. (2004), en el que se incluyeron 254 participantes de origen caucásico entre 18-49 años de edad, se observó que los varones cuyos padres tuvieron calvicie presentaron un riesgo mayor de alopecia, RM=2.5 (1.3-4.9), comparados con aquellos sujetos cuyos padres no padecieron calvicie. Solamente en el 9% de los participantes reportó historia de calvicie en su madre, pero el análisis mostró un mayor riesgo de pérdida de cabello en este grupo comparado con varones sin historia de calvicie en la madre (**tabla 3**). También estimaron el riesgo de calvicie si ambos progenitores tenían historia de alopecia o si el abuelo materno presentó la pérdida de cabello. De acuerdo con la tabla 3, el riesgo es mayor si ambos progenitores tuvieron calvicie. A pesar de que el antecedente de alopecia en el abuelo materno aporta un riesgo, éste no fue estadísticamente significativo.

Tabla 3. Asociación entre historia familiar de AGA por pariente afectado y riesgo de alopecia

Familiar	RM*	IC
Madre	7.5	(1.7-33.6)
Padre	2.5	(1.3-4.9)
Ambos progenitores	7.9	(1.1-56.5)
Abuelo materno	1.8	(0.9-3.6)

*RM ajustada por edad. *Modificado de: Chumlea WC et al. 2004.*

Estudios en gemelos y concordancia para AGA

Para estimar la concordancia de un rasgo entre gemelos se utiliza la tasa de concordancia (índice kappa). En el caso de rasgos cuantitativos se utiliza el coeficiente de correlación interclase. Este parámetro varía entre -1 y 1 y mide el grado de homogeneidad de un rasgo en una muestra de individuos. Si el rasgo está totalmente determinado por los genes, es de esperar que el coeficiente de correlación para las parejas de gemelos monocigóticos (MC) sea 1 (cada miembro de la pareja de gemelos tendría exactamente el mismo rasgo). Un coeficiente de correlación de 0 significaría que la semejanza entre los gemelos MC para el rasgo en cuestión no es mayor que la esperada por el azar. Dado que los gemelos dicigóticos (DC) comparten la mitad de sus genes, es de esperar un coeficiente de correlación de 0.5 para un rasgo totalmente determinado por los genes (Jorde LB et al. 2005). Ambas medidas se utilizan para estimar la heredabilidad, es decir, el grado en que un rasgo está determinado genéticamente.

Nyholt y cols. (2003) estimaron la heredabilidad para AGA en un estudio que incluyó datos correspondientes a 476 pares de gemelos monocigóticos (MC), 408 pares de gemelos dicigóticos (DC) y 297 individuos que tenían un hermano gemelo MC o DC,

ALOPECIA ANDROGENETICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

provenientes del Registro Australiano de Gemelos. Los investigadores obtuvieron un modelo del umbral “múltiple” como resultado del análisis, observando una distribución normal de la AGA y una heredabilidad del 0.81 (0.77-0.85) para gemelos MC, comparada con una heredabilidad del 0.39 (0.28-0.49) para gemelos DC. Los autores concluyen que la AGA tiene un fuerte componente genético.

Koyama y cols. (2013) estudiaron once pares de gemelos MC de origen japonés que presentaban AGA, las edades de inicio de la alopecia iban de los 20 a los 43 años. Cinco de los once pares presentaban diferencias basales significativas en el volumen del cabello. Los sujetos fueron seguidos durante un año con tratamiento convencional para AGA (minoxidil y finasteride) y cuatro de los cinco continuaban presentando diferencias significativas en el volumen de cabello. En dos pares de gemelos se contaba con el número de repetidos CAG/GGC que fue de 25/17 y 23/17, respectivamente. Los autores sugieren que la diferencia en el fenotipo entre los gemelos DC pudiera atribuirse a diferencia epigenéticas entre los gemelos MC.

Polimorfismos del RA en el exón 1 y AGA

Diversos estudios han intentado encontrar una relación entre la prevalencia de ciertos polimorfismos de genes relacionados con el metabolismo de los andrógenos y la AGA. En 1998 Ellis y cols. (1998) analizaron dos polimorfismos de las enzimas 5 α R tipo 1 y 2, con la técnica de RFLPs: utilizando las enzimas de restricción *HindI* y *NspI*. Todos los participantes provenían del “Victorian Family Heart Study”, estudio australiano poblacional que analiza factores de riesgo relacionados con enfermedad coronaria y que cuenta con aproximadamente 800 familias. Los investigadores obtuvieron la frecuencia de las variantes mencionadas en 55 varones con AGA de inicio temprano, entre los 18 y 30 años de edad, y 107 controles sin evidencia de AGA entre los 50-70 años, observando que las frecuencias de los alelos A y B para la 5 α R tipo 1 fueron de 49.1% y 50.9% en los casos y de 48.6% y 51.4% en los controles, respectivamente. Para el caso de la 5 α R tipo

ALOPECIA ANDROGENETICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

2, las frecuencias fueron de 30.4% y 69.6% y de 29.0 y 71.0 para los alelos A y B en casos y controles, respectivamente. Ninguna de las diferencias fue estadísticamente significativa (ES), ni tampoco cuando se formaron haplotipos para las diferentes combinaciones. Un dato interesante de este estudio fue que el 59.3% de los casos tenían padres con un mayor grado de alopecia, sugiriendo un posible carácter dominante de la AGA.

El mismo grupo (Ellis JA et al. 2001), comparó las frecuencias alélicas del polimorfismo *StuI* y dos repetidos de trinucleótidos (CAG y GGC) en casos con AGA (54 jóvenes y 392 adultos ≥ 50 años) y sus controles (107 varones sin AGA). El marcador *StuI* (*rs6152*), localizado en el exón 1 del gen *RA*, es un marcador dimórfico sin efecto funcional e identificable mediante la técnica de RFLP. Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre las frecuencias alélicas del polimorfismo de restricción en los hombres jóvenes (98.1%) y los controles (76.6%), $p=0.0005$. También se demostró una diferencia significativa entre los adultos ≥ 50 años (92.3%) y sus controles pareados por edad, $p=0.00004$. No hubo diferencias al comparar las frecuencias alélicas entre los casos jóvenes y los casos ≥ 50 años, $p=0.11$. En cuanto al número de repetidos CAG y GGC, se observaron medianas de 21 y 17 repeticiones para estas variantes, respectivamente. La amplitud de los repetidos fue de 16 a 32 para el trinucleótido CAG y de 4 a 21 para el trinucleótido GGC. Definiendo a los repetidos como cortos o largos, dependiendo de si se encontraban por arriba o por debajo de la mediana, no se observaron diferencias. Sin embargo, al formar haplotipos de repetidos, las diferencias fueron significativas (**tabla 4**), sugiriendo una asociación entre AGA y el receptor de andrógenos. Los autores también señalaron que la alteración del gen *RA* es necesaria pero no suficiente para la presentación de AGA y proponen una herencia poligénica para este fenotipo dependiente de la combinación de una mutación en o cerca del *RA* que afecta la expresión de este receptor y de genes que controlan los niveles de andrógenos.

ALOPECIA ANDROGENETICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

Hillmer y cols. (2005) estudiaron 95 familias en las que al menos 2 hermanos tenían AGA, reclutando 391 individuos de los cuales 201 estaban afectados. Como parte de un estudio de asociación del genoma completo (GWAS), se buscaron marcadores de ligamiento en el cromosoma X, un total de 39 marcadores tipo SNP distribuidos a lo largo de este cromosoma fueron evaluados. Los resultados mostraron evidencia de ligamiento en la región Xq12-q22, con un score de 2.70. Esta región contiene el gen *AR* y el estudio incluyó las variantes reportadas previamente: *StuI* (rs6152), CAG y GGC. Para el análisis de casos/controles se compararon las frecuencias alélicas de 198 varones con presentación temprana de AGA (<40 años), 188 individuos control y 157 varones no afectados (>60 años). Los investigadores mostraron que la variabilidad genética en el gen *RA* es el pre-requisito cardinal en el desarrollo de una presentación temprana de la AGA, atribuyendo una fracción etiológica del 0.46% para las variantes estudiadas y proponen en este estudio que el repetido GGC es el factor de riesgo para la presentación de AGA, considerándolo un candidato plausible para conferir el efecto funcional del receptor en AGA.

Tabla 4. Diferencias de los repetidos de trinucleótidos CAG y GGC del RA, entre casos y controles.

	Casos	Controles
Repetidos CAG (%)		
corto	57.1	52.3
largo	42.9	47.7
Repetidos GGC (%)		
corto	75.9	63.6
largo	24.1	36.4
Haplotipos CAG/GGC (%)		
corto/corto	50.0*	29.5*
corto/largo	7.1	21.9
largo/corto	28.6	34.3
largo/largo	14.3	14.3

CAG: corto ≤ 22 repetidos, largo > 22 . GGC: corto ≤ 17 repetidos, largo > 17 . * $p=0.03$. Tomado de: Ellis JA, et al. 2001.

Ellis y cols. (2007) mostraron consistencia de la asociación del polimorfismo rs6152 y AGA en un estudio posterior, también derivado del “Victorian Family Heart Study”, ampliando el análisis a 1,200 padres e hijos provenientes de 703 familias caucásicas e incluyendo además el estudio del número de repetidos GGC del exón 1 del gen RA. La frecuencia del alelo rs6152 fue del 12.3%. La variación en el número de repetidos CAG y GGC fue de 8 a 32 y de 11 a 29, respectivamente, aunque el 85% de los varones mostró 23 o 24 repetidos. La asociación con el SNP rs6152 y AGA fue significativa, $p < 0.0001$, pero no hubo relación con el número de repetidos GGC, $p = 0.13$.

Otros estudios han encontrado asociaciones de polimorfismos génicos con AGA, aunque el significado biológico de las variantes génicas no está tan claro como en los trabajos anteriores. Garton y cols. (2005) estudiaron el gen de la ornitina descarboxilasa (ODC), el cual participa en el crecimiento del cabello y la inhibición de su producto se

utiliza en el tratamiento del hirsutismo. El polimorfismo, detectado mediante corte con la enzima de restricción *Pst*I, fue estudiado en 23 individuos con AGA y 23 controles. La frecuencia de los genotipos heterocigoto y homocigoto mutante fue menor (30%) en individuos con AGA que en individuos no alopécicos (65%), aunque no se discute ningún el significado biológico de este polimorfismo en AGA y esta asociación no ha sido reportada por algún otro grupo de investigadores.

Estudios GWAS y AGA

Hillmer y cols. (2008a) realizaron un estudio de genoma completo (GWAS) en 95 familias de descendencia alemana que contaban con al menos 2 hermanos con AGA de presentación temprana y con ambos progenitores disponibles. El estudio reveló evidencia de ligamiento no paramétrico ($p < 0.05$) en 14 regiones cromosómicas: 1q31-q32, 3q21-q27, 5p13-p15, 7q36, 8q13-q21, 8q24, 10p12-p14, 11q14-q24, 14q11, 16p12-p13, 18p11-q22, 19p13-q13, 21q21-q22 y Xp11-q25. El locus con mayor evidencia de ligamiento fue mapeado en 3q26 con una puntuación LOD de 3.97, ($p = 0.00055$). Los autores concluyeron que 1) La identificación de 14 regiones con evidencia de ligamiento apoya la opinión de que la AGA es causada por el efecto de múltiples genes; 2) Otros *loci* de susceptibilidad para AGA, localizados en autosomas, podrían explicar la similitud en la propensión a desarrollar AGA entre padres e hijos.

Otro estudio de GWAS, realizado también por Hillmer y cols. (2008b), estudió en 296 varones con AGA y 347 controles de origen alemán. Para este análisis se seleccionaron 30 SNPs, observándose una asociación significativa con AGA de inicio temprano (< 40 años), así como una región candidata para AGA: 20p11. La mayor razón de momios (RM) se observó para la variante *rs2180439*, RM: 2.17 (1.70-2.78). Los hallazgos sugieren que este locus tiene un papel aun no bien identificado en la vía de los andrógenos para la ocurrencia de AGA. No se detectó ninguna interacción con el locus

ALOPECIA ANDROGENETICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

del gen *RA* en el cromosoma X, sugiriendo que 20p11 juega un papel independiente en la vía de los andrógenos asociados a AGA y en el cual queda aún por identificarse un gen candidato.

Resultados similares fueron observados por Cobb JE y cols. (2010) en población australiana. Los SNPs identificados en ambos estudios se encuentran cercanos al gen *PAX1* (*paired box 1*), el cual se expresa en piel, cabello y cuero cabelludo, lo que lo hace un buen gen candidato para AGA.

Prodi y cols. (2008) estudiaron población italiana con AGA (200 casos y 200 controles), utilizando un chip 500K que contenía más de 7000 SNPs a lo largo del cromosoma X. Los autores identificaron que la variante *rs1352015* localizada 8Kb río arriba del extremo 5' del gen *EDA2R* (receptor de la ectodisplasia-2), se asoció con AGA ($p=7.77^{-7}$). Este gen se localiza en un locus cercano al *RA* en Xq11-12. Se ha postulado que *EDA2R* podría afectar la presentación de AGA a través de la activación de la vía de NF-kB o mediante c-Jun, que se ha visto son determinantes en la transactivación del *RA*.

Otro locus de susceptibilidad para AGA en varones de origen alemán, se mapeó en 3q26, sin embargo, no se han identificado genes relacionados al desarrollo o regulación del cabello en esta región (Hillmer AM et al. 2008b).

Recientemente, otro estudio que analizó 581 varones afectados por AGA y 617 controles, identificó 2 SNPs de susceptibilidad en 7p21.1, dentro del gen de la desacetilasa de histonas 9 (*HDAC9*). Un mapeo fino de la región y la réplica del estudio en población australiana reveló que los SNPs *rs756853* y *rs2249817* son los que confieren susceptibilidad para AGA, $p=1.64 \times 10^{-7}$ y $p=9.09 \times 10^{-8}$, respectivamente. Como es sabido, los miembros de la familia génica de desacetilasas de histonas actúan como reguladores de la transcripción, por lo que los autores postulan que *HDAC9* puede interactuar con *RA* regulando su actividad transcripcional, posiblemente de una forma tejido-específica (Brockschmidt FF et al. 2011).

Variación en el número de copias y AGA.

La variación en el número de copias (CNVs) ha sido reconocida como una forma de polimorfismo genómico en los individuos, en que segmentos de DNA mayores a 1 Kb se encuentran alterados en el número de copias, comparadas con un genoma de referencia. Aproximadamente un 12% de nuestro genoma se encuentra relacionado a CNVs. Algunos CNVs se han identificado en el *RA* y podrían resultar en un número variable de copias de regiones reguladoras o copias de un mismo gen y explicar, en parte, las alteraciones tejido específico del *RA* en hombres con AGA. Bajo esta hipótesis, Cobb JE y cols. (2009) analizaron mediante la técnica de MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) la presencia de CNVs en los exones del *RA* y regiones no codificantes río arriba de este gen en 34 individuos que tenían entre 20 y 30 años de edad y alopecia III o más y en 51 controles sin AGA entre las edades de 54-68 años. Los resultados no mostraron evidencia de algún CNV en el *RA* en casos o controles.

JUSTIFICACIÓN

La frecuencia de AGA se estima del 30 al 50% dependiendo de la población estudiada y de la edad de los individuos analizados. Diversos estudios han mostrado una relación inversa entre la actividad del RA y el número de repetidos CAG y GGC. Debido a que la AGA es un fenotipo fácilmente identificable y frecuente, puede utilizarse como modelo de estudio para determinar el riesgo de ser portador de un genotipo de susceptibilidad (haplotipos CAG/GGC) para la presentación de AGA. El análisis de este haplotipo nos permitiría determinar:

- 1) La tasa de concordancia entre hermanos para un rasgo genético en el que aún no se ha establecido un modo de herencia definido.
- 2) Identificar la variación en el número de repetidos CAG y GGC en una muestra de varones con AGA y sus hermanos con o sin AGA.

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la concordancia entre el número de repetidos CAG y GGC del gen *RA* y la presencia de AGA en pares de hermanos con AGA?

¿Existe algún haplotipo de riesgo del número de repetidos CAG/GGC para AGA?

¿Algún haplotipo CAG/GGC segrega preferencialmente entre madre e hijos con AGA?

HIPÓTESIS:

Hipótesis alterna 1:

“La concordancia entre el número de repetidos CAG/GGC del RA y la presencia de AGA será mayor al 70% en pares de hermanos comparada con la esperada por el azar”

Hipótesis alterna 2:

“El haplotipo de alelos cortos/cortos de CAG/GGC es un factor de riesgo para AGA”

Hipótesis alterna 3:

“Existe segregación preferencial de los alelos cortos/cortos de CAG/GGC en sujetos con AGA”

OBJETIVO GENERAL:

Determinar la asociación entre AGA y el número de repetidos CAG/GGC del gen del Receptor de Andrógenos en una muestra de familias con al menos un varón afectado e identificar una posible segregación preferencial de los alelos cortos/cortos de CAG/GGC en sujetos con AGA

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Identificar los diferentes patrones de AGA en la muestra estudiada.
2. Conocer el número de repetidos CAG y GGC y los diferentes haplotipos posibles CAG/GGC del gen *RA* en una muestra de individuos con AGA.
3. Identificar una posible correlación entre AGA y el tamaño de repetidos CAG/GGC, conociendo los haplotipos de cada individuo.
4. Conocer si existe desequilibrio de transmisión de los repetidos CAG/GGC en varones con AGA comparado con hermanos no alopécicos, para lo cual se identificará el número de repetidos CAG/GGC en la madre de ambos.

DISEÑO DEL ESTUDIO:

Estudio descriptivo, observacional, comparativo y transversal. Se analizaron tríos de familias consistentes de pares de hermanos y la madre de ambos.

MATERIAL Y MÉTODOS:

La muestra estuvo integrada por varones que acuden al servicio de medicina transfusional del INCMNSZ como donadores potenciales, pacientes de la consulta externa de Dermatología y trabajadores del INCMNSZ.

Los varones se seleccionaron de acuerdo a los siguientes criterios:

Criterios de inclusión para los CASOS:

- Edad igual o mayor a 18 años
- Presencia de AGA
- Tener al menos un hermano mayor o un hermano menor (no más allá de 5 años) que aceptara participar en el protocolo
- Que la madre del propósito se encontrara disponible para una toma de muestra de sangre o saliva y también aceptara participar en el estudio
- Firmar la carta de consentimiento informado

Criterio de exclusión:

- Alopecia cicatrizal de cualquier etiología

Criterio de eliminación:

- Que la madre resultase homocigota para el repetido CAG una vez realizada la secuenciación, con la finalidad de conocer la segregación de los alelos CAG/GGC.

ALOPECIA ANDROGENETICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

Cálculo del tamaño de muestra:

Para el cálculo de tamaño de muestra se realizó un estudio piloto para evaluar la concordancia fenotípica y genotípica (Presencia de AGA en ambos hermanos y número de repetidos CAG/GGC). Se incluyeron 15 pares de hermanos, conformados por 10 pares concordantes para AGA y para el número de repetidos, 5 pares concordantes para AGA y discordantes para el número de repetidos, 5 pares discordantes para AGA y concordantes para el número de repetidos y 12 pares discordantes para AGA y para el número de repetidos. En estas duplas se observó un acuerdo del 0.87 con valor *kappa* libre de azar de 0.74, IC_{95%} (0.4-1.0). Considerando que se mantuvieran las mismas frecuencias, la muestra a analizar para encontrar diferencias estadísticas significativas fue de 30 pares de hermanos (**tabla 6**).

Tabla 6. Tamaño de muestra estimada de acuerdo al estudio piloto.

Tamaño de la n estimada en base a concordancia (κ).

Pares de hermanos	n=15	n=30	n=50	n=100
Acuerdo	0.867	0.867	0.860	0.867
Kappa libre de azar	0.737	0.737	0.724	0.737
IC _{95%}	0.419-1.000	0.505-0.968	0.542-0.906	0.633-0.840

METODOLOGÍA

A los sujetos que cumplieron con los criterios de selección se les invitó de forma individual a participar en la investigación. Se les explicó claramente cuáles eran los objetivos del estudio, se les dio una carta de información y se les solicitó que firmaran la carta de consentimiento informado. La clasificación del tipo de alopecia se realizó mediante inspección directa tanto por el médico responsable del estudio como por un dermatólogo, para asignar el fenotipo de acuerdo a la escala de Norwood-Hamilton.

A los individuos que cumplieron con los requisitos anteriores se les realizó:

- 1) Encuesta clínica genética para determinar antecedentes heredofamiliares, con el propósito de identificar agregación familiar para AGA.
- 2) Extracción de una muestra de 15 ml de sangre periférica o células de mucosa oral para análisis de los polimorfismos ya mencionados.

Métodos de laboratorio:

Toma de muestra: Extracción de aproximadamente 10 ml de sangre periférica en 2 tubos *vacutainer* con EDTA ó recolección de células de mucosa oral para extracción de DNA, empleando un citoprotector.

Extracción de DNA

Se realizó a partir del paquete leucocitario resultado de la centrifugación, empleando técnicas convencionales de extracción por sales (**apéndices 1 y 2**).

PCR y secuenciación Sanger

Para la determinación del número exacto de repetidos CAG y GGC en el exón 1 del *RA*, se empleó la técnica de PCR y de secuenciación automatizada bidireccional, ambas estandarizadas en el Departamento de Genética. La secuencia de estudio se obtuvo de la

ALOPECIA ANDROGENETICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

base de datos Ensembl (ENSG00000169083), los primers utilizados en las reacciones de amplificación y secuenciación derivaron de la secuencia normal del gen *RA* (**figura 8**). Cada reacción de amplificado (50 μ L) para PCR contenía: Buffer 5x (10 μ L), 3 μ L de MgCl, 1 μ L de dNTP's, 0.5 μ L de primer sentido, 0.5 μ L de primer antisentido, 0.5 μ L de Taq polimerasa, 0.5 μ L (180-200 ng) de DNA, 2.5 μ L dimetil-sulfóxido al 5% y 31.5 μ L de agua destilada. Las temperaturas utilizadas en la PCR convencional fueron: 98°C para la desnaturalización, 72°C para alineación y 65°C para la extensión. Las muestras se incubaron en un termociclador de punto final (modelo Mastercycler gradient, marca eppendorf®) durante 35 ciclos.

Los productos de la PCR se analizaron empleando electroforesis en gel de agarosa al 10% y para la discriminación de los alelos de las madres de los casos (que poseen dos cromosomas X), los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 20%. Posteriormente se realizó el corte manual de las bandas de los geles para purificación del DNA con el kit QIAquick-PCR de QIAGEN®. La reacción de secuencia se realizó con el kit BigDye Terminator v3.1 de Applied Biosystems®. Las reacciones de secuencia se procesaron con el analizador genético ABI prism 310 de Applied Biosystems® y la lectura de los electroferogramas se realizó de forma manual, siendo revisado cada secuencia por dos observadores independientes (**figura 9**).

ALOPECIA ANDROGENETICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

Transcript: AR-001 (ENST00000374690)

Androgen receptor (Dihydrotestosterone receptor)(Nuclear receptor subfamily 3 group C member 4) Location [Chromosome X](#): forward strand. Gene.

(http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?g=ENSGO0000169083;r=X:66764465-66950461;t=ENST00000374690).

```
2,140GCGGAGAGAACCCTCTGTTTTCCCCACTCTCTCTCCACCTCCTCCTGCCTTCCCCACCC
CGAGTGC GGAGCCAGAGATCAAAAAGATGAAAAGGCAGTCAGGTCTTCAGTAGCCAAAAA
CAAAACAAACAAAAACAAAAAGCCGAAATAAAAGAAAAAGATAATAACTCAGTCTTAT
TTGCACCTACTTTCAGTGGACACTGAATTTGGAAGGTGGAGGATTTTGTTTTTTCTTTTA
AGATCTGGGCATCTTTTGAATCTACCCTTCAAGTATTAAGAGACAGACTGTGAGCCTAGC
AGGGCAGATCTTGTCCACCGTGTGTCTTCTCTGCACGAGACTTTGAGGCTGTCAGAGCG
CTTTTTCGCGTGGTTGCTCCCGCAAGTTTCTTCTCTGGAGCTTCCCGCAGGTGGGCAGCT
AGCTGCAGCGACTACCGCATCATCACAGCCTGTTGAACTCTTCTGAGCAAGAGAAGGGGA
GGCGGGGTAAGGGAAGTAGGTGGAAGATTCAGCCAAGCTCAAGGATGGAAGTGCAGTTAG
GGCTGGGAAGGGTCTACCTTCGGCCGCCGTCCAAGACCTACCGAGGAGCTTCCAGAAATC
TGTTCAGAGCGTGC GCGAAGTGATCCAGAACCCGGGCCCCAGGCACCCAGAGGCCGCGA
GCGCAGCACCTCCCGGCCAGTTTGTGCTGTGTGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC
AGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC
AGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC
AGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC
GCTACCTGGTCTGTGATGAGGAACAGCAACCTTCACAGC GCGCAGTCGGCCCTGGAGTGCC
ACCCGAGAGAGGTTGCGTCCAGAGCCTGGAGCCGCCGTGGCCGCCAGCAAGGGGCTGC
CGCAGCAGCTGCCAGCACCTCCGGACGAGGATGACTCAGCTGCCCCATCCACGTTGTCCC
TGCTGGGCCCCACTTTCCCGGCTTAAGCAGCTGCTCCGCTGACCTTAAAGACATCCTGA
GCGAGGCCAGCACCATGCAACTCCTTTCAGCAACAGCAGCAGGAAGCAGTATCCGAAGGCA
GCAGCAGCGGGAGAGCGAGGGAGGCCTCGGGGCTCCCACTTCTTCCAAGGACAATTACT
TAGGGGGCACTTCGACCATTCTGACAACGCCAAGGAGTTGTGTAAGGCAGTGTGGTGT
CCATGGGCCTGGGTGTGGAGGCGTTGGAGCATCTGAGTCCAGGGGAACAGCTTCGGGGGG
ATTGCATGTACGCCCACTTTTGGGAGTTCCACCCGCTGTGCGTCCCACTCCTTGTGCC
CATTTGCCGAATGCCAAGGTTCTCTGCTAGACGACAGCGCAGGCAAGAGCACTGAAGATA
CTGCTGAGTATTCCCCTTTCAAGGGAGGTTACACCAAAGGGCTAGAAGGCGAGAGCCTAG
GCTGCTCTGGCAGCGCTGCAGCAGGGAGCTCCGGGACACTTGAAGTCCGCTTACCCTGT
CTCTCTACAAGTCCGGAGCACTGGACGAGGCACTGCGTACCAGAGTCGCGACTACTACA
ACTTTCCTACTGGCTCTGGCCGGACCGCCGCCCTCCGCGCCTCCCATCCCCACGCTC
GCATCAAGCTGGAGAACCCGCTGGACTACGGCAGCGCCTGGGCGGCTGCGGCGGCGCAGT
GCCGCTATGGGGACCTGGCGAGCCTGCATGGCGGGTGCAGCGGGACCCGGTTCTGGGT
CACCTCAGCCGCCGCTTCTCATCCTGGCACACTCTCTCACA GCCGAAGAAGGCCAGT
TGTATGGACCGTGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
GGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGG
CGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGG
GAGGCGGGAGCTGTAGCCCCCTACGGCTACACTCGGC
CCCCCAGGGGCTGGCGGGCCAGGAAAGCGACTTACCCGACCTGATGTGTGGTACCCTG
GCGGCATGGTGAGCAGAGTGCCTATCCAGTCCCCTTGTGTCAAAGCGAAATGGGCG
CCTGGATGGATAGCTACTCCGGACCTTACGGGGACATGCC
```

Figura 8. Secuencia de nucleótidos del exón 1 del gen RA. En rojo se muestra el codón de inicio del gen. En verde se señalan las secuencias utilizadas para el diseño de los cebadores (primers) y en amarillo se destacan los repetidos CAG y GGC. En la secuencia de referencia se aprecian 22 repetidos CAG y 17 repetidos GGC.

ALOPECIA ANDROGENETICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

Variables a medir en los grupos

- Principal: concordancia entre el número de repetidos CAG y GGC del receptor de andrógenos.
- Secundarias: edad actual y edad de inicio de la alopecia.
- A los participantes con AGA se identificará además el tipo de alopecia de acuerdo a la clasificación de Norwood-Hamilton.

Definiciones operacionales.

Concordancia fenotípica: Tanto el caso como su hermano presentan AGA.

Concordancia genotípica: Ambos hermanos presentan el mismo número de repetidos CAG/GGC (**figura 10**).

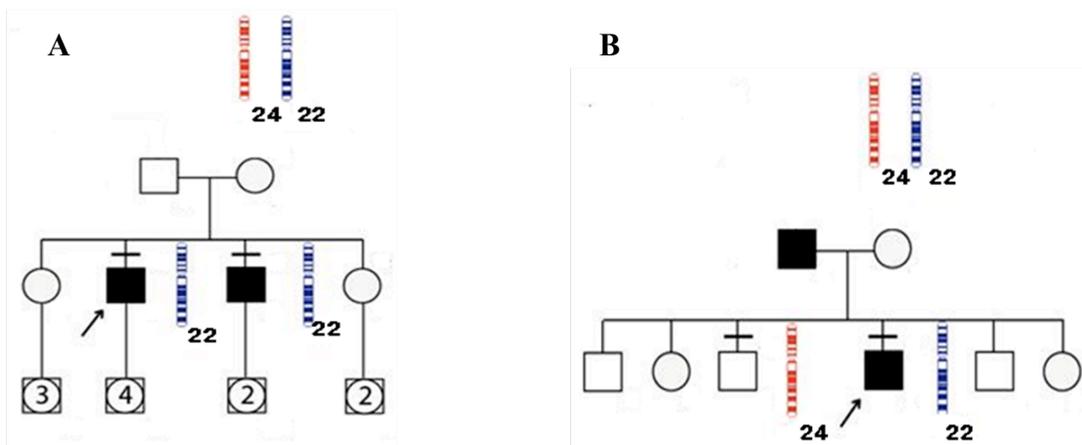


Figura 10. Concordancia Genotipo/Fenotipo en AGA. A. La madre del caso porta en un cromosoma X el alelo CAG de 22 repetidos y en el otro X presenta un alelo de 24 repetidos (heterocigota), transmitiendo a sus dos hijos afectados por AGA el cromosoma con el alelo de 22 repetidos. Se muestra concordancia fenotípica y concordancia genotípica. **B.** En este caso la madre también es heterocigota y transmitió al caso con AGA el cromosoma X con 22 repetidos y al hermano sin alopecia, el cromosoma con 24 repetidos, lo que se interpreta como discordancia fenotípica y discordancia genotípica.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Caracterizamos a la población de estudio mediante el uso de estadística descriptiva tomando en cuenta las variables mencionadas previamente en los casos y controles. Se diseñó una base de datos con la finalidad de capturar la información recogida y se empleó el programa SPSS versión 13.0 para el análisis estadístico.

Repetidos CAG/GGC

Se identificaron los números de repetidos CAG y GGC en el exón 1 del *RA* para cada individuo y formación de haplotipos CAG/GGC: corto/corto, corto/largo, largo/corto y largo/largo. El cálculo de las razones de momios (RM) se realizó con el programa *Statistical Analysis Battery for Epidemiologic Research* (SABER) del CDC, Atlanta Georgia (<http://www.cdc.gov/ncbddd/birthdefects/research-tools.html>).

Los haplotipos resultantes se clasificaron en 4 categorías:

- 1) Concordancia entre hermanos para el haplotipo CAG/GGC y para AGA.
- 2) Concordancia entre hermanos para el haplotipo CAG/GGC y discordancia para AGA.
- 3) Discordancia entre hermanos para el haplotipo CAG/GGC y concordancia para AGA.
- 4) Discordancia entre hermanos para el haplotipo CAG/GGC y para AGA.

Kappa para el estudio de concordancia libre de azar

Una vez estimado el número de repetidos CAG/GGC del *RA* en cada trío analizado así como la presencia o no de AGA, se estimó la concordancia mediante el índice *kappa* que se realizó con el programa de uso libre graphpad 2012, (<http://graphpad.com/quickcalcs/kappa2/>).

Estudio de desequilibrio de transmisión

Considerando que: los marcadores genéticos estudiados son multialélicos, que ambos se encuentran localizados en el cromosoma X, que el rasgo de interés (AGA) sólo se observa en los varones, que las madres únicamente son informativas si son heterocigotas, que la estructura familiar del trío es de *caso-hermano-madre*, decidimos estimar la posible presencia de desequilibrio de transmisión entre AGA y el número de repetidos CAG/GGC mediante la prueba de asociación FBAT (family-based association test). El FBAT es un método estadístico basado en la prueba de desequilibrio de transmisión (TDT) clásica para el análisis de marcadores en el cromosoma X (Jugessur A et al. 2012), aplicable al modelo propuesto ya que el rasgo de interés afecta sólo a los varones y las madres heterocigotas son informativas (Laird NM et al. 2000). El análisis además permite estimar una magnitud de asociación entre los marcadores en estudio cuando el padre no es informativo (Horvath S et al. 2000), como es el caso de nuestra muestra. El FBAT se realizó usando el modelo genético aditivo para examinar la asociación entre los marcadores en el cromosoma X y la presencia de AGA. El paquete estadístico utilizado se encuentra con acceso gratuito en línea: <http://www.biostat.harvard.edu/fbat>. Para todas las comparaciones utilizadas se consideraron como estadísticamente significativas a una $p < 0.05$.

Aprobación por parte de los Comités de Ética e Investigación en Humanos:

El Comité Institucional de Investigación Biomédica en Humanos y el Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” aprobaron la realización del protocolo, número de referencia: 1746.

RESULTADOS

Considerando a las madres de los casos de la muestra inicial (39 tríos), se observó un 82.9% de heterocigocidad para el repetido CAG y del 35.9% para el repetido GGC. Se excluyeron los 7 tríos en los que las madres no eran informativas. La muestra final estuvo integrada por 32 tríos completos (caso con AGA, un hermano –con o sin AGA- y la madre).

La mediana de edad para los 32 casos índice con AGA fue de 26.0 (18-59), para el grupo de 16 hermanos con AGA fue de 28.0 (19-57) y para el grupo de 16 hermanos sin AGA de 26.5 (18-55). La mediana de edad de inicio de la AGA fue de 24 años con edades que van de los 17 a los 40 años. En la **figura 11** se aprecian dos ejemplos de discordancia y concordancia para el fenotipo estudiado.

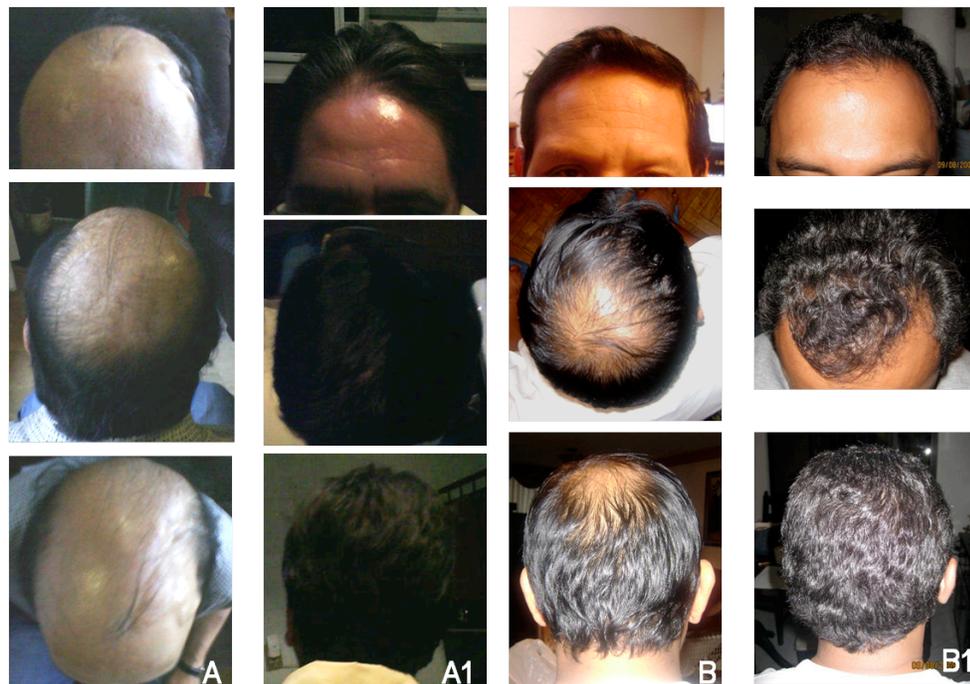


Figura 11. Fenotipos de AGA. A y A1, hermanos discordantes para AGA, el individuo A presenta alopecia tipo VII y su hermano no presenta AGA. **B y B1** son hermanos concordantes para AGA, con tipos III vértex y IVa, respectivamente.

ALOPECIA ANDROGENETICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

La proporción de los diferentes tipos de AGA observados en 48 individuos (32 casos índice y 16 hermanos concordantes) se presenta en la **tabla 7**, el patrón más frecuente fue el tipo II de la clasificación de Norwood-Hamilton (37.5%).

Tabla 7. Distribución de los fenotipos de AGA, de acuerdo a la escala de Norwood-Hamilton en 48 individuos con AGA (32 casos y 16 hermanos)

Tipo de AGA	Número	Frecuencia (%)
I	9	18.8
II	18	37.5
Ila	5	10.4
III	5	10.4
IIIa	1	2.1
IIIv	4	8.3
IV	0	0.00
IVa	1	2.1
V	2	4.2
Va	1	2.1
VI	1	2.1
VII	1	2.1
Total	48	100.0%

Los resultados de la secuenciación tipo Sanger se muestran en la **tabla 8**, se pueden observar los tríos analizados, propósito-hermano-madre. Se presentan los haplotipos CAG/GGC, y se muestra la segregación de los haplotipos maternos a cada hermano. En la sexta y séptima columnas el símbolo +/- corresponde a la presencia o ausencia de concordancia fenotípica y genotípica entre ambos hermanos, respectivamente.

Variación de los repetidos CAG/GGC

Tomando en cuenta a los 32 pares de hermanos en conjunto, el repetido CAG mostró una mediana de 21.5 (15-27) y el repetido GGC una mediana de 17 (15-18). La distribución para ambos trinucleótidos se observa en la **figura 12**.

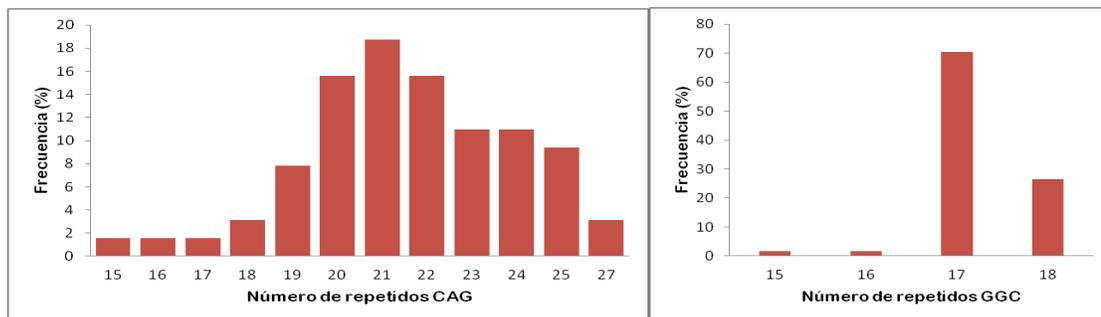


Figura 12. Distribución del número de repetidos CAG y GGC en el exón 1 del gen RA. La muestra está integrada por un total de 64 sujetos.

La distribución del número de repetidos con respecto al valor de la mediana nos permitió clasificar los alelos CAG en cortos (≤ 22 repetidos) y largos (≥ 23). Para los alelos GGC, los alelos cortos tenían ≤ 17 repetidos y los largos un número ≥ 18 . Los datos se muestran en la **tabla 9**.

Tabla 9. Frecuencias alélicas de los polimorfismos CAG/GGC en 32 pares de hermanos.

Polimorfismo	n=64
Repetidos CAG	
corto ≤ 22	42 (65.6%)
largo ≥ 23	22 (34.4%)
Repetidos GGC	
corto ≤ 17	47 (73.4%)
largo ≥ 18	17 (26.6%)

ALOPECIA ANDROGENETICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

Considerando a los individuos que presentaban algún tipo de alopecia (n=48) y los que no presentaron alopecia (n=16), se observó que la frecuencia de los alelos CAG cortos fue de 68.7% en los alopécicos y de 56.2% en el grupo de individuos sin alopecia, diferencia que no fue ES (OR=1.71, IC95% 0.44-6.30, $X^2=0.37$, $p=0.54$). Para el repetido GGC, las frecuencias de los alelos cortos fueron muy similares, 72.9% y 75.0% para alopécicos y no alopécicos, respectivamente (**tabla 10**). Las comparaciones entre la frecuencia de los diferentes haplotipos posibles y la presencia de AGA no mostraron diferencias ES. Tampoco hubo diferencias al considerar la frecuencia de los haplotipos corto/corto, corto/largo, largo/corto y largo/largo entre el total de individuos con AGA (n=48) y aquellos sin AGA (n=16), **tabla 11**.

Tabla 10. Frecuencias alélicas de los polimorfismos CAG/GGC en individuos con AGA y sin AGA.

	Individuos con AGA	Individuos sin AGA	Total
Repetidos CAG (%)			
corto	33 (68.7%)	9 (56.2%)	42/64
largo	15 (31.3%)	7 (43.8%)	(65.6%)
Repetidos GGC (%)			
corto	35 (72.9%)	12 (75.0%)	47/64
largo	13 (27.1%)	4 (25.0%)	(73.4%)

Tabla 11. Frecuencia de los haplotipos CAG/GGC en 32 casos índices y 16 hermanos con AGA.

Haplotipo CAG/GGC	Casos y hermanos con AGA n (%)	Hermanos sin alopecia n (%)
Corto/corto	22 (45.8)	7 (43.8)
Corto/largo	10 (20.8)	3 (18.7)
Largo/corto	12 (25.0)	6 (37.5)
Largo/largo	4 (8.4)	0 (00.0)
Total	48 (100.0)	16(100.0)

Prueba de Kappa para concordancia libre de azar.

Con los 32 tríos se estimó el acuerdo total y libre de azar para la presencia de AGA entre los pares de hermanos y la concordancia en el número de repetidos CAG/GGC, el resultado de la concordancia haplotipo-fenotipo de acuerdo a las categorías previamente descritas (**tabla 12**), fue el siguiente: 1) Diez pares de hermanos concordantes para el haplotipo CAG/GGC y concordantes para AGA. 2) Cinco pares de hermanos concordantes para el haplotipo CAG/GGC y discordantes para AGA. 3) Cinco pares de hermanos discordantes para el haplotipo CAG/GGC y concordantes para AGA. 4) 12 pares de hermanos discordantes para el haplotipo CAG/GGC y discordantes para AGA.

ALOPECIA ANDROGENETICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

Tabla 12. Frecuencias de los haplotipos CAG/GGC en 32 casos índices y 16 hermanos con AGA.

		Alopecia androgenética	
		Concordancia (+)	Concordancia (-)
Haplotipo	Concordancia (+)	10 familias	5 familias
CAG/GGC	Concordancia (-)	5 familias	12 familias

Acuerdo observado: 68.8%, acuerdo esperado 50.2%, *kappa* ponderada libre de azar: 37.3%

Análisis de desequilibrio de transmisión

Los resultados del análisis de tríos (propósito, hermano y madre) no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la segregación preferencial para algún alelo de riesgo, ni al considerarse los marcadores en forma de multialelos (**tabla 13**) o al clasificarse como alelos cortos/largos, $p=0.30$ y 1.00 , respectivamente.

**ALOPECIA ANDROGENETICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL
NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS**

Tabla 13. Resultados de la prueba de asociación basada en familias (FBAT) para los marcadores CAG/GGC del gen RA, ligados al cromosoma X.

Marker	Allele	Freq.	IF, n	Z	p
CAGn	15	0.016	1	1.000	0.317
	16	0.026	2	-1.000	0.317
	17	0.016	1	-1.000	0.317
	18	0.021	1	1.414	0.157
	19	0.068	4	1.342	0.180
	20	0.156	10	-0.258	0.796
	21	0.172	10	1.000	0.317
	22	0.151	10	-0.243	0.808
	23	0.130	9	-0.277	0.782
	24	0.120	8	0.000	1
	25	0.094	6	-1.134	0.257
	27	0.031	2	-0.577	0.564
GGCn	15	0.016	1	0.000	1
	16	0.016	1	1.000	0.317
	17	0.714	14	-0.209	0.835
	18	0.255	12	0.000	1

CAGn: Número de repetidos CAG, GGCn: Número de repetidos

GGC, IF: Familias informativas.

DISCUSIÓN

Si bien se sabe desde hace más de un siglo que la AGA presenta cierta predisposición familiar, no se ha avanzado mucho en el conocimiento sobre posibles genes implicados en su etiología. El gen más estudiado al respecto es el gen *AR*, el cual es un gen que presenta en su estructura elementos de respuesta a andrógenos, así como múltiples interacciones que permiten hipotetizar que pueda regular las concentraciones de T y DHT en el FP (Kallio PJ et al. 1996; Ellis JA, 1998; Gobinet J et al. 2002; Inui S e Itami S, 2011). En el exón 1 del gen *AR* se encuentran dos repetidos de trinucleótidos muy polimórficos, el repetido CAG (poliglicina) y el GGC (poliglutamina) que han permitido analizar en diversos estudios el tamaño de estos repetidos con el riesgo de AGA (Ding D et al. 2004; Ellis JA y Harrap SB, 2001; Hillmer AM et al. 2005; Hillmer AM et al. 2008). La presente investigación permitió estudiar si la variación en el tamaño de los repetidos CAG y GGC en el gen *AR* se asocia con el riesgo de AGA, estudiando parejas de hermanos y analizando si existían cambios en la frecuencia con que se heredan estos haplotipos de riesgo a través de su madre.

Fenotipos de AGA

El fenotipo más frecuentemente observado fue la AGA tipo II, considerando los tipos II y IIa de la clasificación de Norwood-Hamilton. El fenotipo IV no fue observado en ninguno de los casos estudiados. Las frecuencias de estos fenotipos difieren de lo reportado en otros estudios en los que se observa un predominio de AGA tipo III (Salman KE et al. 2017; Paik JH et al. 2001). Sin embargo, ajustando por edad de inicio de AGA, el fenotipo observable en nuestra muestra es el mismo que en el estudio de Salman y cols. (2017). Aproximadamente un 20% de los individuos participantes con AGA presentaron AGA tipo I, frecuencia que es mayor a la reportada en otras series en las que el tipo I es

menor al 5%. Lo anterior se puede explicar por las edades de los participantes reclutados, cuya mediana de edad fue de 26 y 28 respectivamente para casos y hermanos con AGA.

Repetidos CAG y GGC

La frecuencia de heterocigosidad en las madres de los casos incluidos para el polimorfismo CAG del gen *RA* fue muy similar (82.9%) al reportado en población asiática (Karasawa M et al. 2001), en la que se reporta del 88.0% y superior a la reportada (76.5%) en mujeres con síndrome de Turner en Brasil (Figueiredo CC et al. 2008). Este porcentaje de heterocigosidad permite considerar al repetido CAG como un muy buen marcador genético para rasgos ligados al cromosoma X cercanos al gen *AR*.

El valor de la mediana para el número de repetidos CAG (21.5) y GGC (17) fueron las mismas que se han reportado en población española, africana, asiática, brasileña y caucásica (Irvine RA et al. 1995; Karasawa M et al. 2001; Suter NM et al. 2003; Silva-Neto B et al. 2008; Mehdipour P, 2011). La mediana más corta para el repetido CAG, de acuerdo con la literatura universal, es para la población mediterránea de la costa de Ivory, con una mediana de 19 (14-24) repetidos (Esteban E et al. 2006).

La frecuencia de alelos CAG cortos (categorizados al igual que en el presente trabajo) se ha reportado del 75%, 62% y 49% para poblaciones afro-americana, caucásica y asiática, respectivamente, tanto en población control como con cáncer de próstata (Irvine RA et al. 1995). La proporción de alelos CAG cortos en nuestra muestra fue del 65.6% (**Tabla 10**), más parecida a la de población caucásica.

Considerando el repetido GGC, observamos que más del 70% de los sujetos analizados mostraron un tamaño de 17 repetidos (**Figura 12**). En otras poblaciones los repetidos más frecuentemente observados son de 15 expansiones (22%) y de 16 expansiones (56.8%-70.3%) (Sawaya ME y Shalita AR, 1998; Goodarzi HR et al. 2012). La frecuencia de alelos GGC cortos en nuestra muestra total fue del 73.4% (**Tabla 10**),

ALOPECIA ANDROGENETICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

comparada con un 61%, 27% y 11% reportada para afro-americanos, caucásicos y asiáticos, respectivamente (Irvine RA et al. 1995).

CAG mostró alelos de 15 a 27 repetidos y GGC alelos de 15 a 18, diferente a otras 13 poblaciones en las cuales las repeticiones descritas van desde 10 a 31 para CAG y de 8 a 17 para GGC (Esteban E et al. 2006). Un trabajo en la literatura reporta un mismo número de alelos para CAG (Radpour R et al. 2007) en un grupo control de varones iraníes. En cuanto al repetido GGC, Esteban E y cols. (2006) establecen que las poblaciones de Grecia y un extracto de individuos de Sardinia tienen una variación de alelos muy reducida, de 2 y 3.

Consideramos que estas variaciones importantes en el tamaño de los repetidos pudieran estar explicadas en gran medida por diferencias inherentes a la raza. Un trabajo realizado por Kittles y cols. (2001), quienes analizaron los repetidos CAG/GGC en un grupo control y otro rasgo dependiente de andrógenos, el cáncer de próstata, presentó diferencias claras entre diferentes muestras poblacionales. El estudio incluyó varones del Oeste de África (n=520), Europeo-americanos (n=90), Chinos de Taiwán (n=60), nativos Americanos del sureste de Estados Unidos (n=103) y dos etnias africanas, Nigerianos (n=85) y el pueblo Mende de Sierra Leona (n=240). Los afroamericanos presentaron el mayor grado de diversidad para el marcador CAG y el grupo de Sierra Leona el mayor grado de diversidad para el alelo GGC. El repetido CAG mostró 11 alelos diferentes en la población Europea-Americana y 21 alelos diferentes para la población Afroamericana. Para GGC, el número de alelos fue de 4 para los Asiáticos y Europeo-Americanos y de 17 para la población Afroamericana. Para las poblaciones africanas el haplotipo CAG/GGC más común fue de 16/16 repetidos y en las poblaciones no africanas el haplotipo más común fue de 20/15 repetidos. En nuestra muestra identificamos 19 haplotipos CAG/GGC diferentes, el más frecuente fue el de 21/17 repetidos (17.18%), el cual es más similar al observado en el conjunto de poblaciones no africanas. Gilbert SM y cols. (2002) y Irvine RA y cols. (1995) demostraron desequilibrio de ligamiento entre los

repetidos CAG/GGC solo para población africana y lo atribuyen a las múltiples mezclas entre etnias diferentes (admixture) a los que se ha visto expuesta la población africana.

Concordancia entre tamaño de repetidos y AGA

No se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el número de individuos con alopecia y sin alopecia con respecto a la frecuencia de haplotipos cortos/largos (**Tabla 11**) y tampoco en el análisis de concordancia haplotipo-fenotipo, evaluado mediante la prueba de kappa libre de azar ($\kappa=0.373$) (**Tabla 12**). Tampoco hubo diferencias en la segregación de los haplotipos al analizarse los tríos (**Tabla 13**), utilizando la prueba de TDT (F-BAT) para marcadores ligados al cromosoma X. Aunque la inclusión de casos fue consecutiva y no se seleccionó por gravedad del fenotipo de la AGA, no podemos descartar un exceso del haplotipo de riesgo (CAG corto/GGC corto) en los casos sin AGA, por simple azar. Por otro lado, la mediana de edad de los participantes fue menor a la reportada en otros estudios y esto pudiera haber afectado la frecuencia de fenotipos de AGA mayor a II en los que probablemente hubiera un mayor número de haplotipos de riesgo. No tenemos certeza de que los individuos de mayor edad, con un fenotipo de AGA más grave, hubieran mostrado las mismas variaciones en el tamaño de los repetidos.

Una ventaja del presente estudio es que analiza ambos repetidos en conjunto, existe un mayor número de reportes para las variaciones en el tamaño de CAG comparado con GGC y pocos son los estudios que involucran al haplotipo en relación con AGA.

Otras regiones cromosómicas o genes implicados en AGA

Al menos otros dos loci se han reportado asociados con la presencia de AGA, 3q26 (MIM# 109200) y 20p11.22 (MIM#612421), referidos como alopecia androgenética tipos II y III respectivamente. Hillmer y cols. (2008a) utilizando la estrategia de genomewide linkage study (GWAS) en 95 familias con AGA y ampliando el análisis con mapeo a fina

ALOPECIA ANDROGENETICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

escala en una muestra de 125 familias alemanas, encontraron presencia de ligamiento con la región 3q26. Sin embargo, no se ha observado confirmación en otras poblaciones. En ese mismo año, Hillmer y cols. (2008b) estudiaron 1,437 varones con alopecia y 1,338 controles, observando que el 14% de los varones portaba al menos un alelo de riesgo tanto en el gen *AR* como en 20p11.22, asociándolo con riesgo para AGA, OR: 7.12, $p=3.7 \times 10^{-15}$.

Brockschmidt y cols. (2011) analizaron una muestra de 581 alemanes con AGA avanzada y 617 controles, también utilizando un estudio de GWAS, identificaron un locus asociado que confirmaron con otro estudio independiente ahora en una muestra de alopécicos de origen australiano. La variante genética que más aportó riesgo para AGA fue *rs756853*, $p=1.64 \times 10^{-7}$. Este SNP se localiza intrónicamente en el gen de la desacetilasa 9 de histona (*HDAC9*), el cual interactúa en la vía de señalización del gen *AR*. Analizando la expresión de este gen se detectó su presencia en todos los tejidos analizados ($n=20$), mostrando una máxima expresión en tejido muscular, además de expresarse en folículos pilosos, piel y cuero cabelludo. Los autores sugieren que *HDAC9* es otro gen candidato para la lista de genes que participan en AGA.

Goodarzi y cols. (2012) reportaron la sobre-regulación de microRNAs en papilas dérmicas de sujetos alopécicos en comparación con sus controles, entre estos microRNAs se encuentran: miR-221, miR-125b, miR106b y miR-410, sugiriendo una posible contribución a la etiopatogenia de la AGA. En este mismo sentido, Hochfeld y cols. (2018) también demostraron que al menos son 143 genes los expresados diferencialmente entre células de la región frontal y la región occipital. El estudio distinguió 7 regiones genómicas candidatas para AGA, 6 de las cuales no habían sido identificadas previamente. La región ya mencionada por Heilmann-Heimbach et al. (2017), en 3q22.2, incluye al gen *EPHB1*, un ligando del receptor de estrógenos.

Cobb y cols. (2011) postularon que podría haber una metilación diferente de islas CpG en los FP de la región occipital comparada con los FP del vértex del cuero cabelludo.

ALOPECIA ANDROGENETICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

Para probar su hipótesis estudiaron muestras de cuero cabelludo de 24 varones con AGA correspondiente a los tipos III-VI. Comparando los patrones de metilación del gen AR en la vaina epitelial externa de la raíz del FP de ambas regiones, observaron que la metilación de los FP en el vértex fue $> 80\%$ comparado con el 1.7% de metilación en los FP del área occipital. Así mismo, identificaron que un porcentaje de metilación alto ($\geq 30\%$) fue más frecuentemente observado (5.7%) en los FP de la región occipital que en los del vértex (0.3%), $p > 0.0001$. Sus resultados sugieren que es posible que la metilación incrementada del AR proteja a los FP occipitales del proceso de MNA y pérdida de cabello.

Otros factores de riesgo explorados en AGA

Independientemente de los genes relacionados a la AGA, el estudio de la interacción gen-ambiente y de factores no genéticos ha recibido poca atención. Algunos de los factores estudiados tienen que ver con el estilo de vida, el tipo de deporte practicado y exposiciones ambientales adversas -exposición fotosolar en exceso, uso de gorras, empleo de productos estéticos para el cabello y secadora de pelo, entre otros- (Su LH y Chen HH, 2011; Gatherwright J et al. 2013; Wang TL et al. 2010).

El tabaquismo asociado a un índice de masa corporal ≥ 25 ha mostrado ser un importante factor de riesgo para AGA, RM: 6.72 (2.57-17-60) (Fortes C et al. 2017). En contraste, el consumo de café parece promover el crecimiento del FP, al menos en estudios in vitro (Fischer TW et al. 2007). Actualmente se emplea como un auxiliar cosmético para el tratamiento de la AGA (Bansal M et al. 2012; Dressler C et al. 2017).

Fortes C y cols. (2018) para evaluar si la dieta mediterránea, rica en hierbas y verduras frescas, determina en alguna medida el riesgo para AGA, llevaron a cabo un estudio de casos ($n=104$) y controles ($n=108$). Al ajustar por edad, educación, índice de masa corporal e historia familiar, observaron que el consumo de vegetales crudos igual o

más de 3 veces por semana y el consumo de hierbas frescas fueron factores de protección para AGA, RM: 0.43 (0.21-0.89) y RM: 0.44 (0.22-0.87), respectivamente.

Además de los ya señalados, diversos estudios de asociación han explorado la relación entre AGA y enfermedad cardiovascular (Cotton SG et al. 1972), resistencia a la insulina (Matilainen V et al. 2003), hipertensión (Ahouansou S et al. 2007), perfil de lípidos alterado (Sadighha A et al. 2009), obesidad (Hirsso P et al. 2007), índice de masa corporal (Su LH y Chen TH, 2010) y síndrome metabólico (Ertas R et al. 2016; Lie C et al. 2018). Los resultados si bien no han sido consistentes en todas las poblaciones, ha promovido la inclusión de estos otros factores en el abordaje de la AGA.

Con lo mencionado anteriormente, consideramos que otra limitante en nuestro estudio es el no haber evaluado de manera concomitante con los haplotipos CAG/GGC, los factores de riesgo descritos para AGA: niveles séricos de hormonas esteroideas, hábitos alimentarios, ocupación, nivel socioeconómico, clima de la ciudad donde viven los sujetos, grado de estrés y las comorbilidades ya mencionadas.

Nuevos descubrimientos en AGA

Recientemente, Stamatias GN y cols. (2017), identificaron variaciones en la expresión de genes y vías de señalización alteradas al comparar biopsias de cuero cabelludo de pacientes con AGA antes y después del tratamiento con minoxidil al 5%. El estudio se basó en el empleo de iPANDA (análisis de descomposición de redes de vías de activación –Pathway Activation Network Decomposition Analysis-) *in silico*. Los resultados mostraron que ambas regiones muestran una sobre-regulación de genes de proteínas asociadas a la queratina. Fueron 29 los transcritos desregulados en el cuero cabelludo de la región del vértex y 39 en la región frontal. Así mismo, se evidenció una regulación a la baja de las vías de señalización de ILK, Akt y MAPK después del tratamiento. Lo anterior sugiere que el control de la inflamación en conjunto con la estimulación de la queratina pudiera mejorar el crecimiento del cabello en esta entidad.

Otra vía de señalización novedosa que comienza a estudiarse en la AGA es la vía de Wnt, cuyas señales se encuentran generalmente activas en todas las células y participan en el desarrollo temprano, el crecimiento y el mantenimiento de muchos tejidos. Esta vía tiene algunas propiedades únicas como son un periodo de acción corto y el predominio de la mediación de señales locales entre células adyacentes (vecinas). La actividad de Wnt/ β -catenina en las papilas dérmicas del cuero cabelludo con alopecia se encuentra desregulada posiblemente por mediación de los andrógenos, lo que daría lugar a la pérdida de cabello (Premanand A y Rajkumari BR, 2018). Los autores sugieren que modulando la transactivación del AR y estabilizando la vía ya señalada podría curar, revertir y prevenir la pérdida de cabello en AGA con efectos indeseables mínimos.

En una última revisión realizada previo a la culminación de esta tesis, Pirastu N y cols. (2018) realizaron un estudio de GWAS con la finalidad de descifrar la arquitectura genética de la AGA. Los autores encontraron 71 loci asociados significativamente, 30 de los cuales no se habían descrito previamente. Los loci mencionados contribuían con el 38% de la heredabilidad total de la AGA, los SNP's en cuestión explicaban el 32% de la contribución por autosomas y el 12% de la contribución por el cromosoma X. Este estudio además de incrementar el número de loci asociados a la AGA, provee información suficiente para considerar que la AGA es uno de los rasgos complejos más heredables.

Nuevas hipótesis

Recientemente, English RS Jr. (2018) propone un modelo de patogénesis de AGA basado en la relación causal entre la DHT y la AGA. Su hipótesis propone que 1) La tensión a la que se somete el cuero cabelludo de la gálea aponeurótica, de forma crónica, induce una respuesta inflamatoria en tejidos predispuestos a AGA. 2) La DHT incrementa en esos tejidos pronos a la alopecia como parte de su respuesta inflamatoria y 3) La DHT no miniaturiza de manera directa al FP. Actúa como mediador del

engrosamiento del tejido dérmico, de la fibrosis perifolicular y de la calcificación. Estas tres condiciones remodelan los tejidos propensos a alopecia, restringiendo el espacio de crecimiento del FP, la oxigenación del mismo y el suministro de nutrientes. En consecuencia, se da una MNA lenta y persistente, característica de la AGA.

Propuestas futuras al trabajo de investigación

La ausencia de una asociación entre los haplotipos CAG/GGC del gen *AR* y la AGA en nuestra muestra no descarta la posibilidad de una contribución, aunque sea menor, en su desarrollo. El estudio de los genes candidatos reportados previamente en los estudios de GWAS debería de ser reproducido en otras poblaciones para poder mostrar consistencia en los hallazgos. Además, se propone el empleo de otras estrategias de análisis de este rasgo: 1) El estudio de exoma completo en familias bien seleccionadas en los que la AGA segregue de forma tal que sugiera un modo de herencia mendeliano (autosómico dominante, autosómico recesivo o ligado al X) para poder identificar genes relacionados que aún no se han identificado. A nuestro entendimiento, revisando en la literatura médica, no existe un estudio de exoma realizado en AGA excepto en alopecia universalis (Lee S et al. 2013). 2) Análisis diferencial de transcriptoma en FP de las regiones occipital y del vértex de sujetos con y sin AGA categorizadas por edades, con la finalidad de poder conocer más sobre las proteínas implicadas y si existe alguna expresión temporal de los transcritos en cuestión que pudieran detonar el inicio de AGA. 3) Comparación en la expresión de miRNAs comparando cuero cabelludo de adultos con AGA y cuero cabelludo de niños sometidos a biopsia de cuero cabelludo para identificar posibles diferencias en la expresión temporal de estas moléculas. 4) Estudio de vías de señalización en células de FP expuestas a diferentes sustancias en modelos animales para AGA, actualmente el ratón transgénico queratina5-AR humano (Crabtree JS et al. 2013) expuesto a altos niveles de DHT mimetiza los efectos del AGA en cuero cabelludo.

ALOPECIA ANDROGENETICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

Finalmente, los resultados aquí mostrados permitieron contestar las tres hipótesis planteadas en el presente trabajo: 1) No existe una concordancia más allá que la esperada por el azar entre el número de repetidos CAG/GGC del RA y la presencia de AGA en pares de hermanos. 2) El haplotipo de alelos cortos/cortos de CAG/GGC no es un factor de riesgo para AGA. 3) No fue posible demostrar una posible segregación preferencial de los alelos cortos/cortos de CAG/GGC en sujetos con AGA.

Nuestros resultados apoyan que la AGA no es resultado de variantes genéticas en un solo gen, sugiriendo que el fenotipo de AGA es de etiología multifactorial resultado de la interacción una determinada predisposición genética y factores ambientales diversos. Posiblemente las variantes en el gen del receptor de andrógenos en interacción con otro(s) gen(es) con efecto epistático aditivo pudiesen explicar en parte importante la presentación de la AGA.

CONCLUSIONES

- La frecuencia de los tipos I y II de AGA en la muestra estudiada es mayor a la observada en otras series.
- La mediana de repetidos CAG y GGC en la muestra estudiada es similar a la reportada previamente en población africana, asiática y caucásica.
- El número de repetidos CAG/GGC fue menos polimórfico comparado con otras poblaciones analizadas, sobre todo para el alelo GGC para el que sólo encontramos 4 variantes genéticas.
- La concordancia libre de azar para el número de repetidos CAG/GGC y AGA en los pares de hermanos fue menor a la esperada por el azar ($kappa=0.373$).
- El repetido CAG resultó ser un buen marcador genético para el estudio de la segregación del cromosoma X materno en AGA.
- El presente estudio es uno de los pocos en la literatura que analiza haplotipos del gen *AR* en relación a la presencia de AGA, mostrando que para nuestra muestra de familia no existe dicha asociación.
- Nuestros hallazgos sugieren que la AGA no es resultado de variaciones en un solo gen (*AR*).
- De acuerdo con estudios recientes, la AGA tiene una heredabilidad del 38% con más de 71 loci asociados de manera estadísticamente significativa y no se descarta que la AGA sea resultado del efecto epistático en genes ligado al cromosoma X o en interacción con otros genes autosómicos.

Referencias Bibliográficas

- 1) Ahouansou S, Le Toumelin P, Crickx B, Descamps V. Association of androgenetic alopecia and hypertension. *Eur J Dermatol* 2007; 17(3):220-2.
- 2) Bansal M, Manchanda K, Pandey SS. Role of caffeine in the management of androgenetic alopecia. *Int J Trichology* 2012; 4(3):185-6.
- 3) Beilin J, Ball EM, Favaloro JM, Zajac JD. Effect of the androgen receptor CAG repeat polymorphism on transcriptional activity: specificity in prostate and non-prostate cell lines. *J Mol Endocrinol.* 2000 Aug;25(1):85-96.
- 4) Birch MP, Messenger AG. Genetic factors predispose to balding and non-balding in men. *Eur J Dermatol* 2001; 11:309-314.
- 5) Brockschmidt FF, Heilmann S, Ellis JA, Eigelshoven S, Hanneken S, Herold C, Moebus S, Alblas MA, Lippke B, Kluck N, Priebe L, Degenhardt FA, Jamra RA, Meesters C, Jöckel KH, Erbel R, Harrap S, Schumacher J, Fröhlich H, Kruse R, Hillmer AM, Becker T, Nöthen MM. Susceptibility variants on chromosome 7p21.1 suggest HDAC9 as a new candidate gene for male-pattern baldness. *Br J Dermatol.* 2011; 165(6):1293-302.
- 6) Chamberlain NL, Driver ED and Miesfeld RL. The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic Acids Res* 1994; 22:3181-3186.
- 7) Chang BL, Zheng SL, Hawkins GA, Isaacs SD, Wiley KE, Turner A, Carpten JD, Bleecker ER, Walsh PC, Trent JM, Meyers DA, Isaacs WB and Xu J. Polymorphic GGC repeats in the androgen receptor gene are associated with hereditary and sporadic prostate cancer risk. *Hum Genet* 2002; 110,122-129.
- 8) Choong CS, Kempainen JA, Zhou ZX, Wilson EM. Reduced androgen receptor gene expression with first exon CAG repeat expansion. *Mol Endocrinol.* 1996 Dec;10(12):1527-35.
- 9) Chumlea WC, Rhodes T, Girman CJ, Johnson-Levonas A, Lilly FR, Wu R, Guo SS. Family history and risk of hair loss. *Dermatology* 2004; 209:33-9.
- 10) Cobb JE, White SJ, Harrap SB, Ellis JA. Androgen receptor copy number variation and androgenetic alopecia: a case-control study. *PLoS One.* 2009; 4(4):e5081.
- 11) Cobb JE, Wong NC, Yip LW, Martinick J, Bosnich R, Sinclair RD, Craig JM, Saffery R, Harrap SB, Ellis JA. Evidence of increased DNA methylation of the androgen receptor gene in occipital hair follicles from men with androgenetic alopecia. *British J Dermatol* 2011; 165(1):210-3.
- 12) Cobb JE, Zaloumis SG, Scurrah KJ, Harrap SB, Ellis JA. Evidence for two independent functional variants for androgenetic alopecia around the androgen receptor gene. *Exp Dermatol.* 2010; 19(11):1026-8.

ALOPECIA ANDROGENETICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

- 13) Cortes CJ, La Spada AR. X-Linked Spinal and Bulbar Muscular Atrophy: From Clinical Genetic Features and Molecular Pathology to Mechanisms Underlying Disease Toxicity. *Adv Exp Med Biol* 2018; 1049:103-133.
- 14) Cotton SG, Nixon JM, Carpenter RG, Evans DW. Factors discriminating men with coronary heart disease from healthy controls. *Br Heart J* 1972; 34(5):458-64.
- 15) Crabtree JS, Kilbourne EJ, Peano BJ, Chippari S, Kenney T, McNally C, Wang W, Harris HA, Winneker RC, Nagpal S, Thompson CC. A mouse model of androgenetic alopecia. *Endocrinology* 2010; 151(5):2373-80.
- 16) Cranwell W, Sinclair R. Male Androgenetic Alopecia. [Updated 2016 Feb 29]. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, et al., editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278957/>
- 17) Davis-Dao CA, Tuazon ED, Sokol RZ, Cortessis VK. Male infertility and variation in CAG repeat length in the androgen receptor gene: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Nov;92(11):4319-26. Epub 2007 Aug 7.
- 18) Ding D, Xu L, Menon M, Reddy GP, Barrack ER. Effect of a short CAG (glutamine repeat) on human androgen receptor function. *Prostate* 2004; 58:23-32.
- 19) Ding D, Xu L, Menon M, Reddy GP, Barrack ER. Effect of GGC (glycine) repeat length polymorphism in the human androgen receptor on androgen action. *Prostate.* 2005 Feb 1;62(2):133-9.
- 20) Donovan J, Goldstein BG, Goldstein AO. Androgenetic alopecia in men: Pathogenesis, clinical features, and diagnosis. 2018. Up to date®. www.uptodate.com.
- 21) Dressler C, Blumeyer A, Rosumeck S, Arayesh A, Nast A. Efficacy of topical caffeine in male androgenetic alopecia. *J Dtsch Dermatol Ges* 2017; 15(7):734-741.
- 22) Eisermann K, Wang D, Jing Y, Pascal LE, Wang Z. Androgen receptor gene mutation, rearrangement, polymorphism. *Transl Androl Urol* 2013; 2(3):137-147.
- 23) Ellis JA, Harrap SB. The genetics of androgenetic alopecia. *Clin Dermatol* 2001; 19:150-4.
- 24) Ellis JA, Scurrah KJ, Cobb JE, Zaloumis SG, Duncan AE, Harrap SB. Baldness and the androgen receptor: the AR polyglycine repeat polymorphism does not confer susceptibility to androgenetic alopecia. *Hum Genet.* 2007;121(3-4):451-7.
- 25) Ellis JA, Sinclair R, Harrap SB. Androgenetic alopecia: pathogenesis and potential for therapy. *Expert Rev Mol Med.* 2002, 4:1-11.
- 26) Ellis JA, Stebbing M, Harrap B. Polymorphism of the androgen receptor gene is associated with male pattern baldness. *J Invest Dermatol* 2001; 116:452-5.
- 27) Ellis JA, Stebbing M, Harrap SB. Genetic analysis of male pattern baldness and the 5 α -Reductase genes. *J Invest Dermatol* 1998; 110:849-53.

ALOPECIA ANDROGENETICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

- 28) English RS Jr. A hypothetical pathogenesis model for androgenic alopecia: clarifying the dihydrotestosterone paradox and rate-limiting recovery factors. *Med Hypotheses* 2018; 111:73-81.
- 29) Ertas R, Orscelik O, Kartal D, Dogan A, Ertas SK, Aydogdu EG, Ascioğlu O, Borlu M. Androgenetic alopecia as an indicator of metabolic syndrome and cardiovascular risk. *Blood Press* 2016; 25(3):141-8.
- 30) Esteban E, Rodon N, Via M, Gonzalez-Perez E, Santamaria J, Dugoujon JM, Chennawi FE, Melhaoui M, Cherkaoui M, Vona G, Harich N, Moral P. Androgen receptor CAG and GGC polymorphisms in Mediterraneans: repeat dynamics and population relationships. *J Hum Genet.* 2006; 51(2):129-36.
- 31) Feinstein R. Androgenetic alopecia. 2005. <http://www.emedicine.com/derm/topic21.htm>
- 32) Ferlin A, Bartoloni L, Rizzo G, Roverato A, Garolla A, Foresta C. Androgen receptor gene CAG and GGC repeat lengths in idiopathic male infertility. *Mol Hum Reprod.* 2004 Jun;10(6):417-21. Epub 2004 Mar 25.
- 33) Figueiredo CC, Kochi C, Longui CA, Rocha MN, Richeti F, Evangelista NM, Calliari LE, Monte O. Size of the exon 1-CAG repeats of the androgen receptor gene employed as a molecular marker in the diagnosis of Turner syndrome in girls with short stature. *Genet Mol Res.* 2008 Jan 22;7(1):43-9.
- 34) Finasteride Male Pattern Hair Loss Study Group. Long term (5-year) multinational experience with finasteride 1 mg in the treatment of men with androgenetic alopecia. *Eur J Dermatol* 2002; 12(1):38-49.
- 35) Finsterer J. Bulbar and spinal muscular atrophy (Kennedy's disease): a review. *Eur J Neurol* 2009; 16(5):556-61.
- 36) Fischer TW, Hipler UC, Elsner P. Effect of caffeine and testosterone on the proliferation of human hair follicles in vitro. *Int J Dermatol* 2007; 46(1):27-35.
- 37) Fortes C, Mastroeni S, Mannooranparampil T, Abeni D, Panebianco A3. Mediterranean diet: fresh herbs and fresh vegetables decrease the risk of Androgenetic Alopecia in males. *Arch Dermatol Res* 2018; 310(1):71-76.
- 38) Fortes C, Mastroeni S, Mannooranparampil TJ, Ribuffo M. The combination of overweight and smoking increases the severity of androgenetic alopecia. *Int J Dermatol* 2017; 56(8):862-867.
- 39) Francomano D, Greco EA, Lenzi A, Aversa A. CAG repeat testing of androgen receptor polymorphism: is this necessary for the best clinical management of hypogonadism? *J Sex Med.* 2013 Oct;10(10):2373-81. doi: 10.1111/jsm.12268. Epub 2013 Jul 11.
- 40) Garton RA, McMichael AJ, Sugarman J, Greer K, Setaluri V. Association of a polymorphism in the ornithine decarboxylase gene with male androgenetic alopecia. *J Am Acad Dermatol* 2005; letter 535-6.

ALOPECIA ANDROGENETICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

- 41) Gatherwright J, Liu MT, Amirlak B, Gliniak C, Totonchi A, Guyuron B. The contribution of endogenous and exogenous factors to male alopecia: a study of identical twins. *Plast Reconstr Surg* 2013; 131(5):794e-801e.
- 42) Gelmann EP. Molecular Biology of the Androgen Receptor. *J Clin Oncol* 2002; 20:3001-3015.
- 43) Gilbert SM, Benson MC, McKiernan JM. Linkage disequilibrium between the androgen receptor gene CAG and GGC repeats in the African-American population. *Curr Urol Rep* 2002; 3(3):189-93.
- 44) Gobinet J, Poujol N, Sultan Ch. Molecular action of androgens. *Mol Cell Endocrinol*. 2002 Dec 30;198(1-2):15-24.
- 45) Goodarzi HR, Abbasi A, Saffari M, Fazelzadeh Haghighi M, Tabei MB, Noori Dalooi MR. Differential expression analysis of balding and nonbalding dermal papilla microRNAs in male pattern baldness with a microRNA amplification profiling method. *Br J Dermatol* 2012; 166(5):1010-6.
- 46) Gottlieb B, Beitel LK, Nadarajah A, Paliouras M, Trifiro M. The androgen receptor gene mutations database: 2012 update. *Hum Mutat*. 2012;33(5):887-94.
- 47) Griffin JE, Wilson JD. The androgen resistance syndromes: 5 α -reductasa deficiency, testicular feminization, and related disorders in Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al. *The Metabolic Bases of Inherited Diseases* 1989; Vol 2. 6th ed. McGraw Hill.
- 48) Hamilton JB. Patterned loss of hair in man; types and incidence. *Ann N Y Acad. Sci* 1951; 53:708-728.
- 49) Hillmer AM, Brockschmidt FF, Hanneken S, Eigelshoven S, Steffens M, Flaquer A, Herms S, Becker T, Kortüm AK, Nyholt DR, Zhao ZZ, Montgomery GW, Martin NG, Mühleisen TW, Alblas MA, Moebus S, Jöckel KH, Bröcker-Preuss M, Erbel R, Reinartz R, Betz RC, Cichon S, Propping P, Baur MP, Wienker TF, Kruse R, Nöthen MM. Susceptibility variants for male-pattern baldness on chromosome 20p11. *Nat Genet* 2008a; 40(11):1279-81.
- 50) Hillmer AM, Flaquer A, Hanneken S, Eigelshoven S, Kortüm AK, Brockschmidt FF, Golla A, Metzen C, Thiele H, Kolberg S, Reinartz R, Betz RC, Ruzicka T, Hennies HC, Kruse R, Nöthen MM. Genome-wide scan and fine-mapping linkage study of androgenetic alopecia reveals a locus on chromosome 3q26. *Am J Hum Genet* 2008b; 82(3):737-43.
- 51) Hillmer AM, Hanneken S, Ritzmann S, Becker T, Freudenberg J, Brockschmidt F, Flaquer A, Freudenberg-Hua Y, Jamra RA, Metzen C, Heyn U, Schweiger N, Betz RC, Blaumeiser B, Hampe J, Schreiber S, Schulze TG, Hennies HC, Schumacher J, Propping P, Ruzicka T, Cichon S, Wienker TF, Kruse R, and Nothen M. Genetic Variation in the Human Androgen Receptor Gene Is the Major Determinant of Common Early-Onset Androgenetic Alopecia. *Am J Hum Genet* 2005; 77:140–8.
- 52) Hirsso P, Rajala U, Hiltunen L, Jokelainen J, Keinänen-Kiukaanniemi S, Näyhä S. Obesity and low-grade inflammation among young Finnish men with early-onset alopecia. *Dermatology* 2007; 214(2):125-9.

ALOPECIA ANDROGENETICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

- 53) Hochfeld LM, Keller A, Anhalt T, Fricker N; Meta-analysis for Androgenetic Alopecia Novel determinants (MAAN) Consortium, Nöthen MM, Heilmann-Heimbach S. Insights into Male Androgenetic Alopecia: Differential Gene Expression Profiling of Plucked Hair Follicles and Integration with Genetic Data. *J Invest Dermatol* 2018; pii: S0022-202X(18)32322-4.
- 54) Hoffmann R, Happle R. Current understanding of androgenetic alopecia. Part I: etiopathogenesis. *Eur J Dermatol* 2000; 10 (4):319-27.
- 55) Horvath S, Laird NM, Knapp M. The transmission/disequilibrium test and parental-genotype reconstruction for X-chromosomal markers. *Am J Hum Genet.* 2000; 66(3):1161-7.
- 56) Inui S, Itami S. Molecular basis of androgenetic alopecia: From androgen to paracrine mediators through dermal papilla. *J Dermatol Sci* 2011; 61(1):1-6.
- 57) Irvine RA, Yu MC, Ross RK, Coetzee GA. The CAG and GGC microsatellites of the androgen receptor gene are in linkage disequilibrium in men with prostate cancer. *Cancer Res* 1995; 55(9):1937-40.
- 58) Ishino A, Uzuka M, Tsuji Y, Nakanishi J, Hanzawa N, Imamura S. Progressive decrease in hair diameter in Japanese with male pattern baldness. *J Dermatol* 1997; 24:758-764
- 59) Jorde LB, Carey JC, Bamshad MJ, White RL. Capítulo 12. Herencia multifactorial y enfermedades frecuentes. En: *Genética Médica, tercera edición, 2005.* Editorial MOSBY. Elsevier.
- 60) Jugessur A, Skare Ø, Lie RT, Wilcox AJ, Christensen K, Christiansen L, Nguyen TT, Murray JC, Gjessing HK. X-linked genes and risk of orofacial clefts: evidence from two population-based studies in Scandinavia. *PLoS One.* 2012; 7(6): e39240.
- 61) Kallio PJ, Pakvimo JJ, Janne OA. Genetic regulation of androgen action. *Prostate Suppl.* 1996; 6:45-51.
- 62) Karasawa M, Tsukamoto N, Yamane A, Okamoto K, Maehara T, Yokohama A, Nojima Y, Omine M. Analysis of the distribution of CAG repeats and X-chromosome inactivation status of HUMARA gene in healthy female subjects using improved fluorescence-based assay. *Int J Hematol* 2001; 74(3):281-6.
- 63) Kaufman KD, Olsen EA, Whiting D, Savin R, DeVillez R, Bergfeld W, Price VH, Van Neste D, Roberts JL, Hordinsky M, Shapiro J, Binkowitz B, Gormley GJ. Finasteride in the treatment of men with androgenetic alopecia. Finasteride Male Pattern Hair Loss Study Group. *J Am Acad Dermatol* 1998; 39(4):578-89.
- 64) Kaufman KD. Androgens and alopecia. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 198: 89-95.
- 65) Kittles RA, Young D, Weinrich S, Hudson J, Argyropoulos G, Ukoli F, Adams-Campbell L, Dunston GM. Extent of linkage disequilibrium between the androgen receptor gene CAG and GGC repeats in human populations: implications for prostate cancer risk. *Hum Genet* 2001; 109(3):253-61.

ALOPECIA ANDROGENETICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

- 66) Koyama T, Kobayashi K, Wakisaka N, Hirayama N, Konishi S, Hama T, Takeda K, Nakamizo Y, Kawakami M. Eleven pairs of Japanese male twins suggest the role of epigenetic differences in androgenetic alopecia. *Eur J Dermatol*. 2013;23(1):113-5.
- 67) Kuster W, Happle R. The inheritance of baldness: two B or not to B? *J Am Acad Dermatol* 1984; 11:921-26.
- 68) Laird NM, Horvath S, Xu X. Implementing a unified approach to family-based tests of association. *Genet Epidemiol*. 2000; 19 Suppl 1: S36-42.
- 69) Lee S, Paik SH, Kim HJ, Ryu HH, Cha S, Jo SJ, Eun HC, Seo JS, Kim JI, Kwon OS. Exomic sequencing of immune-related genes reveals novel candidate variants associated with alopecia universalis. *PLoS One* 2013; 8(1): e53613.
- 70) Lee WS, Lee HJ. Characteristics of androgenetic alopecia in asian. *Ann Dermatol* 2012; 24(3):243-52.
- 71) Lie C, Liew CF, Oon HH. Alopecia and the metabolic syndrome. *Clin Dermatol* 2018; 36(1):54-61.
- 72) Matilainen V, Laakso M, Hirsso P, Koskela P, Rajala U, Keinänen-Kiukaanniemi S. Hair loss, insulin resistance, and heredity in middle-aged women. A population-based study. *J Cardiovasc Risk* 2003; 10(3):227-31.
- 73) Mehdipour P, Pirouzpanah S, Kheirollahi M, Atri M. Androgen receptor gene CAG repeat polymorphism and breast cancer risk in Iranian women: a case-control study. *Breast J*. 2011; 17(1):39-46.
- 74) Mongan NP, Tadokoro-Cuccaro R, Bunch T, Hughes IA. Androgen insensitivity syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2015; 29(4):569-80.
- 75) Nyholt DR, Gillespie NA, Heath AC, Martin NG. Genetic basis of male pattern baldness. *J Invest Dermatol*. 2003;121(6):1561-4.
- 76) Olsen EA, Messenger AG, Shapiro J, et al. Evaluation and treatment of male and female pattern hair loss. *J Am Acad Dermatol* 2005; 52:301-311.
- 77) Otberg N, Finner AM, Shapiro J. Androgenetic alopecia. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2007;36(2):379-98.
- 78) Paik JH, Yoon JB, Sim WY. The prevalence and types of androgenetic alopecia in Korean men and women. *Br J Dermatol* 2001; 145:95-99.
- 79) Pirastu N, Joshi PK, de Vries PS, Cornelis MC, McKeigue PM, Keum N, Franceschini N, Colombo M, Giovannucci EL, Spiliopoulou A, Franke L, North KE, Kraft P, Morrison AC, Esko T, Wilson JF. GWAS for male-pattern baldness identifies 71 susceptibility loci explaining 38% of the risk. *Nat Commun* 2017; 8(1):1584.
- 80) Pirastu N, Joshi PK, de Vries PS, Cornelis MC, McKeigue PM, Keum N, Franceschini N, Colombo M, Giovannucci EL, Spiliopoulou A, Franke L, North KE, Kraft P, Morrison AC, Esko T, Wilson JF. **Author Correction:** GWAS for male-pattern baldness identifies 71 susceptibility loci explaining 38% of the risk. *Nat Commun* 2018; 9(1):2536.

ALOPECIA ANDROGENETICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

- 81) Premanand A, Reena Rajkumari B. Androgen modulation of Wnt/ β -catenin signaling in androgenetic alopecia. *Arch Dermatol Res* 2018; 310(5):391-399.
- 82) Price VH, Menefee E, Sanchez M. Changes in hair weight and hair count in men with androgenetic alopecia after treatment with finasteride, 1 mg, daily. *J Am Acad Dermatol* 2002; 46(4):517-23.
- 83) Price VH. Treatment of hair loss. *N Engl J Med* 1999; 23:341 (13):964-73.
- 84) Prieto VG, Sadick NS, Shea CR. Androgenetic alopecia: Analysis of proliferation and apoptosis. *Arch Dermatol* 2002; 138(8):1101-2
- 85) Prodi DA, Pirastu N, Maninchedda G, Sassu A, Picciau A, Palmas MA, Mossa A, Persico I, Adamo M, Angius A, Pirastu M. EDA2R is associated with androgenetic alopecia. *J Invest Dermatol*. 2008; 128(9):2268-70.
- 86) Querin G, Sorarù G, Pradat PF. Kennedy disease (X-linked recessive bulbospinal neuronopathy): A comprehensive review from pathophysiology to therapy. *Rev Neurol (Paris)* 2017; 173(5):326-337.
- 87) Radpour R, Rezaee M, Tavasoly A, Solati S, Saleki A. Association of long polyglycine tracts (GGN repeats) in exon 1 of the androgen receptor gene with cryptorchidism and penile hypospadias in Iranian patients. *J Androl* 2007; 28(1):164-9.
- 88) Rajender S, Singh L, Thangaraj K. Phenotypic heterogeneity of mutations in androgen receptor gene. *Asian J Androl* 2007; 9 (2): 147–179.
- 89) Randall VA. The use of dermal papilla cells in studies of normal and abnormal hair follicle biology. *Dermatol Clin* 1996; 14:585-94.
- 90) Rhodes T, Girman CJ, Savin RC. Prevalence of male pattern hair loss in 18-49 year old men. *Dermatol Surg* 1988; 24 (12):1330-2.
- 91) Sadighha A, Zahed GM. Evaluation of lipid levels in androgenetic alopecia in comparison with control group. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009; 23(1):80-1.
- 92) Salman KE, Altunay IK, Kucukunal NA, Cerman AA. Frequency, severity and related factors of androgenetic alopecia in dermatology outpatient clinic: hospital-based cross-sectional study in Turkey. *An Bras Dermatol* 2017; 92(1):35-40.
- 93) Sawaya ME, Price VH. Different levels of 5 alpha-reductase type I and II, aromatase, and androgen receptor in hair follicles of women and men with androgenetic alopecia. *J Invest Dermatol* 1997; 109:296-300.
- 94) Sawaya ME, Shalita AR. Androgen receptor polymorphisms (CAG repeat lengths) in androgenetic alopecia, hirsutism, and acne. *J Cutan Med Surg*. 1998; 3(1):9-15.
- 95) Setty LR. Hair patterns of the scalp of white and negro males. *Am J phy Anthropol* 1970; 33:49-55 (Abstract).
- 96) Silva Neto B, Koff WJ, Biolchi V, Brenner C, Biolo KD, Spritzer PM, Brum IS. Polymorphic CAG and GGC repeat lengths in the androgen receptor gene and prostate cancer risk: analysis of a Brazilian population. *Cancer Invest* 2008; 26(1):74-80.

ALOPECIA ANDROGENETICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

- 97) Sinclair RD. Male androgenetic alopecia. *J Men's Health Gender* 2004; 1(4):319-27.
- 98) Stamatias GN, Wu J, Pappas A, Mirmirani P, McCormick TS, Cooper KD, Consolo M, Schastnaya J, Ozerov IV, Aliper A, Zhavoronkov A. An analysis of gene expression data involving examination of signaling pathways activation reveals new insights into the mechanism of action of minoxidil topical foam in men with androgenetic alopecia. *Cell Cycle* 2017; 16(17):1578-1584.
- 99) Stanford JL, Just JJ, Gibbs M, Wicklund KG, Neal CL, Blumenstein BA and Ostrander EA. Polymorphic repeats in the androgen receptor gene: molecular markers of prostate cancer risk. *Cancer Res* 1997; 57, 1194-1198.
- 100) Stough D, Stenn K, Haber R. Psychological effect, pathophysiology, and management of androgenetic alopecia in men. *Mayo Clin Proc* 2005; 80(10):1316-1322.
- 101) Su LH, Chen HH. Androgenetic alopecia in policemen: higher prevalence and different risk factors relative to the general population (KCIS no. 23). *Arch Dermatol Res* 2011; 303(10):753-61.
- 102) Su LH, Chen TH. Association of androgenetic alopecia with metabolic syndrome in men: a community-based survey. *Br J Dermatol* 2010; 163(2):371-7.
- 103) Suter NM, Malone KE, Daling JR, Doody DR, Ostrander EA. Androgen receptor (CAG)_n and (GGC)_n polymorphisms and breast cancer risk in a population-based case-control study of young women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12(2):127-35.
- 104) Tang PH, Chia HP, Cheong LL, Koh D. A community study of male androgenetic alopecia in Bishan, Singapore. *Singapore Med J* 2000; 41:202-205.
- 105) Taplin ME, Bublely GJ, Shuster TD, et al. Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *N Engl J Med* 1995; 332:1393-8.
- 106) Tirabassi G, Corona G, Falzetti S, Delli Muti N, Maggi M, Balercia G. Influence of Androgen Receptor Gene CAG and GGC Polymorphisms on Male Sexual Function: A Cross-Sectional Study. *Int J Endocrinol* 2016: 5083569.
- 107) Tobin DJ. Chapter 1. Gerontobiology of the hair follicle. En: *Aging Hair*, Trüeb RM, Tobien DJ. Eds. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010.
- 108) Torkamani N, Rufaut NW, Jones L, Sinclair R. Destruction of the arrector pili muscle and fat infiltration in androgenic alopecia. *Br J Dermatol* 2014; 170(6):1291-8.
- 109) Tosti A, Pazzaglia M, Soli M. Evaluation of sexual function with an international index of erectile function in subjects taking Finasteride for androgenetic alopecia. *Arch Dermatol* 2004; 140:857-8.
- 110) Tosti A, Piraccini BM. Androgenetic alopecia. *Int J Dermatol*, 1999; 38:1-7.
- 111) Tut TG, Ghadessy FJ, Trifiro MA, Pinsky L, Yong EL. Long polyglutamine tracts in the androgen receptor are associated with reduced transactivation, impaired sperm production, and male infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:3777-82.

ALOPECIA ANDROGENETICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

- 112) Verrijdt G, Haelens A, Claessens F. Selective DNA recognition by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific regulation of gene expression. *Mol Genet Metab.* 2003;78(3):175-85.
- 113) Wang TL, Zhou C, Shen YW, Wang XY, Ding XL, Tian S, Liu Y, Peng GH, Xue SQ, Zhou JE, Wang RL, Meng XM, Pei GD, Bai YH, Liu Q, Li H, Zhang JZ. Prevalence of androgenetic alopecia in China: a community-based study in six cities. *Br J Dermatol* 2010; 162(4):843-7.
- 114) Wang Y, Wei Y, Tang X, Liu B, Shen L, Long C, Lin T, He D, Wu S, Wei G. Association between androgen receptor polymorphic CAG and GGC repeat lengths and cryptorchidism: A meta-analysis of case-control studies. *J Pediatr Urol.* 2018; pii: S1477-5131(18)30244-4.
- 115) Whiting D. Possible mechanisms of miniaturization during androgenetic alopecia or pattern hair loss. *J Am Acad Dermatol* 2003; 45: S81-6.
- 116) Whiting DA. Male pattern hair loss: current understanding. *Int J Dermatol* 1998; 37:561-6.
- 117) Zinn AR, Ramos P, Elder FF, Kowal K, Samango-Sprouse C, Ross JL. Androgen receptor CAGn repeat length influences phenotype of 47,XXY (Klinefelter) syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 5041–6.
- 118) Zitzmann M, Depenbusch M, Gromoll J, Nieschlag E. X-chromosome inactivation patterns and androgen receptor functionality influence phenotype and social characteristics as well as pharmacogenetics of testosterone therapy in Klinefelter patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:6208-17.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Patrón distintivo de calvicie en alopecia androgenética

Springer K, Brown M, Stulberg DL. Common hair loss disorders. *Am Fam Physician*. 2003;68(1):93-102.

Rebora A. Pathogenesis of androgenetic alopecia. *J Am Acad Dermatol*. 2004;50(5):777-9.

Kaufman KD. Androgens and alopecia. *Mol Cell Endocrinol*. 2002;198(1-2):89-95. Review.

Figura 2. Clasificación de la AGA de acuerdo con la clasificación de Norwood-Hamilton.

Los patrones se describen como anterior, vértex y típico.

Figura 3. Elementos estructurales del cabello y ciclo normal.

Figura 4. Acortamiento de la fase anágena en el ciclo celular del FP.

Figura 5. Efectos diferenciales de los andrógenos sobre el crecimiento del cabello.

Kaufman KD. Androgens and alopecia. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 198: 89-95.

Figura 6. Estructura del gen del receptor de andrógenos y estructura secundaria de la proteína RA.

Obsérvese en el exón 1 la presencia de los repetidos de trinucleótidos que codifican para poliglutaminas (CAG) y poliglicinas (GGC).

Figura 7A. Estructura del gen del receptor de andrógenos y estructura secundaria de la proteína RA.

Chamberlain NL, Driver ED, Miesfeld RL. The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic Acids Res*. 1994 Aug 11;22(15):3181-6.

Figura 7B. Correlación del número de repetidos CAGn y GGCn del gen RA. A.

Actividad de transactivación del RA que correlaciona de manera inversa con el número de repetidos CAG (poliglutamina). MMCAT: plásmido reportero, TAT3CAT: gen reportero.

B. Se observa que el número de repetidos GGC afecta de manera inversa los niveles de proteína RA (AR total/célula). *Fuente: Chamberlain NL, 1994 y Ding D, et al. 2005.*

Figura 8. Secuencia de nucleótidos del exón 1 del gen RA. En rojo se muestra el codón de inicio del gen. En verde se señalan las secuencias utilizadas para el diseño de los primers y en amarillo se destacan los repetidos CAG y GGC. En la secuencia de referencia se aprecian 22 repetidos CAG y 17 repetidos GGC.

ALOPECIA ANDROGENETICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

Figura 9. Electroferogramas de los polimorfismos CAG y GGC. A, B. Trinucleótidos CAG de 20 y 24 repetidos. C y D. Trinucleótidos GGC de 17 y 18 repetidos.

Figura 10. Concordancia Genotipo/Fenotipo en AGA. A. La madre del caso porta en un cromosoma X el alelo CAG de 22 repetidos y en el otro X presenta un alelo de 24 repetidos (heterocigota), transmitiendo a sus dos hijos afectados por AGA el cromosoma con el alelo de 22 repetidos. Se muestra concordancia fenotípica y concordancia genotípica. B. En este caso la madre también es heterocigota y transmitió al caso con AGA el cromosoma X con 22 repetidos y al hermano sin alopecia, el cromosoma con 24 repetidos, lo que se interpreta como discordancia fenotípica y discordancia genotípica.

Figura 11. Fenotipos de AGA. A y A1, hermanos discordantes para AGA, el individuo A presenta alopecia tipo VII y su hermano no presenta AGA. B y B1 son hermanos concordantes para AGA, con tipos III vértex y IVa, respectivamente.

Figura 12. Distribución del número de repetidos CAG y GGC en el exón 1 del gen RA. La muestra está integrada por un total de 64 sujetos.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Frecuencia de alopecia androgenética en diferentes poblaciones.

Tabla 2. Concentraciones del receptor de andrógenos en cuero cabelludo.

Sawaya ME, Price VH. Different levels of 5alpha-reductase type I and II, aromatase, and androgen receptor in hair follicles of women and men with androgenetic alopecia. *J Invest Dermatol* 1997;109(3):296-300.

Tabla 3. Asociación entre historia familiar de AGA por pariente afectado y alopecia

*RM ajustada por edad. *Modificado de:* Chumlea WC, Rhodes T, Girman CJ, Johnson-Levonas A, Lilly FR, Wu R, Guo SS. Family history and risk of hair loss. *Dermatology* 2004; 209:33-9.

Tabla 4. Repetidos de trinucleótidos en el exón 1 del RA, entre casos y controles.

Ellis JA, Stebbing M, Harrap B. Polymorphism of the androgen receptor gene is associated with male pattern baldness. *J Invest Dermatol* 2001; 116:452-55.

Tabla 5. Clasificación de la progresión de AGA, según la escala de Norwood-Hamilton para AGA.

Tabla 6. Tamaño de muestra estimada de acuerdo al estudio piloto. Tamaño de la n estimada en base a concordancia (κ).

Tabla 7. Distribución de los fenotipos de AGA, de acuerdo a la escala de Norwood-Hamilton en 48 individuos con AGA (32 casos y 16 hermanos).

Tabla 8. Resultado del análisis de secuenciación del número de repetidos CAG/GGC en 32 tríos. NRCAG: Número de repetidos CAG, NRGGC: Número de repetidos GGC, AGAc: concordancia para alopecia androgenética, Hap-c: concordancia para haplotipo.

Tabla 9. Frecuencias alélicas de los polimorfismos CAG/GGC en 32 pares de hermanos.

Tabla 10. Frecuencias alélicas de los polimorfismos CAG/GGC en individuos con AGA y sin AGA.

Tabla 11. Frecuencia de los haplotipos CAG/GGC en 32 casos índices y 16 hermanos con AGA.

Tabla 12. Frecuencias de los haplotipos CAG/GGC en 32 casos índices y 16 hermanos con AGA. Acuerdo observado: 68.8%, acuerdo esperado 50.2%, kappa ponderada libre de azar: 37.3%.

Tabla 13. Resultados de la prueba de asociación basada en familias (FBAT) para los marcadores CAG/GGC del gen *RA*, ligados al cromosoma X.

Apéndice 1

Extracción de DNA de sangre periférica con técnica de sales.

1. Obtener una muestra de sangre periférica de aproximadamente 5 ml. de sangre en tubo *vacuttainer*[®] con EDTA (tapón morado)
2. Centrifugar la muestra a 5000 rpm por 10 minutos y separar el plasma
3. Etiquetar dos microtubos de 1.5mL
4. Tomar 1mL de sangre y transferir a los microtubos
5. Adicionar 0.6-0.7mL de TTS*
6. Homogenizar cada tubo con pipeta
7. Centrifugar a 14000 rpm por 3 minutos. Decantar el sobrenadante.
8. Resuspender el botón en 1mL de TTS*.
9. Centrifugar a 14000 rpm por 3 minutos. Decantar el sobrenadante.
10. Resuspender el botón en 1mL de TTS*.
11. Centrifugar a 14000 rpm por 3 minutos. Decantar el sobrenadante.
12. Resuspender el botón en 1mL de TTS*.
13. Centrifugar a 14000 rpm por 3 minutos. Decantar el sobrenadante.
14. Resuspender el botón en 0.57mL de NaCl 5.0mM[†] y alicuotar cada tubo en dos.
15. Adicionar a cada tubo 30μL de SDS** al 10%.
16. Homogenizar en el vórtex por 5 minutos.
17. Adicionar 180μL de NaCl saturado.
18. Homogenizar en el vórtex por 5 minutos.
19. Centrifugar a 14 rpm durante 25 minutos.
20. Recuperar el sobrenadante.
21. Adicionar 600μL de SEVAG[†] y agitar vigorosamente hasta que la solución se torne blanca.
22. Centrifugar a 14 rpm durante 25 minutos.
23. En un frasco de cristal de 15mL poner 4mL de etanol absoluto frío (-20°C).
24. Etiquetar el frasco.
25. Transferir la fase superior de los viales centrifugados al frasco de vidrio etiquetado y almacenar por lo menos 12 horas a -20°C.
26. Etiquetar un microtubo de 0.6mL.
27. Con micropipeta y punta amarilla recuperar el DNA precipitado y depositarlo en el microtubo de 0.6mL etiquetado.
28. Adicionar dos volúmenes de etanol al 70%.
29. Centrifugar a 14000 rpm. Durante 10 minutos.
30. Realizar dos lavado con etanol al 70%.
31. Decantar el etanol y dejar secar el DNA.

ALOPECIA ANDROGENETICA: ESTUDIO FAMILIAR DE CONCORDANCIA DEL NÚMERO DE REPETIDOS CAG Y GGC DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

32. Adicionar 300 μ L de agua estéril 100 y rehidratar a 65°C durante 1 hora.

33. Conservar el DNA a -8°C.

Reactivos y soluciones:

*TTS: Tris pH 7.4 10 mM: 0.1211g de trizma base (ajustar el pH con HCl); 1.0mL de Tritón X-100 al 1.0%; 10.269g de sacarosa 300mM; aforar con agua destilada a 100mL. Esterilizar por filtración. Conservar a 4-8°C.

‡NaCl 5.0mM: 0.0584g de NaCl, aforar a 200mL con agua destilada. Esterilizar por autoclave.

**SDS: Lauril sulfato de sodio.

SEVAG: 49:1, cloroformo: alcohol isoamílico.

Apéndice 2

Extracción de DNA de mucosa oral y orina.

1. Centrifugar las muestras a 3000 rpm durante 15 minutos.
2. Decantar el sobrenadante y recuperar el botón celular.
3. Preparar para cada muestra 120µL de EDTA 0.5M (pH 8.0) + 500µL de solución de lisis nuclear. Mantener la mezcla en hielo, a temperaturas bajas la muestra puede tornarse opaca.
4. Agregar a cada botón celular 600µL de la mezcla anterior + 70µL de proteinasa K [10mg/mL].
5. Resuspender el botón celular con la punta de la micropipeta y transferir la suspensión a un microtubo de 1.5mL.
6. Dejar en incubación a 65°C durante un mínimo de 24 hrs.
7. Agregar a cada microtubo que contiene la muestra digerida, 200µL de solución de precipitación de proteína a temperatura ambiente. NOTA: si la solución es muy viscosa y hay un exceso de proteína a simple vista, se pueden agregar otros 200µL de la solución.
8. Agitar los microtubos en el vórtex durante 20 segundos y meter los tubos en hielo por 5 minutos.
9. Centrifugar a 14000 rpm durante 15 minutos.
10. Preparar microtubos de 1.5mL con 600µL de isopropanol.
11. Recuperar el sobrenadante que contiene el DNA en el microtubo de 1.5mL con isopropanol a temperatura ambiente.
12. Mezclar suavemente por inversión hasta observar las hebras blancas que corresponden al DNA.
13. Dejar en hielo por 30 minutos. Es recomendable dejar toda la noche a -20°C.
14. Centrifugar a 14000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente.
15. Decantar el sobrenadante.
16. Adicionar 600µL de etanol al 70% a temperatura ambiente e invertir suavemente varias veces para lavar el DNA.
17. Centrifugar a 14000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente.
18. Decantar el etanol y dejar los tubos invertidos sobre un papel absorbente hasta que el DNA se seque por completo.
19. Adicionar 100µL de solución e rehidratación de DNA y rehidratar a 65°C durante 1 HORA. Conservar el DNA a 2-8°C.