



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
Escuela de Tecnología Médica



**TESIS PROFESIONAL**

***Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención en morfofisiopatología y citodiagnóstico***

***“Variante rs7759938 del gen LIN28B y su asociación con parámetros de la calidad seminal y función testicular en hombres que consultan por infertilidad”***

**Alumna: Javiera Montecinos Valenzuela**

**Tutora: Prof. María Cecilia Lardone**

**Instituto de Investigaciones Materno Infantil (IDIMI) - Facultad de Medicina  
Universidad de Chile**

**Firma**

**Fecha: 24 de Julio del 2023**

## ACTA CURSO TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

La **Srta. Javiera Verónica Montecinos Valenzuela**, estudiante de Tecnología Médica con Mención en Morfofisiopatología y Citodiagnóstico, cumpliendo con los requisitos establecidos en el plan de estudio, realizó durante el noveno semestre de la carrera, la Tesis Profesional titulada: “ **Variante rs7759938 del gen LIN28B y su asociación con parámetros de la calidad seminal y función testicular en hombres que consultan por infertilidad**”, dirigida por la **Dra. María Cecilia Lardone**, académica del Instituto de Investigaciones Materno Infantil (IDIMI) - Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Este trabajo fue revisado por la comisión integrada por: **Dr. Fernando Rodríguez** y la **Dra. Soledad Henríquez Barrera**, ambos académicos del Instituto Endocrinología Molecular y Citogenética/IDIMI, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

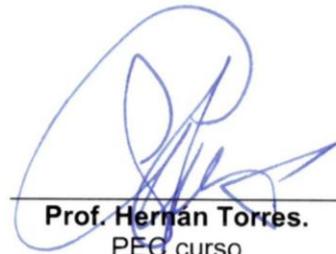
La calificación obtenida se detalla a continuación:

<b>Corrector 1 Dr. Fernando Rodríguez</b>	6.90	25%
<b>Corrector 2 Dra. Soledad Henríquez</b>	6.89	25%
<b>Tutor(es) Guía:</b>		
<b>Evaluación intermedia</b>	5.10	25%
<b>Nota final tutor</b>	7.00	25%
<b>Nota final tesis profesional</b>	<b>6.47</b>	

En consecuencia el estudiante **Javiera Verónica Montecinos Valenzuela** aprueba satisfactoriamente la asignatura.



**Prof. Marioly Müller**  
Coordinador(a) curso  
Trabajo de Investigación



**Prof. Hernan Torres.**  
PEG curso  
Trabajo de Investigación

## **Dedicatoria**

Quiero dedicar este presente trabajo a mis padres, por su creencia en mí. A mi hermana, por su comprensión y cuidado. A mi pareja, por su cariño y compañía. A mis amigos, que sin ellos no hubiera podido.

## **Agradecimientos**

Agradezco a la Dra. María Cecilia Lardone, mi guía en este proceso académico. Por su orientación, paciencia y conocimiento. A su ayudante de investigación Eliana Ortiz, cuya asistencia y apoyo fueron esenciales en el desarrollo práctico de este proyecto. Agradezco a ambas por su dedicación y enseñanza. También quiero agradecer a los equipos de la Unidad de Andrología Molecular y Reproductiva y del Laboratorio de Andrología Clínica del Instituto de Investigaciones Materno Infantil (IDIMI) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile por su amabilidad y colaboración a lo largo de este trabajo. Agradecer a mis amigos por su presencia y ayuda durante este proceso, su compañía terminó siendo fundamental. Finalmente, gracias a mi familia por su comprensión y cariño.

# Índice

Lista de abreviaturas .....	3
1. Resumen .....	4
2. Abstract .....	6
3. Introducción.....	8
3.1 Espermatogénesis y esteroidogénesis testicular .....	8
3.2 LIN28AB .....	9
3.3 Expresión de LIN28B en tejidos del eje hipotálamo-hipófisis-gónada .....	10
3.4 Variantes genéticas de LIN28B.....	12
3.5 Infertilidad Masculina.....	14
4. Hipótesis .....	15
5. Objetivos.....	15
5.1 Objetivo General .....	15
5.2 Objetivos Específicos .....	15
6. Materiales y Métodos .....	16
6.1. Sujetos .....	16
6.2. Análisis de rutina .....	17
6.3 Genotipificación de la variante rs7759938 .....	18
6.4 Cuantificación del transcrito de LIN28B en espermatozoides .....	20
6.5. Cálculo de tamaño muestral y análisis estadístico.....	21
7. Resultados .....	23
7.1 Antecedentes clínicos.....	23
7.2 Parámetros seminales .....	24
7.3 Pubertad auto-informada .....	25
7.4 Parámetros hormonales .....	27
7.5 Abundancia del transcrito de <i>LIN28B</i> en espermatozoides .....	29
7.6 Análisis de asociación genética del variante rs7759938 con variables de la calidad seminal y niveles hormonales .....	31
8. Discusión.....	38
9. Conclusiones .....	43
10. Anexos .....	47

## Lista de abreviaturas

- cDNA: DNA complementario.
- DE: desviación estándar
- EB: Estradiol Benzoato
- GWAS: Estudio de asociación del genoma completo.
- hCG: Gonadotropina coriónica humana
- *Lin28*: Gen Lin28 en *Caenorhabditis elegans*.
- *Lin28a*: Gen Lin28 parólogo a en mamíferos.
- *Lin28b*: Gen Lin28 parólogo b en mamíferos.
- Lin28b: Proteína codificada por el gen Lin28b en mamíferos
- *LIN28B*: Gen LIN28B en humanos.
- LIN28B: Proteína codificada por el gen *LIN28B* en humanos.
- mRNA: RNA mensajero.
- miRNA: MicroRNA.
- SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido.
- TA: Temperatura ambiente

## 1. Resumen

La infertilidad ha sido definida como un problema de salud pública por la OMS, donde las causas de la alteración de la espermatogénesis son desconocidas en la mayoría de los hombres infértiles. En este sentido, la disminución en el recuento espermático se ha asociado al inicio tardío de la pubertad. Relacionado a esto, varios estudios genómicos a gran escala han identificado variantes genéticas de *LIN28B* con rasgos puberales y con un inicio atrasado de la pubertad. Una de estas variantes, rs7759938, ha sido asociada además con niveles más bajos de testosterona en el hombre adulto. Por otra parte, en el modelo murino, se demostró que la expresión de *LIN28B* en testículo está sometida a una regulación por gonadotrofinas. En base a estos antecedentes, proponemos que la variante rs7759938 se asocia a un deterioro de la calidad seminal y niveles más bajos de testosterona en hombres adultos. A su vez, la variante afectaría la expresión transcripcional de *LIN28B* en las células germinales de hombres adultos. El objetivo principal de esta tesis fue estudiar la asociación de la variante rs7759938 con parámetros de la calidad seminal, hormonal y la expresión de *LIN28B* en una cohorte de 150 hombres que consultaron por infertilidad de origen masculino o de la pareja en el Instituto de Investigaciones Materno Infantil (IDIMI), excluyendo sujetos con causas conocidas de falla espermatogénica, así como obesidad, presencia de enfermedades crónicas, consumo de medicamentos, abuso de alcohol y drogas. Con este propósito se genotipificó la variante rs7759938 por el método de PCR alelo específica en DNA de sangre periférica (TaqMan™ SNP Genotyping Assay); se cuantificó la abundancia del mRNA de *LIN28B* en RNA total extraído de espermatozoides de los mismos sujetos por PCR en tiempo real; y se midieron los niveles séricos de las hormonas testosterona, FSH y LH. El análisis de asociación entre la variante genética y las variables de la calidad seminal y parámetros hormonales se realizó utilizando el software R (SNPAssoc). Para los 150 pacientes estudiados la frecuencia alélica de la variante rs7759938 fue de 74% para el alelo T y del 26% para el alelo C. No se encontró

asociación entre la variante y los parámetros de calidad seminal, ni los niveles hormonales. Se encontró una correlación directa y significativa entre la expresión relativa de *LIN28B* con la concentración espermática ( $r=0,485$  y  $P<0,001$ ) y el recuento total de espermatozoides ( $r=0,450$  y  $P<0,001$ ). Por otra parte, se encontró una asociación de rs7759928 con una menor expresión relativa de *LIN28B* ( $P=0,057$ ) en el modelo genético sobredominante. En conclusión, estos hallazgos indican que *LIN28B* se expresa en las células germinales y sugieren que *LIN28B* puede estar involucrado en la proliferación de espermatogonias en el testículo humano adulto. Si bien no es concluyente, nuestros resultados sugerirían que la variante rs7759938 es un locus genómico que contribuye a la variación de los niveles de expresión del mRNA de *LIN28B*. Por lo tanto, es necesario estudiar una cohorte más grande para confirmar esta suposición y la asociación de genotipos con parámetros de la calidad seminal.

## 2. Abstract

Infertility has been defined as a public health problem by the WHO, where the causes of altered spermatogenesis are unknown in a majority of infertile men. In this regard, the decrease in sperm count has been associated with the late onset of puberty. Related to this, several large-scale genomic studies have identified genetic variants of *LIN28B* with pubertal traits and delayed onset of puberty. One of these variants, rs7759938, has also been associated with lower testosterone levels in adult men. Moreover, it was shown that *LIN28B* expression in testis is regulated by gonadotrophins in the murine model. Based on this background, we propose that the rs7759938 variant is associated with impaired seminal quality and lower testosterone levels in adult men. In turn, the variant would affect the transcriptional expression of *LIN28B* in germ cells of adult men. The main objective of this thesis was to study the association of the rs7759938 variant with parameters of seminal quality, sexual hormones and *LIN28B* expression in a cohort of 150 men who consulted for infertility at the Instituto de Investigaciones Materno Infantil (IDIMI), excluding subjects with known causes of spermatogenic failure, as well as obesity, presence of chronic diseases, medication use, alcohol and drug abuse. For this purpose, the rs7759938 variant was genotyped by allele-specific PCR in peripheral blood DNA (TaqMan™ SNP Genotyping Assay); the abundance of *LIN28B* mRNA was quantified by real-time PCR in total RNA extracted from spermatozoa of the same subjects; and serum levels of testosterone, FSH and LH were measured. The association analysis between the genetic variant and seminal quality variables and hormonal parameters was performed using R software (SNPAssoc). For the 150 patients studied, the allelic frequency of the rs7759938 variant was 74% for the T allele and 26% for the C allele. No association was found between the variant and seminal quality parameters or hormone levels. A direct and significant correlation was found between relative *LIN28B* expression with sperm concentration ( $r=0.485$ ;  $P<0.001$ ) and total sperm count ( $r=0.450$ ;  $P<0.001$ ). Moreover, an association of rs7759928 with lower relative *LIN28B* expression ( $P=0.057$ ) was found in the overdominant genetic model.

In conclusion, these findings indicate that LIN28B is expressed in germ cells and suggest that LIN28B may be involved in spermatogonia proliferation in the adult human testis. Although inconclusive, our results would suggest that the rs7759938 variant is a genomic locus that contributes to variation in *LIN28B* mRNA expression levels. Therefore, a larger cohort should be studied to confirm this assumption and the association of genotypes with seminal quality parameters.

**Palabras clave:** LIN28B, rs7759938, Infertilidad, calidad seminal.

### **3. Introducción**

#### **3.1 Espermatogénesis y esteroidogénesis testicular**

La espermatogénesis es un proceso complejo que tiene lugar en el testículo, donde las células madre espermatogoniales diploides proliferan, pasan por 2 divisiones meióticas sucesivas y se diferencian en espermatozoides haploides (1). Este proceso ocurre de manera gradual e involucra una compleja regulación hormonal. El eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (HHG) coordina las funciones espermatogénicas y esteroidogénicas del testículo. La hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) producida y liberada por el hipotálamo actúa sobre receptores en la adenohipófisis estimulando la producción y liberación de la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH). Estas gonadotrofinas actúan sobre las células de Sertoli y de Leydig en el túbulo seminífero y en el intersticio testicular, respectivamente, estimulando la progresión de la maduración espermatogénica y la producción de una concentración adecuada de testosterona intratesticular (1)

La espermatogénesis completa se produce tras el inicio de la pubertad, momento en el que aumenta la secreción de LH, lo que va a resultar en el estímulo de las células de Leydig para producir una adecuada concentración de testosterona. Esta hormona es fundamental para el desarrollo de las características y funciones sexuales, como así también para la progresión de la espermatogénesis. Por otro lado, la FSH, también es necesaria para el proceso de la espermatogénesis, y en conjunto con la testosterona va a mantener la función de apoyo de las células de Sertoli que funcionan como sostén de las células germinales en los túbulos seminíferos. Sin embargo, se ha demostrado que ratones transgénicos que carecen de FSH o de su receptor (FSHR) son fértiles; en cambio, los ratones que carecen del receptores de andrógenos no pueden generar células germinales post-meióticas. Esto, por lo tanto, demuestra la importancia de la testosterona en el proceso de la espermatogénesis (2). A su vez, la interacción entre los dos compartimentos testiculares y la retroalimentación negativa

de testosterona e inhibina B, producida por las células de Sertoli, son esenciales para la regulación de la secreción de GnRH, manteniendo la homeostasis del eje HHG (3).

Por otra parte, se ha sugerido que el momento de inicio de la pubertad puede afectar la función testicular en el adulto. En este sentido, el estudio de Jensen et al (4) evaluó los parámetros hormonales y seminales en una cohorte de 652 hombres daneses sanos, que reportaron de manera auto-informada el inicio de su pubertad en comparación a sus compañeros concluyendo que los hombres con inicio puberal tardío tenían una peor calidad seminal. En específico estos últimos sujetos presentaron una menor concentración espermática, junto a un menor recuento total de espermatozoides en comparación a los hombres que refirieron haber tenido un inicio de cambio puberales distintivos en un momento similar al de sus pares. En este estudio también se vio que el inicio tardío de la pubertad se asoció con niveles más altos de FSH y niveles más bajos de testosterona libre.

### **3.2 LIN28AB**

LIN28 es un gen heterocrónico que fue caracterizado por primera vez en el nematodo *C. elegans*, donde se ha visto que regula el tiempo de desarrollo en las larvas (5). En los mamíferos, existen dos genes de la familia LIN28, localizados en los cromosomas 1p36.11 y 6q21, que producen proteínas parálogas: LIN28A y LIN28B, respectivamente. El gen *LIN28A* codifica una proteína de 209 aminoácidos, mientras que *LIN28B* codifica una proteína de 250 aminoácidos, las cuales muestran un alto grado de homología en sus dominios estructurales. Ambas presentan el dominio de choque frío (CSD) N-terminal y dos dominios CysCysHisCys de dedos de zinc (ZKD), que permiten su unión a microRNA (6). LIN28A tiene una ubicación predominantemente citoplasmática, en cambio LIN28B presenta una secuencia de localización nuclear (NLS) y una secuencia de localización nucleolar (NoLS) sugiriendo que LIN28B es una

proteína nuclear (7). Sin embargo, otros estudios sugieren la posibilidad de que LIN28B es una proteína citoplasmática que se traslada al núcleo de forma dependiente al ciclo celular (5,8)

LIN28AB se ha relacionado a la regulación de la biogénesis de la familia de microRNAs let-7. En humanos, se han identificado 12 miembros de esta familia de microRNAs (let-7a-1, let-7a-2, let-7a-3, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f-1, let-7f-2, let-7g, let-7i y miR-98) localizados en ocho loci cromosómicos diferentes (9). Estos miRNAs regulan los tiempos de desarrollo y la diferenciación celular actuando como supresores de oncogenes como MYC, RAS y HMGA2 (9–11). Es así como la activación de LIN28AB se produce en varios tumores humanos primarios contribuyendo a la proliferación celular y a la transformación celular a través de la inhibición de microRNAs de la familia let-7. Además, se ha sugerido la participación de miembros de la familia de microRNAs let-7 en el metabolismo de la esteroidogénesis mediante la predicción de un sitio de unión de let-7b en la 3'UTR de StAR (proteína reguladora aguda esteroidogénica)(12), sugiriendo que LIN28B podría participar en la vía esteroidogénica a través de su rol regulador sobre la familia microRNAs de let-7.

### **3.3 Expresión de LIN28B en tejidos del eje hipotálamo-hipófisis-gónada**

En modelos murinos adultos la expresión de Lin28b se ha detectado en placenta, testículo e hipotálamo (13,14). En ratas, se detectaron niveles altos de mRNA de Lin28b en el hipotálamo durante el periodo neonatal. Durante el periodo infantil y pubertad temprana se observa una disminución de un 50% comparado con el nivel neonatal. Al momento de la pubertad estos valores disminuyeron aún más y se vieron más bajos en la edad adulta. En este estudio se realizó un modelo de pubertad alterada mediante la administración neonatal de EB generando ratas macho con pubertad tardía con disminución de los niveles séricos de LH y FSH y del peso testicular. Esta alteración provocó el aumento de la expresión de Lin28b en el hipotálamo de las ratas adultas (13). En otro estudio se observó la expresión de Lin28b en un sistema de

pubertad alterada de ratas hipofisectomizadas, lo que provocó la disminución de Lin28b a niveles muy bajos en el testículo, que aumentó su expresión mediante la suplementación de hCG y FSH (15). En testículos de ratones, la expresión del mRNA mostró un patrón contrario al del hipotálamo, con niveles bajos durante el periodo neonatal, aumentado durante la infancia y la transición puberal, manteniéndose en el animal adulto. En este estudio ratones con hipogonadismo hipogonadotropo, como resultado de la inactivación del receptor de kisspeptina KISS1/Gpr54, la expresión de Lin28b en testículo fue menor en comparación con la del animal silvestre. La expresión se restituyó luego de la administración de hCG, mientras que la administración de FSH causó efectos más modestos (14). Todos estos resultados sugieren que la expresión de Lin28b en el animal adulto se encuentra principalmente en el testículo y está sometida a una regulación mediante gonadotrofinas.

Por otra parte, la localización de la proteína Lin28b en testículos de ratón en distintos estadios de desarrollo mostró que Lin28b se expresa en las células de Leydig neonatales e infantiles y persiste en el citoplasma de las células de Leydig adultas. No se encontró expresión de Lin28b en túbulos seminíferos de ratones infantiles, mas sí se observó expresión nuclear en las espermatidas elongadas de roedores adultos (14). En este estudio también se detectó la expresión transcripcional de *Lin28a* y *Lin28b* en testículo de ratón, en distintos estadios de maduración postnatal (neonatal, infantil, puberal-adulta temprana). De este resultado, se observa una diferencia en la expresión de estos dos genes. En el caso de *Lin28a* la mayor expresión es en fase neonatal e infantil, para luego disminuir en un 60% durante la edad puberal. Sin embargo, en el caso de *Lin28b*, este aumenta entre la etapa infantil y puberal ; permaneciendo con una elevada expresión en la etapa puberal (14).

Respecto de la expresión y localización de *LIN28B* en tejidos humanos pertenecientes al eje HHG, el proyecto GTEx (16) reporta que el testículo es el tejido en adulto donde *LIN28B* se



ascendencia europea (n=87,802) (21) y con mayor edad de aparición del botón mamario o telarquia en niñas (22). Respecto de la pubertad en varones, si bien ha sido menos estudiada, se ha reportado que dos variantes de *LIN28B* (rs395962 y rs314268), ubicadas en el mismo bloque que la variante mencionada, están fuertemente asociadas con la edad de engrosamiento de la voz (20). También, el alelo C o alelo menor de la variante rs7759938, se asoció fuertemente con niveles más bajos de testosterona en una muestra del Biobanco del Reino Unido de 176.000 hombres adultos entre 40 y 69 años de edad (23). En conjunto estos resultados sugieren que ciertas variantes en *LIN28B*, asociadas con pubertad retrasada en ambos sexos, modulan negativamente los niveles séricos de testosterona en hombres y posiblemente la función testicular en el adulto.

Mecanísticamente, las variantes genéticas mencionadas podrían tener un efecto en la expresión del gen *LIN28B*. En este sentido, información extraída de la base de datos GTex (16) indica que la expresión del mRNA de *LIN28B* es significativamente mayor en hipófisis y menor en testículo cuando se tiene que el genotipo de la variante rs7759938 es homocigoto para el alelo menor (CC), en comparación con el genotipo homocigoto mayor. Estos resultados sugieren que la variante rs7759938 puede actuar como elemento regulador de la expresión de *LIN28B* en hipófisis y testículo, lo que podría llegar a afectar la función endocrina y de la espermatogénesis en el testículo.

### 3.5 Infertilidad Masculina

La infertilidad ha sido definida por la OMS como la incapacidad de concebir después de un año manteniendo relaciones sexuales sin anticonceptivos. Esta suele afectar entre un 10-15% de las parejas en países desarrollados. El diagnóstico de infertilidad masculina se basa principalmente en el análisis del semen, en el cual se evalúan características como el recuento, la motilidad y la morfología de los espermatozoides. En un metaanálisis se reportó una disminución temporal del 50% en el conteo de espermatozoides en hombres no seleccionados por fertilidad de origen caucásico entre los años 1973 – 2011 (24).

Las causas de la alteración de la espermatogénesis se desconocen en una gran mayoría de los hombres infértiles. Las causas genéticas sólo explican un 4% de casos de falla espermatogénica en hombres no seleccionados y puede aumentar a un 20% en hombres con azoospermia. Estos diagnósticos genéticos comprenden aberraciones cromosómicas estructurales y numéricas (p. ej., síndrome de Klinefelter; cariotipo 47, XXY), microdeleciones de las regiones del factor de azoospermia (AZF) en el brazo largo del cromosoma Y y mutaciones del gen CFTR en la azoospermia obstructiva. Por lo que en aproximadamente el 72% de los hombres en parejas infértiles no se ha podido establecer un diagnóstico causal (25). De esta forma en la infertilidad masculina, al ser una enfermedad multifactorial, puede ser de interés revisar el efecto que tienen los polimorfismos del gen *Lin28B* sobre ella.

## 4. Hipótesis

La variante rs7759938 del gen *LIN28B* se asocia a un deterioro de la calidad seminal y niveles más bajos de testosterona en hombres adultos. A su vez la variante afecta la expresión transcripcional de *LIN28B* en las células germinales de hombres adultos.

## 5. Objetivos

### 5.1 Objetivo General

Estudiar la asociación de la variante génica rs7759938 de *LIN28B* con parámetros de la calidad seminal y el nivel de testosterona total sérica en una cohorte de hombres que consultan por infertilidad.

### 5.2 Objetivos Específicos

1. Determinar si la variante rs7759938 de *LIN28B* tiene efecto sobre la función espermatogénica del testículo medida por el recuento total de espermatozoides, la concentración de espermatozoides, la motilidad y la morfología espermática.
2. Determinar si la variante rs7759938 de *LIN28B* tiene efecto sobre los niveles séricos de testosterona y la relación testosterona/LH en hombres adultos.
3. Determinar si la variante rs7759938 afecta cuantitativamente la expresión transcripcional de *LIN28B* en espermatozoides.

## **6. Materiales y Métodos**

### **Diseño experimental**

El presente estudio corresponde a un análisis descriptivo y de asociaciones de la variante en estudio rs7759938 con distintos parámetros de la calidad seminal, hormonal y de expresión del gen *LIN28B* en espermatozoides en un grupo de sujetos que consulta por infertilidad. Este estudio se llevó a cabo en la Unidad de Andrología Molecular y Reproductiva y el Laboratorio de Andrología Clínica del Instituto de Investigación Materno Infantil (IDIMI), Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Esta tesis se inserta en el marco del proyecto FONDECYT de iniciación N°11200898 y cuenta con la aprobación del Comité de Ética en Investigación en Seres Humanos (CEISH) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

### **6.1. Sujetos**

Se reclutaron hombres adultos que consultaron por diagnóstico andrológico de infertilidad masculina o de la pareja en la Unidad de Andrología Molecular y Reproductiva (UAMR) o en el Laboratorio de Andrología Clínica del Instituto de Investigaciones Materno-Infantil (IDIMI), de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Los pacientes firmaron un consentimiento informado al momento del reclutamiento y de la aceptación de la toma de muestras.

6.1.1 Criterio de inclusión: Pacientes hombres de 18 a 55 años con indicación de espermiograma, sin antecedente de azoospermia secretora o sugerencia de azo/oligozoospermia obstructiva y de nacionalidad chilena de una generación hacia atrás.

6.1.2 Criterios de exclusión: Se excluyeron pacientes que reportaron un cariotipo anormal, presencia de microdeleciones del cromosoma Y, presencia de varicocele grados III y IV, hipogonadismo hipogonadotropo, infección seminal, epididimitis, traumatismo o lesión escrotal, oligozoospermia obstructiva, enfermedades crónicas (diabetes, insuficiencia

hepática, renal o hipertensión entre otras), tratamientos hormonales concomitantes y consumo excesivo de alcohol o drogas, así como antecedente de cáncer testicular, quimioterapia y/o radioterapia.

## **6.2. Análisis de rutina**

6.2.1 Antecedentes clínicos: Los pacientes fueron entrevistados para realizar un historial general, urológico y andrológico, con el fin de detectar eventos previos y actuales de infección y/o inflamación en el tracto reproductor y cirugías previas en el escroto e ingle, y antecedentes antropométricos, hábitos de consumo de tabaco, alcohol y drogas, así como la historia de enfermedades crónicas y consumo de medicamentos.

6.2.2 Evaluación física y urológica: En los casos que fue posible, un médico urólogo especialista en infertilidad realizó la evaluación física y urológica orientada a la detección de varicocele, palpación de los conductos deferentes, la evaluación del nivel de androgenización y la medición del volumen testicular utilizando un orquidómetro, con el objetivo de descartar posibles causas obstructivas de la oligozoospermia.

6.2.3 Cariotipo: El estudio citogenético se realizó en pacientes con una concentración de espermatozoides  $<5 \times 10^6$ /ml (26) en la Unidad de Endocrino-Genética del IDIMI, mediante el método bandeado G contando 35 mitosis de leucocitos extraídos de sangre periférica.

6.2.4 Análisis de microdeleciones del cromosoma Y (MDY): La detección de MDY se realizó en sujetos con  $<5 \times 10^6$  espermatozoides/mL(26). Veinte segmentos no polimórficos presentes en los intervalos 3 y 7 del cromosoma Y, incluyendo los genes del Factor de Azoospermia (AZF) a, b y c en el cromosoma Y, fueron amplificados por PCR multiplex utilizando el DNA extraído de sangre periférica como se ha descrito previamente (27).

6.2.5 Análisis hormonal: Las muestras de sangre obtenidas entre las 8:00 y las 11:00 horas de la mañana se utilizaron para el análisis hormonal en suero. Los niveles de LH y FSH se midieron mediante un ensayo inmunoradiométrico y la testosterona total fue medida mediante un ensayo inmunoradiométrico como se ha descrito previamente (28). La medición en suero de LH, FSH y testosterona se realizó para evaluar la función testicular y además para descartar eventuales alteraciones hormonales como el hipogonadismo hipogonadotrofo.

6.2.6 Análisis de semen: El análisis de semen se realizó siguiendo las directrices del Manual de Laboratorio para la Examinación y Procesamiento de Semen Humano, OMS, 5ta ed. (29) en muestra seminal obtenida por masturbación con una abstinencia sexual mínima de 2 días y máxima de 7 días. El semen se recolectó en recipientes estériles y se dejó a 37°C por una hora para que ocurriera la licuefacción y se pudieran realizar los análisis correspondientes. La evaluación incluyó la medición del volumen seminal, pH, concentración espermática en cámara de Neubauer, motilidad, viabilidad y morfología. Se evaluó si la motilidad era progresiva rápida (grado A), la cual corresponde a cuando los espermatozoides se mueven activamente de forma lineal o en grandes círculos, o si era motilidad no progresiva y con espermatozoides inmóviles. La morfología espermática se evaluó según los criterios estrictos de Kruger (29). El análisis de semen fue realizado por un profesional capacitado de la Unidad de Andrología Molecular y Reproductiva o del Laboratorio de Andrología Clínica del IDIMI.

### **6.3 Genotipificación de la variante rs7759938**

6.3.1 Extracción de DNA genómico: El DNA se extrajo de sangre periférica utilizando el kit de purificación de DNA Wizard (Promega) en 1 mL de la sangre siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación del DNA aislado se realizó por espectrofotometría (NanoDrop) y se almacenó a -20°C hasta su uso.

**6.3.2 Genotipado:** La variante rs7759938 fue genotipada con un método de PCR alelo específica utilizando el TaqMan™ SNP Genotyping Assay (Thermo Fisher Scientific), y la DNA polimerasa de la 2X Taqman® Genotyping Master Mix (Applied Biosystem). Este ensayo utiliza partidores y sondas específicas para la amplificación por separado de ambos alelos de la variante rs7759938 Assay ID:C\_11906296\_20), permitiendo la discriminación alélica y la determinación de los posibles genotipos. La Tabla 1 muestra los alelos que puede tener la variante y el fluoróforo acoplado a la sonda que detecta cada una de las secuencias alélicas.

**Tabla 1.** Contexto de la secuencia y alelos de la variante rs7759938.

ACTACCATTTTTCTTTCTAAAGG[C/T]TGCTACCTTTGAGGCTTCATCTGCA

	rs7759938
Alelo 1 VIC	C
Alelo 2 FAM	T
Genotipos	0 (T/T)
	1 (C/T)
	2 (C/C)

La reacción de amplificación se realizó en un solo replicado por muestra, usando 2 µL de DNA de concentración 10 ng/µL. Con el fin de comprobar la especificidad de la reacción, en cada experimento se incluyeron muestras con genotipos homocigotos y heterocigotos previamente determinados por secuenciación. Los datos de amplificación se analizaron con el software TaqMan® Genotyper™. El protocolo de amplificación se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Protocolo de amplificación para la variante rs7759938.

Paso	Temperatura	Tiempo (seg)
Pre-lectura de la placa	60°C	30 seg
Activación de la enzima	95°C	5 min
Denaturación	95°C	5 seg
Anneal y Extensión	60°C	30 seg
Post-lectura	60°C	30 seg

## **6.4 Cuantificación del transcrito de LIN28B en espermatozoides**

6.4.1 Preparación de la muestra de semen: El aislamiento de espermatozoides desde la muestra seminal se realizó a través de un gradiente de densidad utilizando PureSperm 40<sup>®</sup> (Nidacon) para separar los espermatozoides de las células somáticas (células germinales inmaduras, leucocitos y células epiteliales) obteniendo una muestra enriquecida en espermatozoides motiles. Brevemente, en un tubo tipo Falcon de 15 ml se agregó 1 mL de PureSperm 40<sup>®</sup> (Nidacon) y hasta 1,5 mL de semen y se centrifugó a 300 x g por 20 minutos. El pellet resultante se traspasó a un nuevo tubo tipo Falcon de 15 mL y se realizaron dos lavados con 5 y 1 ml de PBS 1X, respectivamente, a 300 x g por 15 minutos cada uno.

6.4.2 Extracción del RNA espermático: Se extrajo el RNA total de los espermatozoides separados, utilizando el método combinado de separación con tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo (Trizol<sup>®</sup>, Invitrogen) y purificación por columna de afinidad (RNeasy Mini Kit, Qiagen) de acuerdo con publicaciones previas (30 con algunas modificaciones del laboratorio. Brevemente, seguido de la separación espermática, se realizó la lisis de los espermatozoides utilizando 0,5 mL de buffer RLT (RNeasy Mini kit, Qiagen) con 7,5 µL de β-mercaptoetanol en el homogeneizador (Pro Scientific 200) a velocidad media por 4 minutos. Seguidamente, se efectuó una segunda homogeneización utilizando 500 µL de Trizol (previamente temperado a 37°C) a velocidad media por 4 minutos. Al homogeneizado se le agregaron 200 µL de cloroformo, se agitó enérgicamente por 15 segundos y se dejó reposar a TA por 3 minutos. Luego se centrifugó a 12.000 x g durante 20 minutos a 4°C. A la fase acuosa resultante se le agregó igual cantidad de etanol 100% para purificar la muestra y se continuó con la separación del RNA en la columna de afinidad (Rneasy Mini Kit, Qiagen) según las instrucciones del fabricante. En la misma columna, el RNA fue tratado con Rnase-Free Dnase (Qiagen) para eliminar cualquier posible contaminación con DNA, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se recuperó el RNA eluyendo con 20 µL de agua libre de nucleasas calentada a 65°C.

Finalmente se cuantificó el RNA mediante espectrofotometría (NanoDrop™) y el RNA alicuotado se almacenó a -80°C hasta su uso.

6.4.3 PCR en tiempo real (qRT-PCR): La abundancia de transcritos de *LIN28B* en el RNA de espermatozoides se cuantificó mediante PCR en tiempo real con SYBR Green I en el instrumento StepOne Plus (Applied Biosystems). Inicialmente, se sintetizó el cDNA a partir del RNA total usando la transcriptasa reversa Revert Aid H minus (Thermo Scientific) y el partidor d(T)12-18 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la síntesis de cDNA se utilizaron alícuotas de aproximadamente 500 ng de RNA total. La reacción de qPCR se realizó en triplicados utilizando Rox SYBR® MasterMlx dTTP Blue (Takyon) y partidores especialmente diseñados para la amplificación específica del mRNA de *LIN28B* (PrimerBlast Tool): *LIN28B*-forward, AGCACATTAGACCATGCGAGC y *LIN28B*-reverse, TTTGCTAGCCGCCTTCG (tamaño del fragmento amplificado 156 pb) y *GADPHS*-forward, 5'-CATGAACATTGTGAGCAACGC-3' y *GADPHS*-reverse, 5'-CAACCCTTCCACGATCCCAA-3' (tamaño del fragmento amplificado 94 pb). La expresión del transcrito de *LIN28B* fue normalizada respecto de la expresión del gen *housekeeping GAPDH-S* (gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa específica de espermatozoides). Utilizando el método de  $2^{\Delta Ct}$ , donde  $\Delta Ct$  corresponde a la diferencia entre los valores Ct de *GAPDH-S* y *LIN28B*. Todas las muestras fueron medidas por triplicado y se eliminaron los replicados que generaran una desviación estándar mayor a 0,5. La eficiencia de las reacciones de PCR han sido previamente determinadas en el laboratorio.

## **6.5. Cálculo de tamaño muestral y análisis estadístico**

El tamaño de la muestra para el enfoque transversal se estimó en base a nuestro análisis preliminar de asociación en el modelo codominante de la variante de *LIN28B* rs314277\_A, la cual presenta desequilibrio de ligamiento con la variante de estudio, con la edad de la

gonadarquia en 419 niños genotipados y participantes del estudio de Crecimiento y Obesidad de Chile (datos no publicados). Fijando los valores de  $\alpha$  y  $\beta$  en 0,05 y 0,2 (80% de potencia) respectivamente, estableciendo una diferencia de medias igual a 1 entre genotipos y teniendo en cuenta la frecuencia alélica de la variante (0,28), el tamaño de muestra estimado es de 150 sujetos.

Las asociaciones entre la variante y parámetros reproductivos (testosterona, concentración de espermatozoides y recuento total de espermatozoides) se analizaron utilizando el software R (paquete SNPAssoc) bajo modelos genéticos codominante, dominante, sobredominante, recesivo y aditivo. El análisis se ajustó por factores de confusión como el IMC, la edad y la hora de toma de muestra sanguínea, cuando se analizan variables hormonales. Los parámetros del semen se ajustaron por tiempo de abstinencia. Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS versión 21. Para la correlación entre variables numéricas se calculó el coeficiente de correlación de Spearman. Las variables que se desvían de la distribución normal se transformaron a logaritmo o raíz cuadrada o raíz cúbica. La significación estadística se consideró con un valor  $P < 0,05$ .

## 7. Resultados

### 7.1 Antecedentes clínicos

En este trabajo se estudiaron 150 hombres que asistieron al IDIMI para realizarse un espermiograma en el marco de su consulta por infertilidad de factor masculino o de la pareja.

Los antecedentes clínicos de la población se muestran en la Tabla 3.

El grupo presenta una edad promedio de 35 años, con una edad mínima de 22 años y una máxima de 51 años, lo que se ajusta a los criterios de inclusión. Los pacientes presentan un índice de masa corporal (IMC) promedio de 27,8 Kg/m<sup>2</sup>.

Con respecto al consumo de tabaco, alcohol y drogas se obtuvo la respuesta de los 150 pacientes. En el caso del tabaco, 50,6% (N=76) de los pacientes afirmaron fumar o haber fumado en el pasado. Se consideró el consumo de tabaco como el hábito de fumar por al menos durante 2 años con una frecuencia diaria o semanal, siendo el promedio de años de consumo de los pacientes de 12 años. En el caso del consumo de alcohol, 125 pacientes refirieron consumir alcohol y con un promedio de duración de 12 años (mínimo 6 meses y máximo 30 años), siendo lo más frecuente el consumo una vez a la semana en un 60,8% de los sujetos. Con respecto al consumo de drogas, un 41,3% de pacientes afirmó consumir en forma leve algún tipo de droga, siendo la marihuana la droga más consumida (83,3%). Por otra parte, se excluyeron sujetos con un consumo de cocaína diario por más de 2 años

En relación con las patologías de la zona genital o enfermedades andrológicas, éstas fueron auto reportadas, un factor a considerar sobre todo en el caso del testículo en ascensor. Dentro de los pacientes existen 10 casos de criptorquidia que en su mayoría fueron resueltas antes de los 5 años. Dentro de los pacientes con varicocele resuelto, dos de ellos eran de Grado I (subclínico), uno era de Grado II que se resolvió a los 18 años y el último presentó un varicocele

de Grado III que se operó un año antes de la toma de muestra. Dentro de las patologías que se reportaron se mencionan: torsión testicular, epididimitis, balanitis, postitis y hernia inguinal.

**Tabla 3.** Antecedentes Clínicos

Parámetros	
Edad	35 ± 6 (31 - 39)
IMC	27,8 ±3,8 (25,2 - 30,9)
Consumo de tabaco	50,6%
Consumo de alcohol	83,3%
Consumo de drogas	41,3%
Testículo en ascensor	14,7%
Varicocele operado	10,0%
Criptorquidia operada	6,7%
Otros	10,6%

Datos expresados en media ± DE (percentil 25 - 75) y porcentajes.

## 7.2 Parámetros seminales

Los parámetros seminales obtenidos del informe de los espermigramas se resumen en la Tabla 4. Los valores de referencia de los parámetros seminales evaluados son los establecidos en el Manual de laboratorio de la OMS para el examen y tratamiento del semen humano publicado en 2010 (29) (Anexo Tabla 1). Dentro de los pacientes existen 8 casos en los que no se tomó la muestra con 2-7 días de abstinencia. Entre los integrantes del estudio se observaron distintas alteraciones en los parámetros seminales:

- 23,3% (N=35) de los participantes presentó oligozoospermia, teniendo una concentración de espermatozoides menor a 15 millones/ml.
- 13,3% (N=20) de los participantes presentó astenozoospermia, que refiere a una motilidad progresiva (Grado A) menor al 32%.
- 76,7% (N=115) de los participantes presentaron teratozoospermia, refiriéndose a que menos del 4% de los espermatozoides de la muestra presenta una morfología normal.

- 21,3% (N=32) de los participantes presentó hipospermia, lo que indica un bajo volumen de semen.
- 2% (N=3) de los participantes presentó necrozoospermia, lo que significa que presentaban una vitalidad menor de 58%.

**Tabla 4.** Parámetros seminales de los sujetos estudiados (N=150)

Parámetros	
Concentración (mill/mL)	46 (17 - 90,6)
Cantidad total espermatozoides (mill)	115,3 (36 - 249,6)
Motilidad A (%)	58 (42 - 70)
Morfología normal (%)	2 (1 - 3)
Vitalidad (%)	87 (81,5 - 91)
Días abstinencia	4 (3 - 5)

Los valores muestran la mediana (percentil 25 - percentil 75)

### 7.3 Pubertad auto-informada

A los sujetos participantes se les consultó por la edad de aparición de cambios puberales. Para orientar al paciente en esta pregunta se hizo referencia a hitos de la pubertad más fácilmente recordables como: el aumento del tamaño peneano, la aparición de vello púbico y el engrosamiento de la voz. Además, se preguntó si estos cambios comenzaron a una edad similar a la de sus pares o si fue adelantada o atrasada.

El resumen de las respuestas obtenidas de todos los participantes se muestra en la Tabla 5. La mediana de la edad de inicio de cambios puberales fue de 13 años, con un mínimo y máximo de 11 a 17 años, respectivamente. Al consultar por el inicio de estos cambios respecto de sus pares, la mayoría de los pacientes informó que su pubertad inició al mismo tiempo de sus compañeros (70%), un 22,7% de los encuestados encontró que su pubertad había comenzado de forma atrasada y un 7,3% reportó un inicio de la pubertad más temprana respecto de sus pares. No se observó una mayor frecuencia de alteraciones andrológicas en

los pacientes que reportaron tener un comienzo de pubertad adelantada o atrasada respecto de sus pares.

**Tabla 5.** Inicio Pubertad auto-informada

Edad de inicio de la pubertad		13 (12 - 14)
Inicio de la pubertad respecto a sus pares	Al mismo tiempo	70%
	Atrasada	22,7%
	Adelantada	7,3%

Datos expresados en mediana (percentil 25 - percentil 75) y porcentajes.

Con el fin de evaluar la coherencia de las respuestas de los pacientes respecto de su recuerdo de la edad de aparición de cambios puberales, se realizó un análisis de correlación entre los datos obtenidos en las respuestas a “la edad de inicio de pubertad” y “la comparación del comienzo de pubertad respecto a sus pares”. En este análisis observamos una relación directa y significativa entre estas dos respuestas ( $P=0,009$   $r=0,212$ ). Seguidamente, se dividieron los datos de la edad de comienzo de pubertad auto-informada en tres categorías: menor a 12 años, entre 12 y 14 años y mayor a 14 años. Al comparar parámetros de la calidad seminal entre estas categorías observamos que los sujetos que señalaron una edad de comienzo de la pubertad mayor a 14 años presentaron una disminución significativa de la cantidad total de espermatozoides ( $p=0,046$  Mann Whitney) respecto de los sujetos en el grupo de referencia (edad de inicio 12 – 14 años). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en los demás parámetros seminales (Tabla 6).

**Tabla 6.** Parámetros de la calidad del semen según la edad de inicio de la pubertad autoinformada.

		Concentración espermática (millones/mL)	Cantidad total de espermatozoides (millones/eyaculado)	Motilidad grado A %	Morfología normal %	Vitalidad%
Categorías edad de edad de inicio de la pubertad autoinformada	<12 (N= 4)	120,3 (64,8-152,0)	231,6 (146 - 415,6)	61 (41 - 78)	4 (1 - 6)	88 (84 - 92)
	12-14(N= 125)	46 (17 - 92)	126 (41,6 - 266)	60 (43 - 70)	2 (1 - 3)	87 (82 - 91)
	>14 (N=20)	25 (16,1 - 66,0)	61,5 (19,3 - 130,2)	51 (34 - 72)	2 (1 - 3)	85 (77 - 90)
	Valor de P	0,034	0,015	0,13	0,314	0,098

Los valores muestran la mediana (percentil 25-75).

#### 7.4 Parámetros hormonales

Los niveles de FSH, LH y testosterona total fueron medidos en 145 sujetos del total de 150 y los resultados se muestran en la Tabla 7. Respecto a los niveles hormonales encontrados, se observó que un 5,3% de los casos tuvieron un nivel sérico de FSH fuera de los valores de referencia con 8 casos con valores mayores y 5 con valores menores al de referencia, en el caso del LH fue de sólo un 6%, con 7 por encima del valor y 2 por debajo del valor de referencia y finalmente en el caso de la testosterona total, no se encontró pacientes con un valor fuera al de referencia.

**Tabla 7.** Perfil hormonal en los sujetos estudiados (N=145)

Parámetros	
Testosterona (ng/mL)	3,2 ( 2,6 - 4 ) [1,2 - 7,2]
LH (mUI/mL)	3,4 (2,4 - 4,6) [0,4 - 15,4]
FSH (mUI/mL)	3,3 (2,3 - 4,8) [0,88 - 36,7]
Testosterona/LH	3,47 (2,29 - 4,67) [0,7-38,5]

Los valores muestran la mediana (percentil 25- percentil 75) [mínimo-máximo]. Valores de referencia FSH 1-7(mUI/mL), LH 1-8 (mUI/mL) y testosterona total 1-7 (ng/mL).

Con el fin de evaluar los niveles hormonales respecto de la calidad seminal, se realizó un análisis de correlación con los parámetros seminales. En este análisis observamos una correlación inversa y significativa entre los niveles de FSH y LH con la concentración espermática y con el recuento total de espermatozoides. Este resultado apoya el origen secretor de la disminución de la concentración espermática en los pacientes con bajo recuento (Tabla 8).

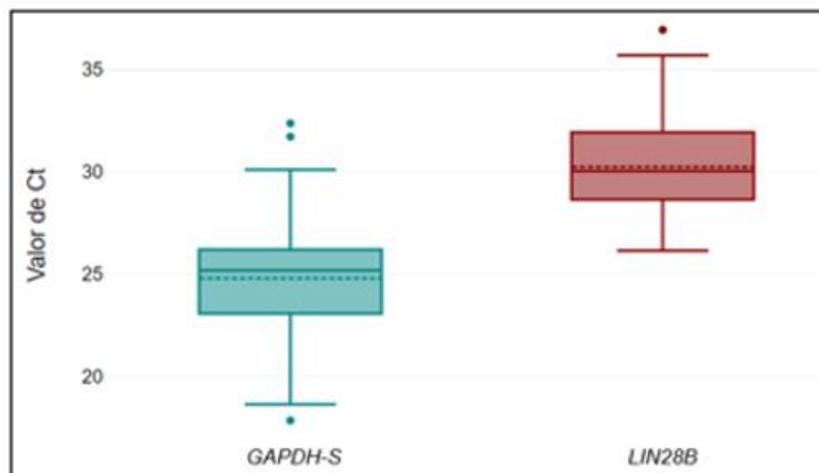
**Tabla 8.** Análisis de correlación de los parámetros seminales con los niveles hormonales.

		FSH	LH	T	T/LH
Concentración espermática (millones/mL)	Coefficiente de correlación (r)	-0,382	-0,343	-0,055	0,337
	Valor p	<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>	0,507	<b>&lt; 0,001</b>
Cantidad total de espermatozoides (millones/eyaculado)	Coefficiente de correlación (r)	-0,354	-0,23	-0,047	0,223
	Valor p	<b>&lt; 0,001</b>	<b>0,005</b>	0,571	<b>0,007</b>
Motilidad A (%)	Coefficiente de correlación (r)	-0,185	-0,238	-1,36	0,116
	Valor p	<b>0,025</b>	<b>0,004</b>	0,99	0,161
Morfología normal (%)	Coefficiente de correlación (r)	-0,238	-0,267	-0,247	0,147
	Valor p	<b>0,004</b>	<b>0,001</b>	<b>0,003</b>	0,079
Vitalidad (%)	Coefficiente de correlación (r)	-0,227	-0,203	-0,82	0,168
	Valor p	<b>0,006</b>	<b>0,015</b>	0,328	<b>0,046</b>

### 7.5 Abundancia del transcrito de *LIN28B* en espermatozoides

La cuantificación de la abundancia del transcrito de *LIN28B* en espermatozoides se realizó en muestras de 93 sujetos de los 150 pacientes incorporados al estudio. Las razones por las cuales no se pudo determinar la abundancia del transcrito de *LIN28B* en todas las muestras fueron: 1) baja cantidad de espermatozoides para obtener cantidad suficiente de RNA; 2) baja calidad del RNA obtenido; y/o 3) alta concentración de células redondas en la muestra seminal, las cuales contaminan el RNA de los espermatozoides. De las 93 muestras en las cuales se pudo determinar los niveles de expresión de *LIN28B*, un 23,7% corresponden a pacientes oligozoospermicos y un 76,3% a sujetos normozoospermicos.

Se detectó amplificación de los transcritos de *LIN28B* y *GAPDH-S* en todas las muestras evaluadas. Respecto al nivel de amplificación del transcrito del gen control interno *GAPDH-S* se obtuvo un ciclo umbral (Ct) promedio de  $24,8 \pm 2,56$  mientras que el valor promedio de Ct para la amplificación del transcrito de *LIN28B* fue de  $30,24 \pm 2,23$  (Figura 2).

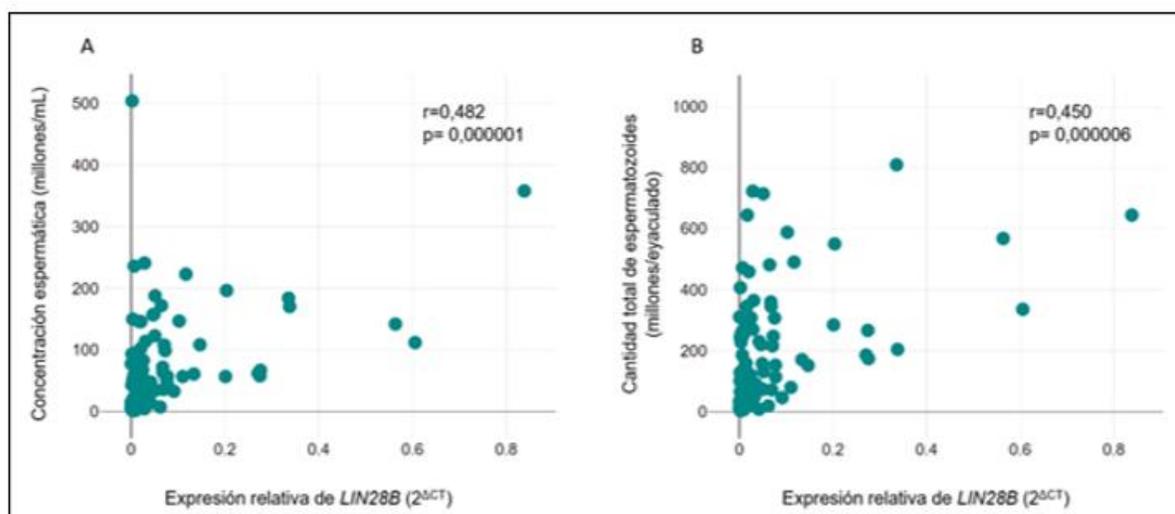


**Figura 2.** Valor del ciclo umbral (Ct) para la amplificación del transcrito de *GAPDH-S* y *LIN28B* por PCR en tiempo real en RNA extraído de espermatozoides de 93 sujetos.

La expresión relativa de *LIN28B* mostró una correlación directa y significativa con el recuento espermático y con la cantidad total de espermatozoides, sin embargo, no se observó correlación entre el nivel de expresión y los otros parámetros seminales (Tabla 9 y Figura 3).

**Tabla 9.** Análisis de correlación de la expresión relativa del transcrito de *LIN28B* en espermatozoides con los parámetros seminales.

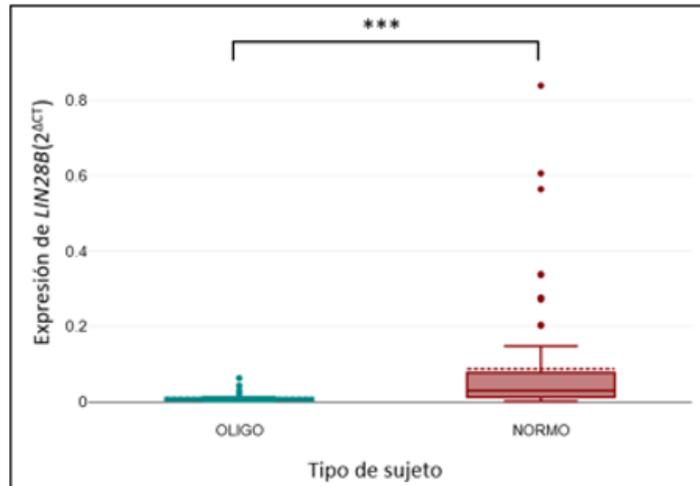
		Concentración espermática (millones/mL)	Cantidad total de espermatozoides (millones/eyaculado)	Motilidad grado A %	Morfología normal %	Vitalidad%
<i>LIN28B</i>	Coefficiente de correlación (r)	0,482	0,45	-0,005	-0,018	0,037
	Valor p	< 0,001	< 0,001	0,96	0,866	0,727



**Figura 3.** Correlación de la expresión del transcrito de *LIN28B* y parámetros de recuento seminal. (A) Correlación entre la expresión del transcrito *LIN28B* y la concentración espermática (millones/mL). (B) Correlación entre la expresión de *LIN28B* y la cantidad total de espermatozoides.

Así mismo, al agrupar a los sujetos de acuerdo con la clasificación de oligozoospermia dada por la OMS (29) (Anexo Tabla 1), observamos que los sujetos oligozoospermicos presentan

una expresión relativa de LIN28B significativamente más baja a los sujetos con recuento espermático normal ( $p < 0,001$ ) (Figura 4).



**Figura 4.** Expresión relativa de LIN28B en los sujetos clasificados como oligozoospermicos (<15 millones de espermatozoides/ml) o normozoospermicos ( $\geq 15$  millones de espermatozoides/m). (\*\*\*) =  $p < 0,001$ .

Por otra parte, la correlación de la expresión relativa de LIN28B con los niveles de FSH, LH y testosterona total no mostro significancia estadística. Mientras tanto, encontramos una correlación moderada del nivel de expresión de *LIN28B* con la edad de pubertad ( $r = -0,230$ ;  $P = 0,028$ ).

### 7.6 Análisis de asociación genética del variante rs7759938 con variables de la calidad seminal y niveles hormonales

La genotipificación de la variante rs7759938 se realizó por PCR alelo específica en DNA extraído de sangre periférica en los 150 sujetos incluidos en el estudio. El software TaqMan® Genotyper™ efectúa la discriminación alélica mediante la detección de la intensidad de los fluoróforos de las sondas que reconocen cada alelo. Se construyó un diagrama de discriminación alélica, en el cual se graficó la fluorescencia normalizada (*Rn*) para cada una de las sondas alelo-específicas para cada muestra (Figura 5). El software agrupa a las muestras y asigna un genotipo a cada grupo en base a la relación entre las *Rn* de ambas

sondas. Es decir, aquellas muestras que presentan una mayor intensidad correspondiente a la sonda marcada con el fluoróforo VIC® serán catalogadas como homocigota para el Alelo 1. Por otro lado, aquellas que tienen una fuerte intensidad del fluoróforo FAM® serán catalogadas como homocigota para el Alelo 2 y, en el caso de que exista fluorescencia para ambas sondas, la muestra será catalogada como heterocigota para los Alelos 1 y 2. En el caso del ensayo para rs7759938 el Alelo 1 corresponde a la variante C y el Alelo 2 a la variante T. Con el fin de corroborar la discriminación alélica provista por el software, se incluyeron en todos los experimentos controles homo y heterocigotas de muestras de DNA previamente secuenciadas, encontrando una concordancia en todos los experimentos.

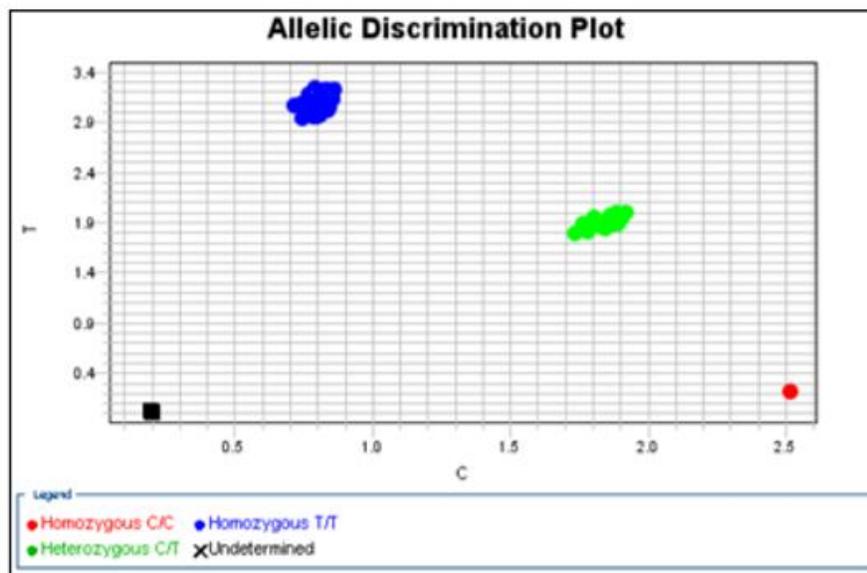


Figura 5. Ejemplo de diagrama de discriminación alélica presentado por StepOne™ software.

Para los 150 pacientes estudiados para la variante rs7759938 la frecuencia alélica de T fue del 74% y de C del 26%. En comparación a la base de datos Ensembl (31) se observó que nuestra población tiene una frecuencia alélica similar a una población americana mixta de 694 sujetos (T en un 72% y en C en un 28%).

En el caso de la frecuencia genotípica, 53,3% de los sujetos fueron homocigotos dominantes T/T, un 41,3% fue heterocigoto T/C y solo un 5,3% fue homocigoto recesivo C/C. Esto se ajusta a la frecuencia genotípica de la misma población americana mixta, con un 51,6% homocigoto dominante T/T, un 40,9% heterocigoto T/C y un 7,5% homocigoto recesivo C/C.

En este trabajo se analizó el polimorfismo de la variante rs7759938, donde el alelo C de menor frecuencia probablemente altere el riesgo de enfermedad. Como cada individuo posee una pareja de alelos, el riesgo asociado con cada genotipo podría depender del número de copias de C, lo que permite definir varios modelos de herencia posibles, con los cuales su verosimilitud se puede explorar mediante una adecuada codificación de los genotipos.

Dentro de los modelos analizados están:

- Modelo codominante: Es el más general. Cada genotipo proporciona un riesgo de enfermedad y no aditivo. Se comparan los heterocigotos TC y los homocigotos CC por separado respecto a los homocigotos TT.
- Modelo dominante: Una única copia de C es suficiente para alterar el riesgo, y ser portador de dos copias de C contempla una igual magnitud, por lo que heterocigotos TC y homocigotos CC tienen el mismo riesgo. Estos dos genotipos se comparan respecto a los homocigotos TT.
- Modelo recesivo: Son necesarias dos copias de C para modificar el riesgo. Se compara la combinación de heterocigoto TC y homocigoto TT respecto a los homocigotos CC.
- Modelo sobredominante: Se considera que los heterocigotos TC tienen una ventaja en modificar el riesgo de enfermedad. Se comparan los heterocigotos TC vs los homocigotos dominantes TT y recesivos CC.
- Modelo aditivo: Cada copia de C modifica el riesgo de una cantidad aditiva (en escala logarítmica); por lo que los homocigotos CC tienen el doble del riesgo que los

heterocigotos TC. Se compara la combinación ponderada (o alélica), donde sería 1 en los heterocigotos TC y 2 a los homocigotos CC.

#### 7.6.1 Análisis de asociación de la variante rs7759938 con parámetros de la calidad seminal

Con el fin de evaluar si la variante rs7759938 de LIN28B tiene efecto sobre la función espermatogénica del testículo (Objetivo específico 1) se realizó un análisis de asociación de la variante en distintos modelos genéticos y parámetros de la calidad seminal, i.e. concentración espermática, cantidad total de espermatozoides, porcentaje de motilidad progresiva, porcentaje de morfología normal, y porcentaje de vitalidad mediante el programa R usando el paquete SNPAssoc. Los resultados de estos análisis se encuentran en las Tablas 10 -14. No se encontró asociación significativa de los parámetros del semen con la variante rs7759938. Así mismo, la asociación genética no fue significativa al ajustar el análisis por los días de abstinencia antes de la toma de muestra seminal y por la edad del sujeto.

**Tabla 10.** Asociación entre la concentración espermática (millones/mL) y la variante rs7759938 en los distintos modelos genéticos.

	N	Media	DE	Valor P
Codominante				0,746
T/T	80	62,8	6,9	
T/C	62	72,0	10,9	
C/C	8	62,0	21,0	
Dominante				0,5
T/T	80	62,8	6,9	
T/C-C/C	70	70,9	9,9	
Recesivo				0,855
T/T-T/C	142	66,8	6,1	
C/C	8	62,0	21,0	
Sobredominante				0,443
T/T-C/C	88	62,8	6,5	
T/C	62	72,0	10,0	
log-aditivo				0,621
0,1,2				

Los valores muestran la media y DE de la concentración espermática (millones/mL)

**Tabla 12.** Asociación entre la % de Motilidad progresiva y la variante rs7759938 en los distintos modelos genéticos.

	N	Media	DE	Valor P
Codominante				0,307
T/T	80	56,1	2,0	
T/C	62	52,3	2,6	
C/C	8	61,3	5,8	
Dominante				0,369
T/T	80	56,1	2,0	
T/C-C/C	70	53,3	2,4	
Recesivo				0,328
T/T-T/C	142	54,5	1,6	
C/C	8	61,3	5,8	
Sobredominante				0,175
T/T-C/C	88	56,6	1,9	
T/C	62	52,3	2,6	
log-aditivo				0,702
0,1,2				

Los valores muestran la media y DE del porcentaje de motilidad progresiva

**Tabla 11.** Asociación entre la cantidad total de espermatozoides (millones/eyaculado) y la variante rs7759938 en los distintos modelos genéticos.

	N	Media	DE	Valor P
Codominante				0,853
T/T	80	172	18,6	
T/C	62	172	24,9	
C/C	8	210	92,5	
Dominante				0,886
T/T	80	172	18,6	
T/C-C/C	70	176	24,2	
Recesivo				0,572
T/T-T/C	142	172	15	
C/C	8	210	92,5	
Sobredominante				0,911
T/T-C/C	88	175	18,7	
T/C	62	172	24,9	
log-aditivo				0,739
0,1,2				

Los valores muestran la media y DE de la concentración espermática (millones/eyaculado)

**Tabla 13.** Asociación entre la Morfología espermática normal y la variante rs7759938 en los distintos modelos genéticos.

	N	Media	DE	Valor P
Codominante				0,695
T/T	80	2,20	0,2	
T/C	59	2,10	0,2	
C/C	7	2,71	0,7	
Dominante				0,912
T/T	80	2,20	0,2	
T/C-C/C	66	2,17	0,2	
Recesivo				0,427
T/T-T/C	139	2,16	0,2	
C/C	7	2,71	0,7	
Sobredominante				0,647
T/T-C/C	87	2,24	0,2	
T/C	59	2,10	0,2	
log-aditivo				0,846
0,1,2				

Los valores muestran la media de y DE del porcentaje de morfología normal

**Tabla 14.** Asociación entre la % de Vitalidad espermática y la variante rs7759938 en los distintos modelos genéticos.

	N	Media	DE	Valor P
<b>Codominante</b>				<b>0,344</b>
T/T	76	85,7	0,8	
T/C	61	83,7	1,3	
C/C	8	85,9	2,1	
<b>Dominante</b>				<b>0,198</b>
T/T	76	85,7	0,8	
T/C-C/C	69	83,9	1,1	
<b>Recesivo</b>				<b>0,732</b>
T/T-T/C	137	84,8	0,7	
C/C	8	85,9	2,1	
<b>Sobredominante</b>				<b>0,144</b>
T/T-C/C	84	85,8	0,8	
T/C	61	83,7	1,3	
<b>log-aditivo</b>				<b>0,347</b>
0,1,2				

Los valores muestran la media y DE del porcentaje de vitalidad.

Con el fin de determinar si la variante rs7759938 es un factor de riesgo de oligozoospermia en hombres que consultan por infertilidad, realizamos el análisis de asociación genética utilizando como variable dependiente la variable categórica que divide a los sujetos en Oligozoospermicos y Normozoospermicos. Los resultados de asociación expresados como Odd Ratio (OR) se muestran en la Tabla 15.

Si bien no se observa una asociación estadísticamente significativa entre los genotipos de rs7759938 y la condición de ser oligozoospermico o normozoospermico, se observa que el genotipo T/C estaría más representado en los sujetos oligozoospermicos en comparación con los sujetos normozoospermicos.

**Tabla 15.** Asociación entre pacientes oligozoospermicos y pacientes normozoospermicos, respecto a la variante de *LIN28B* rs7759938.

	NORMO		OLIGO		OR	lower	upper	valor p
<b>Codominante</b>	N	%	N	%				0,812
T/T	63	54,8	17	48,6	1,0			
T/C	46	40	16	45,7	1,3	0,6	2,8	
C/C	6	5,2	2	5,7	1,2	0,2	6,7	
<b>Dominante</b>								0,519
T/T	63	64,8	17	48,6	1,0			
T/C-C/C	52	45,2	18	51,4	1,3	0,6	2,7	
<b>Recesivo</b>								0,910
T/T-T/C	109	94,8	33	94,3	1,0			
C/C	6	5,2	2	5,7	1,1	0,2	5,7	
<b>Sobredominante</b>								0,549
T/T-C/C	69	60	19	54,3	1,0			
T/C	46	40	16	45,7	1,3	0,6	2,7	
<b>log-aditivo</b>								0,563
0,1,2	115	76,7	35	23,3	1,2	0,6	2,3	

#### 7.6.2 Análisis de asociación de la variante rs7759938 con parámetros hormonales

Con propósito de abordar el Objetivo específico 2, se realizó un análisis estadístico de asociación de la variante en distintos modelos genéticos con la concentración de testosterona sérica, concentración de LH, concentración de FSH y relación de testosterona/LH mediante el programa R usando el paquete SNPAssoc. Los resultados de estos análisis se encuentran en las Tablas 16-19.

No se encontró asociación significativa entre los niveles hormonales con la variante rs7759938 del gen *LIN28B*. El análisis de asociación genética con los niveles hormonales ajustado por hora de toma de muestra, el IMC y la edad tampoco mostró significancia estadística.

**Tabla 16.** Asociación entre la concentración de Testosterona y la variante rs7759938 en los distintos modelos genéticos.

	N	Media	DE	Valor P
Codominante				0,470
T/T	79	3,2	0,1	
T/C	61	3,4	0,1	
C/C	8	3,7	0,4	
Dominante				0,378
T/T	79	3,2	0,1	
T/C-C/C	69	3,4	0,1	
Recesivo				0,291
T/T-T/C	170	3,3	0,1	
C/C	8	3,7	0,4	
Sobredominante				0,683
T/T-C/C	87	3,3	0,1	
T/C	61	3,4	0,1	
log-aditivo				0,256
0,1,2				

Los valores muestran la media y DE de la concentración de testosterona (ng/mL)

**Tabla 17.** Asociación entre la concentración de LH y la variante rs7759938 en los distintos modelos genéticos.

	N	Media	DE	Valor P
Codominante				0,280
T/T	79	3,6	0,2	
T/C	61	4,1	0,3	
C/C	8	3,2	0,7	
Dominante				0,244
T/T	79	3,6	0,2	
T/C-C/C	69	4,0	0,3	
Recesivo				0,451
T/T-T/C	140	3,8	0,2	
C/C	8	3,2	0,7	
Sobredominante				0,126
T/T-C/C	87	3,5	0,2	
T/C	61	4,1	0,3	
log-aditivo				0,493
0,1,2				

Los valores muestran la media y DE de la concentración de LH (mUI/mL)

**Tabla 18.** Asociación entre la concentración de FSH y la variante rs7759938 en los distintos modelos genéticos.

	N	Media	DE	Valor P
Codominante				0,440
T/T	79	4,0	0,4	
T/C	61	5,0	0,8	
C/C	8	4,8	1,0	
Dominante				0,201
T/T	79	4,0	0,4	
T/C-C/C	69	5,0	0,7	
Recesivo				0,832
T/T-T/C	140	4,5	0,4	
C/C	8	4,8	1,0	
Sobredominante				0,231
T/T-C/C	87	4,1	0,3	
T/C	61	5,0	0,8	
log-aditivo				0,252
0,1,2				

Los valores muestran la media y DE de la concentración de FSH (mUI/mL)

**Tabla 19.** Asociación entre la relación de Testosterona/LH y la variante rs7759938 en los distintos modelos genéticos.

	N	Media	DE	Valor P
Codominante				0,675
T/T	79	3,9	0,2	
T/C	61	3,6	0,3	
C/C	7	4,1	0,7	
Dominante				0,515
T/T	79	3,9	0,2	
T/C-C/C	68	3,6	0,2	
Recesivo				0,668
T/T-T/C	140	3,7	0,2	
C/C	7	4,1	0,7	
Sobredominante				0,399
T/T-C/C	86	3,9	0,2	
T/C	61	3,6	0,3	
log-aditivo				0,692
0,1,2				

Los valores muestran la media y DE de la relación Testosterona/LH

7.6.3 Análisis de asociación genética de la variante rs7759938 con la expresión transcripcional de LIN28B en espermatozoides De acuerdo al Objetivo específico 3, con el fin de determinar si la variante rs7759938 afecta cuantitativamente la expresión transcripcional de *LIN28B*, se realizó el análisis estadístico de asociación de la variante con la abundancia del mRNA de *LIN28B* en espermatozoides de 93 pacientes (Tabla 20).

Se encontró una asociación cercana a la significancia en el modelo genético sobredominante ( $P=0,057$ ), en el cual se observa una tendencia a una menor concentración de *LIN28B* en los pacientes con genotipo T/C.

**Tabla 20.** Asociación entre la expresión de LIN28B espermática y la variante rs7759938.

	N	Media	DE	Valor P
<b>Codominante</b>				<b>0.155</b>
T/T	53	0.089	0.022	
T/C	37	0.036	0.009	
C/C	3	0.119	0.109	
<b>Dominante</b>				<b>0.100</b>
T/T	53	0.089	0.022	
T/C-C/C	40	0.043	0.011	
<b>Recesivo</b>				<b>0.521</b>
T/T-T/C	90	0.067	0.013	
C/C	3	0.118	0.109	
<b>Sobredominante</b>				<b>0.057</b>
T/T-C/C	56	0.09	0.022	
T/C	37	0.036	0.015	
<b>log-aditivo</b>				<b>0.213</b>
0,1,2				

Los valores muestran la media y DE de la expresión relativa de LIN28B en espermatozoides

## 8. Discusión

El objetivo principal de esta tesis fue estudiar la asociación de la variante génica rs7759938 de *LIN28B* con parámetros de la calidad seminal y el nivel de testosterona total sérica en una cohorte de 150 hombres que consultan por infertilidad. En los resultados presentados se puede observar que no se encontró una asociación significativa de la variante en estudio con los parámetros de calidad seminal como el recuento espermático, la cantidad total de espermatozoides, la motilidad progresiva, la morfología normal o la vitalidad. Similarmente, tampoco encontramos asociación con los niveles de las hormonas que permiten evaluar la función testicular como la testosterona, FSH y LH. Sin embargo, revisando una base de datos ampliada de la misma cohorte de sujetos, N=232, de los cuales 125 presentaron genotipo TT, 93 fueron heterocigoto TC y 14 con genotipo homocigoto CC (datos no publicados de nuestro laboratorio), se encontró una asociación cercana a la significancia de la variante con niveles de FSH más altos en el modelo dominante ( $P = 0,057$ ) y niveles de testosterona sérica más altos en el modelo recesivo ( $P = 0,069$ ). Estos resultados preliminares sugieren que un aumento de la cantidad de sujetos podría ser necesario para obtener asociaciones significativas.

El estudio de Leinonen et al. (23) analiza la asociación de la variante rs7759938 con los niveles séricos de testosterona de hombres adultos sanos utilizando una base de datos del Biobanco del Reino Unido con aproximadamente 176.000 sujetos. Los autores encontraron una asociación significativa del alelo C con niveles más bajos de testosterona. Si bien estos resultados son contrarios a nuestro hallazgo en la cohorte ampliada, la discrepancia podría deberse al relativamente bajo tamaño muestral de nuestro estudio comparado al citado estudio. Además, es posible que la diferencia en los resultados esté relacionada con las características de la población estudiada: la población del Biobanco de Reino Unido comprende en su mayoría hombres de entre 40 y 69 años, quienes podrían presentar niveles disminuidos de testosterona,

relacionado a la edad, mientras que nuestra población tiene una media de edad más joven (35 años).

Uno de los objetivos secundarios de esta tesis fue investigar la asociación de la variante rs7759938 con la expresión transcripcional de *LIN28B* en espermatozoides de sujetos que consultan por infertilidad. Se analizó la expresión de *LIN28B* en 93 pacientes, donde se encontró una asociación cercana al valor de significancia en el modelo sobredominante ( $P=0,057$ ). Estos resultados se condicen con los datos obtenidos de una base de datos más amplia de la misma cohorte donde se analizaron datos de expresión de 106 sujetos (resultados no publicados de nuestro laboratorio), donde también se observó una asociación cercana a la significancia ( $P=0,058$ ) en el modelo de herencia dominante. Se debe destacar que, dado el número acotado de sujetos estudiados y la frecuencia alélica del alelo menor, el número de sujetos con genotipo CC es muy bajo, lo cual no permite tener el poder estadístico para realizar comparaciones con este genotipo.

Dado que el SNP rs7759938 se encuentra en la región promotora de *LIN28B* (32 la presencia del polimorfismo afectaría de forma negativa la activación de la expresión transcripcional de *LIN28B*. Resultados similares se han reportado en un estudio de la expresión de *LIN28B* en tejido con cáncer de ovario, donde se demostró una asociación significativa entre rs7759938 y la expresión de *LIN28B* en el modelo genético dominante mostrando niveles de expresión más bajos en presencia de la variante alternativa (33). Utilizando el modelador ENCODE, los autores encuentran que la variante rs7759938 está ubicada en una región promotora *enhancer* y que la presencia de la variante alternativa de rs7759938 en esa región podría interrumpir los sitios de unión de los factores de transcripción en el supuesto promotor, afectando la activación (33).

Con el fin de investigar si los niveles de expresión de *LIN28B* se ven afectados por la variante rs7759938, el trabajo de Leinonen et al. (34), utilizó la base de datos de GTEx, que contiene

datos de expresión de mRNA de tejidos humanos y los genotipos, y encontró que la expresión de *LIN28B* en hipotálamo y en hipófisis está aumentada cuando el genotipo de rs7759938 es CC. Esto es relevante ya que la misma variante ha sido asociada con una edad de menarquía atrasada, y mujeres portadoras del genotipo CC muestran un aumento de la expresión de *LIN28B* en la hipófisis (35).

Por otro lado, utilizando la misma base de datos GTEx (16), se observó que, en testículo, el genotipo CC de la variante rs7759938 se asocia a una disminución en la expresión de *LIN28B*. Estos resultados coinciden con nuestros hallazgos, en que la abundancia del mRNA de *LIN28B* en espermatozoides está disminuida en los individuos con el genotipo TC de la variante rs7759938 en comparación con aquellos con el genotipo TT, lo que sugiere el efecto del alelo menor en la expresión de *LIN28B*.

El papel de *LIN28B* en la proliferación ha sido objeto de varios estudios que proporcionan evidencia de su relevancia en diferentes líneas celulares. En la línea celular de trofoblasto ACH-3P (36), se utilizó la técnica del shRNA para inducir la disminución de *LIN28B*, lo que resultó en el comienzo de la diferenciación de estas células (37). Al contrario, en otra línea celular de trofoblasto humano (HTR8/SVneo), la sobreexpresión de *LIN28B* llevó a un aumento en la proliferación, además de incrementar la migración e invasión celular (38). Adicionalmente, el estudio de West et al. (39) centrado en la regulación de la especificación y desarrollo de las células germinales de ratón, reveló que *LIN28B* no se expresa en las células germinales primordiales (PGC), pero sí se expresa en las células madre embrionarias (ESC). En este mismo estudio se evaluó el impacto de la pérdida de *Lin28B* en la formación de las PGC, concluyendo que *LIN28B* juega un papel importante en este proceso, al igual que su parólogo, *LIN28A*. Estos hallazgos respaldan el rol de *LIN28B* como factor regulador clave en diversos procesos celulares, incluyendo la proliferación, y lo posicionan como un regulador esencial para mantener

la pluripotencialidad y una diferenciación controlada de las PGC, y eventualmente en la población de espermatogonias en el testículo adulto.

Además, tanto LIN28B como su parólogo LIN28A han sido relacionados con la oncogénesis. En el estudio de Canfield et al. (38), se determinó que LIN28A y LIN28B estaban presentes en tumores malignos de origen de células germinales, como coriocarcinomas y carcinomas embrionarios, mientras que teratomas benignos y testículos normales no mostraban los altos niveles de expresión de LIN28A y LIN28B. El papel oncogénico de la vía LIN28B/let-7 se ha establecido en varios tipos de cáncer, donde la regulación positiva de LIN28B y la regulación negativa resultante de let-7 se correlacionaron con un mal pronóstico y tumores malignos avanzados (5).

Un hallazgo interesante que encontramos en esta tesis, aunque no formaba parte de los objetivos específicos, tiene relación con la asociación de la edad auto-informada de inicio de la pubertad con parámetros de la calidad seminal. En hombres, el evento puberal que determina el inicio de la pubertad es el aumento del volumen testicular sobre los 4 mL, evento referido como gonadarquía. Según datos publicados de la población chilena, la edad de gonadarquia es de  $10,8 \pm 1,8$  años(40).

En la presente tesis, encontramos una media de edad de inicio de la pubertad auto-informada de 13 años, lo cual sugiere que los pacientes recuerdan eventos más tardíos de la pubertad como el aumento del tamaño del pene, el desarrollo del vello púbico o el cambio de voz. Teniendo esto en cuenta categorizamos en 3 rangos los datos de la edad puberal auto-informada en el intervalo de 12 a 14 años, ya que en esta edad ocurre la aparición de los rasgos puberales tardíos, menos de 12 años y más de 14 años. Con esta perspectiva, observamos que los pacientes con un comienzo de cambios puberales mayor a 14 años tienden a presentar una disminución en la cantidad total de espermatozoides, lo que coincide con el estudio de Jensen

et al (4), consistió en una cohorte de 652 hombres daneses jóvenes y sanos, a quienes se les consultó si el inicio del crecimiento del pene y el desarrollo del vello púbico ocurrieron al mismo tiempo, antes o después que sus compañeros. Los autores observaron que el comienzo tardío de estos cambios puberales está asociado a una disminución en la concentración espermática y del recuento total de espermatozoides. Por otra parte, en esta tesis se encontró además una correlación inversa y significativa entre la edad puberal y la expresión de *LIN28B*, lo que tiene sentido pensando en que la edad puberal se asoció al recuento total de espermatozoides que, a su vez, está correlacionado a la expresión de *LIN28B*.

## 9. Conclusiones

En el presente estudio, la variante rs7759938 del gen *LIN28B* no mostró ser un determinante de parámetros de la calidad seminal y niveles hormonales en hombres con consultan por infertilidad. Sin embargo, analizando una cohorte ampliada de los mismos sujetos, se observó una tendencia a una asociación cercana a la significancia estadística con niveles de testosterona sérica más altos en el modelo recesivo y niveles de FSH más altos en el modelo dominante. Por otra parte, se encontró una correlación entre la expresión de *LIN28B* con la concentración espermática y el recuento total de espermatozoides y por lo tanto una expresión menor en los pacientes oligozoospermicos. También, se identificó una correlación inversa entre la edad puberal y la expresión de *LIN28B*.

Sabiendo que rs7759938 se localiza en el promotor de *LIN28B*, lo que podría afectar a su expresión, en nuestro estudio observamos que la variante rs7759938 se asocia con niveles más bajo de expresión de *LIN28B* en espermatozoides, y a su vez, la abundancia del transcrito se correlaciona inversamente con los parámetros del recuento espermático y con una edad puberal tardía. Estos hallazgos sugieren que *LIN28B* puede estar involucrado en la regulación de la proliferación espermatogonial, e indirectamente por su efecto sobre el desarrollo de la pubertad. Por lo tanto, es relevante continuar el estudio de la variante rs7759938 de *LIN28B* en un número más amplio de sujetos para confirmar o descartar las tendencias observadas en este estudio. De esta manera, se podrá obtener una comprensión más sólida del papel de *LIN28B* en la infertilidad y la función reproductiva, lo que potencialmente puede abrir nuevas vías para el diagnóstico y tratamiento de problemas de fertilidad.

## 10. Bibliografía

1. Bruce A WS. The Male Reproductive System. 2da ed. 2013;152.
2. O'Shaughnessy PJ. Hormonal control of germ cell development and spermatogenesis. Vol. 29, Seminars in Cell and Developmental Biology. Elsevier Ltd; 2014; 55–65.
3. Hayes FJ, Decruz S, Seminara SB, Boepple PA, Crowley WF. Differential Regulation of Gonadotropin Secretion by Testosterone in the Human Male: Absence of a Negative Feedback Effect of Testosterone on Follicle-Stimulating Hormone Secretion. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* Printed. 2001;86.
4. Jensen TK, Finne KF, Skakkebaek NE, Andersson AM, Olesen IA, Joensen UN, et al. Self-reported onset of puberty and subsequent semen quality and reproductive hormones in healthy young men. *Human Reproduction*. 2016;31(8):1886–94.
5. Viswanathan SR, Daley GQ. Lin28: A MicroRNA Regulator with a Macro Role. Vol. 140, *Cell*. Elsevier B.V. 2010; 445–9.
6. Nam Y, Chen C, Gregory RI, Chou JJ, Sliz P. Molecular basis for interaction of let-7 MicroRNAs with Lin28. *Cell*. 2011;147(5):1080–91.
7. Piskounova E, Polytarchou C, Thornton JE, Lapierre RJ, Pothoulakis C, Hagan JP, et al. Lin28A and Lin28B inhibit let-7 MicroRNA biogenesis by distinct mechanisms. *Cell*. 2011;147(5):1066–79.
8. Hafner M, Max KEA, Bandaru P, Morozov P, Gerstberger S, Brown M, et al. Identification of mRNAs bound and regulated by human LIN28 proteins and molecular requirements for RNA recognition. *RNA*. 2013;19(5):613–26.
9. Wang Y, Hu X, Greshock J, Shen L, Yang X, Shao Z, et al. Genomic DNA Copy-Number Alterations of the let-7 Family in Human Cancers. *PLoS One*. 6 de septiembre de 2012;7(9).
10. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*. 2005;120(5):635–47.
11. Yong SL, Dutta A. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev*. 2007;21(9):1025–30.
12. Men Y, Fan Y, Shen Y, Lu L, Kallen AN. The steroidogenic acute regulatory protein (StAR) is regulated by the H19/let-7 axis. *Endocrinology*. 2017;158(2):402–9.
13. Sangiao-Alvarellos S, Manfredi-Lozano M, Ruiz-Pino F, Navarro VM, Sánchez-Garrido MA, Leon S, et al. Changes in hypothalamic expression of the Lin28/let-7 system and related MicroRNAs during postnatal maturation and after experimental manipulations of puberty. *Endocrinology*. 2013;154(2):942–55.
14. Gaytan F, Sangiao-Alvarellos S, Manfredi-Lozano M, García-Galiano D, Ruiz-Pino F, Romero-Ruiz A, et al. Distinct expression patterns predict differential roles of the mirna-binding proteins, lin28 and lin28b, in the mouse testis: Studies during postnatal development and in a model of hypogonadotropic hypogonadism. *Endocrinology*. 2013;154(3):1321–36.

15. Sangiao-Alvarellos S, Manfredi-Lozano M, Ruiz-Pino F, León S, Morales C, Cordido F, et al. Testicular expression of the Lin28/let-7 system: Hormonal regulation and changes during postnatal maturation and after manipulations of puberty. *Sci Rep*. 2015;5.
16. The Genotype-Tissue Expression Project. GTEx Portal [Internet]. [gtexportal.org](http://gtexportal.org).
17. Cousminer DL, Stergiakouli E, Berry DJ, Ang W, Groen-Blokhuis MM, Körner A, et al. Genome-wide association study of sexual maturation in males and females highlights a role for body mass and menarche loci in male puberty. *Hum Mol Genet*. 2014;23(16):4452–64.
18. Ong KK, Elks CE, Li S, Zhao JH, Luan J, Andersen LB, et al. Genetic variation in LIN28B is associated with the timing of puberty. *Nat Genet*. 2009;41(6):729–33.
19. Perry JRB, Stolk L, Franceschini N, Lunetta KL, Zhai G, McArdle PF, et al. Meta-analysis of genome-wide association data identifies two loci influencing age at menarche. *Nat Genet*. 2009;41(6):648–50.
20. Hollis B, Day FR, Busch AS, Thompson DJ, Luiza A, Soares G, et al. Expanded genomic analyses for male voice-breaking highlights a shared phenotypic and genetic basis between puberty timing and hair colour. The PRACTICAL Consortium.
21. Elks CE, Perry JRB, Sulem P, Chasman DI, Franceschini N, He C, et al. Thirty new loci for age at menarche identified by a meta-analysis of genome-wide association studies. *Nat Genet*. 2010;42(12):1077–85.
22. Busch AS, Hagen CP, Assens M, Main KM, Almstrup K, Juul A. Differential impact of genetic loci on age at thelarche and menarche in healthy girls. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2018;103(1):228–34.
23. Leinonen JT, Chen YC, Pennonen J, Lehtonen L, Junna N, Tukiainen T, et al. LIN28B affects gene expression at the hypothalamic-pituitary axis and serum testosterone levels. *Sci Rep*. 2019;9(1).
24. Levine H, Jørgensen N, Martino-Andrade A, Mendiola J, Weksler-Derri D, Mindlis I, et al. Temporal trends in sperm count: A systematic review and meta-regression analysis. *Hum Reprod Update*. 2017;23(6):646–59.
25. Tüttelmann F, Ruckert C, Röpke A. Spermatogenesestörungen: Perspektiven für erweiterte genetische Diagnostik nach 20 Jahren unveränderter Routine. *Medizinische Genetik*. Springer Verlag; 2018;30; 12–20.
26. Hotaling J et al. Clinical genetic testing for male factor infertility: current applications and future directions. *Andrology*. 2014; 3(2):339-350.
27. Castro A, Codner E, Kaune H, Lopez P, Vantman D, Cassorla F. Absence of Y Chromosome Microdeletions in Patients with Cryptorchidism and Hypospadias. *London Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism*. 2004; 17.
28. Lardone MC, Piottante A, Valdevenito R, Ebensperger M, Castro A. Histological and hormonal testicular function in oligo/azoospermic infertile men. *Andrologia*. 2013;45(6):379–85.

29. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5a ed. Ginebra, Suiza; 2009.
30. Goodrich RJ, Anton E, Krawetz SA. Isolating mRNA and Small Noncoding RNAs from Human Sperm. 2013. 385–96.
31. Ensembl.org
32. Álvarez-Álvarez MM, Carreras-Torres R, Zanetti D, Vegas E, Moral P. Population variation of LIN28B in the Mediterranean: Novel markers for microgeographic discrimination. *American Journal of Human Biology*. 2016;28(6):905–12.
33. Lu L, Katsaros D, Mayne ST, Risch HA, Benedetto C, Canuto EM, et al. Functional study of risk loci of stem cell-associated gene lin-28B and associations with disease survival outcomes in epithelial ovarian cancer. *Carcinogenesis*. 2012;33(11):2119–25.
34. Leinonen JT, Chen YC, Tukiainen T, Panula P, Widén E. Transient modification of lin28b expression - Permanent effects on zebrafish growth. *Mol Cell Endocrinol*. 2019;479:61–70.
35. Day FR, Thompson DJ, Helgason H, Chasman DI, Finucane H, Sulem P, et al. Genomic analyses identify hundreds of variants associated with age at menarche and support a role for puberty timing in cancer risk. *Nat Genet*. 1 de junio de 2017;49(6):834–41.
36. Hiden U, Prutsch N, Gauster M, Weiss U, Frank HG, Schmitz U, et al. The first trimester human trophoblast cell line ACH-3P: A novel tool to study autocrine/paracrine regulatory loops of human trophoblast subpopulations - TNF- $\alpha$  stimulates MMP15 expression. *BMC Dev Biol*. 2007;7.
37. West RC, McWhorter ES, Ali A, Goetzman LN, Russ JE, Gonzalez-Berrios CL, et al. HMGA2 is regulated by LIN28 and BRCA1 in human placental cells. *Biol Reprod*. 2019;100(1):227–38.
38. Canfield J, Arlier S, Mong EF, Lockhart J, VanWye J, Guzeloglu-Kayisli O, et al. Decreased LIN28B in preeclampsia impairs human trophoblast differentiation and migration. *FASEB Journal*. 2019;33(2):2759–69.
39. West JA, Viswanathan SR, Yabuuchi A, Cunniff K, Takeuchi A, Park IH, et al. A role for Lin28 in primordial germ-cell development and germ-cell malignancy. *Nature*. 2009;460(7257):909–13.
40. Lardone MC, Busch AS, Santos JL, Miranda P, Eyheramendy S, Pereira A, et al. A Polygenic Risk Score Suggests Shared Genetic Architecture of Voice Break With Early Markers of Pubertal Onset in Boys. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2020;105(3).

## 11. Anexos

**Anexo 1:** Límites de referencia para las características del semen. Extraído del Manual de Laboratorio para la Examinación y Procesamiento de Semen Humano, OMS 5ta ed. (29)

Parameter	Lower reference limit
Semen volume (ml)	1.5 (1.4–1.7)
Total sperm number ( $10^6$ per ejaculate)	39 (33–46)
Sperm concentration ( $10^6$ per ml)	15 (12–16)
Total motility (PR + NP, %)	40 (38–42)
Progressive motility (PR, %)	32 (31–34)
Vitality (live spermatozoa, %)	58 (55–63)
Sperm morphology (normal forms, %)	4 (3.0–4.0)
Other consensus threshold values	
pH	$\geq 7.2$
Peroxidase-positive leukocytes ( $10^6$ per ml)	$< 1.0$
MAR test (motile spermatozoa with bound particles, %)	$< 50$
Immunobead test (motile spermatozoa with bound beads, %)	$< 50$
Seminal zinc ( $\mu\text{mol}$ /ejaculate)	$\geq 2.4$
Seminal fructose ( $\mu\text{mol}$ /ejaculate)	$\geq 13$
Seminal neutral glucosidase (mU/ejaculate)	$\geq 20$

Anexo 2: Acta de aprobación del Proyecto FONDECYT 11200898 del comité de ética de investigación en seres humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE MEDICINA  
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS

## ACTA DE APROBACIÓN DE PROYECTO

[Documento en versión 2 corregida 28.05.2018]

Con fecha 28 de Octubre 2020, el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, integrado por los siguientes miembros:

Dr. Manuel Oyarzún G., Médico Neumólogo, Presidente  
Dra. Lucía Cifuentes O., Médico Genetista, Vicepresidente Subrogante  
Sra. Claudia Marshall F., Educadora, Representante de la comunidad.  
Dra. Grisel Orellana, Médico Neuropsiquiatra  
Prof. Julieta González B., Bióloga Celular  
Dra. María Angela Delucchi Biccocchi, Médico Pediatra Nefrólogo.  
Dr. Miguel O’Ryan, Médico Infectólogo  
Dra. María Luz Bascuñán Psicóloga PhD, Prof. Asociado  
Sra. Karima Yarmuch G., Abogada  
Srta. Javiera Cobo R., Nutricionista, Secretaria Ejecutiva  
Prof. Veronica Aliaga C., Kinesióloga, Magister en Bioética, Prof. Asociado  
Dr. Dante Caceres L., Medico Veterinario, Doctor en Salud Publica, Prof. Asociado

Ha revisado el Proyecto de Investigación titulado: **“THE ROLE OF LIN28B POLYMORPHISMS IN HUMAN TESTICULAR FUNCTION”**, Cuyo investigador responsable es la Dra. Cecilia Lardone, quien desempeña labores en el Instituto de Investigaciones Materno Infantil (idimi) Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

El Comité revisó los siguientes documentos del estudio:

- Proyecto Concursable Fondecyt Iniciación
- Cv del Investigador
- Consentimiento informado
- Carta Compromiso del investigador para comunicar los resultados del estudio una vez finalizado este

El proyecto y los documentos señalados en el párrafo precedente han sido analizados a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de las Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos CIOMS 2016, y de las Guías de Buena Práctica Clínica de ICH 1996.

Teléfono: 29789536 - Email: comiteceish@med.uchile.cl



Anexo 3: Consentimiento informado para los sujetos del estudio:



**CONSENTIMIENTO INFORMADO - IDIMI  
PROYECTO FONDECYT INICIACIÓN N° 11200898**

**TÍTULO DEL PROYECTO:** "PARTICIPACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN *LIN28B* EN LA FUNCIÓN TESTICULAR HUMANA".

**INVESTIGADOR PRINCIPAL:** María Cecilia Lardone, Instituto de Investigaciones Materno Infantil (IDIMI), Av. Santa Rosa 1234 2º piso, Santiago. Teléfonos: +56 229770850/0867 (horario de atención lunes a viernes de 9 a 17 h), móvil: +56992598118. E-mail: [mlardone@med.uchile.cl](mailto:mlardone@med.uchile.cl)

**PATROCINIO:** AGENCIA NACIONAL DE INVESTIGACION Y DESARROLLO (ANID).

**INVITACIÓN A PARTICIPAR:** Usted está siendo invitado a participar en forma voluntaria en esta investigación y mediante este Consentimiento Informado le explicaremos en qué consiste. Para asegurarnos que usted está informado sobre su participación en esta investigación, le solicitamos que lea este documento detenidamente y que lo firme si está de acuerdo en participar.

En caso que Ud. decida no participar en este estudio o se arrepienta de participar en cualquier momento de esta investigación Ud. no tendrá que dar explicaciones y su atención médica no sufrirá ninguna consecuencia desfavorable. Así mismo, si Ud. decide retirarse del estudio en cualquier momento del mismo sus muestras no serán usadas y serán desechadas.

**PROPÓSITO DE LA INVESTIGACIÓN:** Estudiar la presencia de variaciones comunes en la secuencia del gen *LIN28B* (polimorfismos) y su expresión en espermatozoides, lo que ayudará a comprender su participación en la disminución de la producción de espermatozoides en individuos infértiles (oligozoospermicos). El gen *LIN28B* está relacionado con la función del testículo, tanto en la producción de las hormonas masculinas como la testosterona, así como en la producción de los espermatozoides.

Con el propósito que el grupo de investigadores del Instituto de Investigaciones Materno Infantil (IDIMI), puedan investigar sobre la(s) causa(s) de la infertilidad se reclutaran un total de 460 pacientes con calidad seminal normal (normozoospermicos) y calidad seminal reducida (oligozoospermicos).

Consentimiento Informado FONDECYT N° 11200898



28 OCT 2020

Pag 1



Universidad de Chile  
Facultad de Medicina



En caso que Ud. acepte participar en este estudio, su contribución consistirá en:

**1. Donación de muestra de semen:** Dado que Ud. asiste al IDIMI para realizar un estudio de la calidad del semen o espermiograma, indicado por su médico tratante, Ud. acepta donar una porción de la muestra seminal para realizar el estudio de expresión de genes (sólo con propósito de esta investigación) y verificar su calidad seminal de normozoospermia (número normal de espermatozoides en el semen) u oligozoospermia (número reducido de espermatozoides en el semen). En el caso que el examen de calidad seminal muestre ausencia de espermatozoides o un número menor a 2,5 millones de espermatozoides/ml, no se procederá a guardar una porción de la muestra de semen.

**2. Extracción de muestra de sangre del brazo** (equivalente a 1 cucharada sopera) que se tomará en el IDIMI en horas de la mañana y no necesita estar en ayunas. Este procedimiento durará alrededor de 15 minutos. En esta muestra de sangre se realizara:

2.1 Análisis de variantes genéticas comunes.

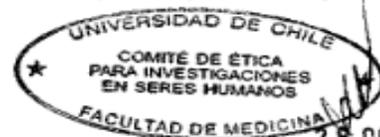
2.2 Hormonas (FSH, LH y Testosterona): Es un examen que se realiza de forma habitual a los pacientes infértiles. Sin embargo, se realizará con el fin que el grupo de investigadores evalúen su condición hormonal y cuenten con resultados de un mismo laboratorio.

2.3 Microdeleciones del cromosoma Y: Es la causa genética conocida más frecuente de falla completa o parcial de la producción testicular de espermatozoides (alrededor de un 10% de los pacientes con azoospermia u oligozoospermia severa la padece) y consiste en la pérdida de genes del cromosoma Y. El fin de este estudio genético es verificar la ausencia de esta alteración en los participantes de esta investigación y será realizado a los participantes que tengan una concentración de espermatozoides menor a 5 millones por mL de semen. En caso que este estudio demuestre que Ud. tiene microdeleciones del cromosoma Y le aconsejamos consulte respecto del significado de este hallazgo a su médico tratante y/o a algún especialista en genética humana (Servicio de genética del Hospital Clínico de la Universidad de Chile), dado que esta alteración será transmitida a sus hijos varones.

2.4 Análisis del número y morfología de los cromosomas (cariograma): Alteraciones en este estudio se detectan en un número bajo de pacientes con azoospermia u oligozoospermia severa y por lo tanto, este estudio sólo se realiza de manera ocasional en la evaluación del hombre infértil. El fin de este estudio genético es verificar la ausencia de esta alteración en los participantes de esta investigación y será realizado a los participantes que tengan una concentración de espermatozoides menor a 5 millones por mL de semen. En caso que Ud. presente alguna alteración

Consentimiento Informado FONDECYT N° 11200898

Pag 2





Universidad de Chile  
Facultad de Medicina



en el resultado de su cariograma le aconsejamos consulte a su médico tratante y/o a algún especialista en genética humana (Servicio de genética del Hospital Clínico de la Universidad de Chile), respecto de cómo esto podría afectar a su descendencia o al resultado de su eventual tratamiento médico.

**3. Consulta con médico Urólogo:** Si fuere necesario, Ud. será citado con un médico urólogo especialista en infertilidad masculina del IDIMI para corroborar sus antecedentes clínicos y realizar una completa evaluación andrológica.

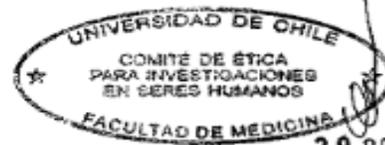
**Riesgos:** La obtención de las muestras de sangre y de semen requeridas para esta investigación no significa un riesgo extra para su salud, ni interferirá con su tratamiento médico. La toma de muestra de sangre del brazo ocasionalmente puede causar inflamación o un pequeño hematoma local de efecto leve y transitorio.

**Beneficios:** Ud. recibirá el informe escrito con las determinaciones hormonales en sangre (FSH, LH, Testosterona). Además, su participación en este estudio le otorga la posibilidad de realizarse una evaluación clínica más completa y exámenes de aspectos genéticos importantes para el estudio de pacientes con oligozoospermia severa (Microdeleciones del cromosoma Y y cariograma). Por otra parte, su valiosa participación contribuirá a identificar factores de riesgo de la infertilidad masculina y, colaborar en la búsqueda de soluciones para revertir los efectos de estas variantes genéticas en hombres infértiles.

**Confidencialidad:** Tanto su participación como la información obtenida en este estudio serán anónimas, confidenciales y sólo podrán darse a conocer en publicaciones científicas sin revelar su nombre o datos que pueden identificarlo. Asimismo, la información contenida en su ficha clínica sólo será conocida por su médico y por los investigadores del proyecto y no se difundirá sin su previo conocimiento.

**Costo:** El costo de los estudios propios del proyecto de investigación corren por cuenta del proyecto, así como las determinaciones de hormonas, el estudio de microdeleciones del cromosoma Y y el cariograma, previamente mencionadas. Los resultados de los mismos serán entregados a Ud. o a su médico tratante. Por lo tanto, Ud. no incurrirá en ningún gasto adicional y sólo deberá financiar por su cuenta aquello que haya sido indicado por su médico tratante para su tratamiento médico (por ejemplo: espermiograma, exámenes de calidad seminal adicionales, laboratorio de recuperación espermática, hospitalización, etc). En el caso de requerir un segundo examen de espermiograma para confirmar el resultado de la calidad seminal, éste será sin costo para Ud.

Consentimiento Informado FONDECYT N° 11200898



Pag 3

28 OCT 2020



Universidad de Chile  
Facultad de Medicina



**Complicaciones:** En el caso poco probable que ocurriese algún efecto adverso producto de la toma de muestra en el brazo, como infección o inflamación, el tratamiento se financiará con recursos del proyecto y sin costo para el paciente.

**Usos potenciales:** En caso que quedara material sobrante extraído de sus muestras de sangre y/o semen, ¿autoriza Ud. que la investigadora de este estudio utilice este material sobrante para un eventual estudio de la misma línea de investigación, siguiendo las pautas de confidencialidad descritas?. Marque su preferencia SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_  
En caso de que Ud. responda NO, estas muestras serán eliminadas.

**Derechos del participante:** A Ud. se le entregará una copia firmada de este documento de Consentimiento Informado. En caso de tener alguna duda relacionada a este estudio Ud. podrá dirigirse al investigador principal (Dra. María Cecilia Lardone, de profesión Bioquímica). Para resolver cualquier duda acerca de sus derechos como participante en este estudio, Ud. podrá dirigirse al presidente del Comité de Ética en Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, con oficina ubicada en Av. Independencia 1027, Comuna de Independencia, a un costado de la Biblioteca Central de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Email: [comiteceish@med.uchile.cl](mailto:comiteceish@med.uchile.cl).

**Conclusión:** Después de haber leído este Consentimiento Informado y haber aclarado todas sus dudas Ud. acepta participar en la investigación titulada, "Participación de los polimorfismos del gen *LIN28B* en la función testicular humana"

Nombre Completo del participante: .....

RUT: ..... Fecha: .....

Firma: .....

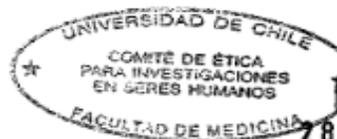
Nombre del profesional que obtuvo este consentimiento: .....

RUT: ..... Fecha: .....

Firma: .....

Nombre y firma del Director del IDIMI: .....

Consentimiento Informado FONDECYT N° 11200898



28 OCT 2020