

**D<sup>a</sup>. MIRIAM E. QUIROGA ESCUDERO, SECRETARIA  
DEL DEPARTAMENTO DE EDUCACIÓN FÍSICA DE  
LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN  
CANARIA,**

## **CERTIFICA,**

Que la Comisión de Investigación del Departamento en su sesión de fecha 21 de mayo de 2015, tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada "*Influencia del polimorfismo del receptor de andrógenos en la masa ósea, masa muscular y condición física en niños y niñas*" presentada por la doctoranda D<sup>a</sup>. Lorena Rodríguez García, dirigida por los doctores D<sup>a</sup>. Cecilia Dorado García, D<sup>a</sup>. Amelia Guadalupe Grau y D. José A. López Calbet.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Art. 73.2 del Reglamento de Estudios de Doctorado de esta Universidad, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a veintidós de mayo de dos mil quince.

P.S.  
  


# TESIS DOCTORAL



Departamento: EDUCACIÓN FÍSICA

Programa de Doctorado: "ACTIVIDAD FÍSICA, SALUD Y RENDIMIENTO DEPORTIVO"

## **Título de la Tesis**

***"INFLUENCIA DEL POLIMORFISMO DEL  
RECEPTOR DE ANDRÓGENOS EN LA MASA ÓSEA, MASA MUSCULAR Y  
CONDICIÓN FÍSICA EN NIÑOS Y NIÑAS."***

Tesis Doctoral presentada por D<sup>a</sup>. Lorena Rodríguez García

Dirigida por:

Dra. D<sup>a</sup>. Cecilia Dorado García

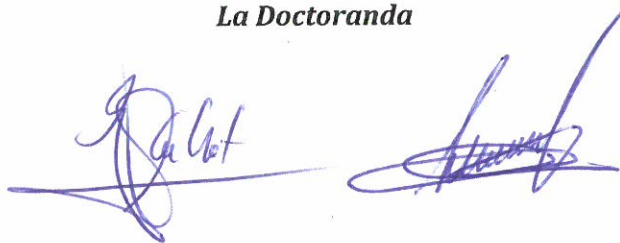
Dra. D<sup>a</sup>. Amelia Guadalupe Grau

Dr. D. José Antonio López Calbet

***Los Directores***



***La Doctoranda***



En Las Palmas de Gran Canaria, a 13 de Mayo de 2015.

## CONTENIDOS

<b>Agradecimientos</b> .....	<b>3</b>
<b>Lista de publicaciones originales</b> .....	<b>7</b>
<b>Fuentes de financiación</b> .....	<b>8</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>9</b>
<b>Resumen general</b> .....	<b>13</b>
<b>Summary</b> .....	<b>16</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>21</b>
1.1. Tejido óseo.....	22
1.1.1. Características generales.....	22
1.1.2. Estructura del hueso durante el crecimiento.....	24
1.1.3. Proceso de remodelado óseo en el crecimiento.....	24
1.1.4. Efectos del ejercicio durante el crecimiento óseo.....	26
1.2. Tejido muscular.....	27
1.2.1. Características generales.....	27
1.2.2. Efectos del ejercicio en el tejido muscular durante el crecimiento.....	28
1.3. Tejido adiposo.....	29
1.3.1. Características generales.....	29
1.3.2. Efectos del ejercicio en el tejido adiposo durante el crecimiento.....	29
1.4. Andrógenos y Testosterona.....	30
1.5. Polimorfismo del receptor de andrógenos.....	30
1.5.1. Mecanismo de acción clásico o genómico del receptor de andrógenos.....	33
1.6. Efectos del polimorfismo del receptor de andrógenos en el crecimiento.....	34
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>39</b>

<b>3. Hipótesis</b> .....	<b>40</b>
<b>4. Metodología</b> .....	<b>43</b>
4.1. Sujetos.....	43
4.2. Composición corporal.....	45
4.2.1. Antropometría.....	45
4.2.2. Absorciometría fotónica dual de rayos x.....	45
4.3. Condición física.....	46
4.3.1. Capacidad de salto.....	46
4.3.2. Capacidad anaeróbica.....	46
4.3.3. Capacidad aeróbica máxima.....	46
4.3.4. Test de velocidad de carrera.....	47
4.3.5. Test de oxidación máxima de grasa (MFO): calorimetría indirecta.....	47
4.4. Muestras de saliva.....	48
4.4.1. Aislamiento de ADN mediante saliva y reacción en cadena de lapolimerasa (PCR) para la medición de los polimorfismos CAG y GGN del gen del receptor de andrógenos.....	48
4.5. Consentimientos y aprobación ética.....	49
4.6. Estadística.....	49
<b>5. Resultados</b> .....	<b>53</b>
5.1. Resumen de los resultados del artículo I (En revisión).....	53
5.2. Resumen de los resultados del artículo II (En revisión).....	54
5.3. Resumen de los resultados del artículo III (En revisión).....	55
<b>6. Discusión</b> .....	<b>61</b>
<b>7. Conclusiones</b> .....	<b>73</b>
<b>8. Bibliografía</b> .....	<b>79</b>
<b>9. Anexos</b> .....	<b>91</b>

## **Agradecimientos**

Los estudios en los que se basa esta tesis nunca hubieran podido ser realizados sin la ayuda del grupo de investigación de “Rendimiento Humano, Ejercicio físico y Salud” del Departamento de Educación Física de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

En primer lugar me gustaría agradecer a la profesora **Cecilia Dorado** por darme la oportunidad de trabajar y de formar parte del grupo de investigación de Rendimiento Humano, así como a escoger el camino correcto para crecer en mi carrera profesional.

Gracias a **José Antonio López Calbet** por despertar en mi lo que significa el mundo de la investigación y por permitirme trabajar en su grupo de investigación de Rendimiento Humano, donde he podido formarme y superarme cada día más y sobre todo aprender a valorar que con esfuerzo se consigue todo en esta vida.

En especial, quiero agradecer a **Amelia Guadalupe**, por brindarme a cualquier hora del día su ayuda, a enseñarme cada una de las técnicas que he aprendido transmitiéndome todos sus conocimientos adquiridos en todos estos años para llegar a ser una gran investigadora. Y sobre todo, darte las gracias por ser una gran amiga tanto dentro como fuera del grupo de investigación y darme tu mano para levantarme cuando lo he necesitado. Muchísimas gracias.

A **Jesús Ponce**, por demostrarme en estos años que siempre que te he necesitado has estado ahí para hacerme este camino más fácil y seguir adelante en los momentos más difíciles. Muchas gracias por tu amistad y por compartir tus conocimientos como investigador conmigo.

A **Teresa Fuentes**, por enseñarme a trabajar en equipo y a no perder nunca la alegría y la ilusión que siempre transmites. Eres una gran persona y una gran amiga. Muchas gracias.

A **Borja Guerra**, por enseñarme hacer mi primer Western blot e introducirme en las técnicas de biología molecular.

A **Hugo Olmedillas**, por haberme prestado su ayuda desde el primer día y hacer que mi entrada al laboratorio fuese mucho más fácil, teniendo siempre un buen consejo que darme.

A **Alfredo Santana**, agradecerte tu confianza depositada en mí para formarme en diferentes técnicas de biología molecular y de permitirme trabajar a tu lado en tu laboratorio. Muchísimas gracias.

A **José Losa**, por ayudarme y enseñarme todos los trucos informáticos habidos y por haber. Gracias por tu amistad.

Agradecer a **Bonifacio Nicolás Díaz Chico**, su ayuda en la medición de los polimorfismos y por tener el placer de compartir nuestras raíces de Fasnía en el mundo de la investigación. Muchas gracias por ayudarme y guiarme en este largo camino.

A **Rafael Sánchez**, por ser un gran compañero y por prestarme su ayuda en cualquier momento que lo he necesitado.

A **David Morales**, por compartir estos años de investigación en el grupo de Rendimiento Humano.

A **José Navarro**, por darme siempre buenos consejos y enseñarme día a día a trabajar sin dejar nada fuera de su lugar. Gracias por facilitarnos los medios técnicos en el laboratorio.

A **Ismael Pérez**, por ser el futuro del laboratorio y siempre tener disposición para colaborar en todo y muchas ganas de querer aprender.

A **Macame**, por su colaboración y por compartir sus conocimientos como técnico, y sobre todo por su gran amabilidad en hacer que el trabajo sea mucho más llevadero. Muchas Gracias.

A **Esther** y a **Yanira**, de la Unidad de Investigación del Hospital Dr. Negrín por acogerme como parte de su grupo y compartir sus conocimientos conmigo, y sobre todo por llevarme una gran amistad.

Gracias a **Pilar** y a **Germán** por ayudarme a medir los polimorfismos y sacar el trabajo adelante en el menor tiempo posible.

Especial agradecimiento a mi tutora de estancia **Eva Blomstrand**, “en la Escuela Sueca del Deporte y Ciencias de la Salud” por hacerme sentir como en casa y enseñarme su forma de trabajar en el mundo de la investigación.

A **Juan José González**, por enseñarme sus conocimientos de estadística y por sus buenos consejos y ánimos para llegar a la recta final.

A **José Antonio Serrano**, por enseñarme a exportar los datos de los cuestionarios IPAQ.

Agradecer a **David, Pedro, Andrea y Marta** por venir con esas ganas y energías de aprender y contribuir a sacar el trabajo diario en el laboratorio.

Gracias al resto de profesores miembros del grupo de investigación del Rendimiento Humano, **Joaquín Sanchís, Javier Chavarren** y **Rafael Arteaga**.

En especial agradecer la colaboración de **todos los sujetos** que participaron en los estudios de esta tesis ya que sin ellos este trabajo no se hubiese llevado a cabo, así como a la **Universidad de Las Palmas de Gran Canaria** y en especial a todo el personal de Administración (**Mila, Carmelo y Anselmo**) por darme siempre ánimos y sacarme una sonrisa en los momentos más difíciles. También agradecer al equipo de **Vicerrectorado de Investigación**, al **Departamento de Educación Física** y a los servicios de **Conserjería** de la Facultad de Educación Física.

Agradecimientos en especial a **mis amigos** que han estado ahí apoyándome en todos estos años para verme cumplir mi sueño y por acabar lo que un día empecé. Gracias por los ánimos y las fuerzas transmitidas para luchar y conseguir mi objetivo, sin ustedes este camino no hubiese sido igual **Eliezer**,

**Carmen, Azahara, Dafne, Laura, Anita, Gema...** y muchos más. Muchísimas gracias.

En especial quiero agradecer a **Marta** por apoyarme y darme las fuerzas necesarias para que llegara a la recta final. Muchísimas gracias.

Y por último quiero agradecer a lo que más quiero en esta vida, a **mi familia** y en especial a **mis padres y a mi hermano**, que sé que para ellos no ha sido nada fácil, desde la distancia, motivarme y animarme en los días más duros de esta etapa para que luchara y me esforzara por terminar este camino que un día elegí. Gracias por haber confiado siempre en mí y apoyarme en todas mis decisiones.

Muchas gracias a todos.



## Lista de publicaciones originales

La presente tesis se basa en las siguientes publicaciones:

### Artículo I:

**Lorena Rodríguez-García**, Jesús G. Ponce-González, Juan J González-Henríquez, Francisco G. Rodríguez-González, Bonifacio N Díaz-Chico, José A L Calbet, Cecilia Dorado, Amelia Guadalupe-Grau. (2015).

*Androgen receptor CAG and GGN repeat polymorphisms are associated with performance in boys and girls. (En revisión).*

### Artículo II:

**Lorena Rodríguez-García**, Jesús G. Ponce-González, Juan J González-Henríquez, Francisco G. Rodríguez-González, Bonifacio N Díaz-Chico, José A Serrano-Sánchez, José A L Calbet, Cecilia Dorado, Amelia Guadalupe-Grau. (2015).

*Androgen receptor CAG and GGN repeat polymorphisms and bone mass in boys and girls. (En revisión).*

### Artículo III:

Jesús G. Ponce-González, **Lorena Rodríguez-García**, José Losa-Reyna, Amelia Guadalupe-Grau, Francisco G. Rodríguez-González, Bonifacio N Díaz-Chico, Cecilia Dorado, José A Serrano-Sánchez, José A L Calbet. (2015).

*Androgen receptor gene CAG and GGN repeat polymorphism influence fat accumulation: a longitudinal study from adolescence to adult age. (En revisión).*

### **Fuentes de financiación**

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la concesión de la beca: “Investigación de Postgrado en Temas de Interés para la isla de Gran Canaria del Servicio de Educación y Universidad del Cabildo de Gran Canaria”.

Las investigaciones realizadas para conseguir las publicaciones que se recogen en esta tesis han sido financiadas por los siguientes proyectos de investigación:

Influencia del polimorfismo del receptor de andrógenos en la masa muscular, la morfología muscular y la respuesta hipertrófica al entrenamiento de fuerza. Financiado por Ministerio de Educación y Ciencia, DEP2006-56076-C06-04/ACTI (I.P.: Dra. Cecilia Dorado García).

Proyecto Estructurante de la ULPGC (ULPAPD-08/01-4). Integración de los grupos de investigación en Ciencias de la Salud entorno al estudio de la obesidad y el síndrome metabólico con un enfoque molecular, celular, fisiopatológico, epidemiológico y psicosocial (I.P.: Dr. Jorge Freixinet Guilart y Dr. José A L Calbet).

Mecanismos fisiológicos y moleculares de la reducción de masa grasa en seres humanos mediante ejercicios de musculación. Financiado por el Gobierno de Canarias PI042005/177 (I.P.: Dr. José A L Calbet).

PROYECTO DE INFRAESTRUCTURA 2008, UNLP08-3E-005 (Ayudas del programa nacional de infraestructuras científico-tecnológicas dentro del plan nacional de investigación científica, desarrollo e innovación tecnológica 2008-2011. Financiado por MICINN y FEDER. (I.P.: Dr. José A L Calbet).

**Abreviaturas**

**AG:** Ácido graso

**AR:** Receptor de andrógenos, del inglés “androgen receptor”.

**ATP:** Adenosín trifosfato.

**CMJ:** Salto con contramovimiento

**DMO:** Densidad mineral ósea.

**DEXA:** Absorciometría fónica dual de rayos X, del inglés “dual energy X-ray absorptiometry”.

**EGF:** Factor de crecimiento epidérmico.

**FatMax:** Intensidad a la que ocurre la oxidación máxima de grasas.

**FFM:** Masa libre de grasa.

**MFO:** Oxidación máxima de ácidos grasos, del inglés “Maximal fatty acid oxidation”.

**Min:** Minuto.

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.

**RMR:** Tasa metabólica en reposo.

**RO:** Remodelado óseo.

**SHBG:** Globulina transportadora de hormonas sexuales, del inglés “sex hormone-binding globulin”.

**SJ:** Salto sin contramovimiento o “Squat Jump”

**T:** Testosterona.

**URO:** Unidades de Remodelación Ósea.

**VCO<sub>2</sub>:** Producción de dióxido de Carbono.

**VO<sub>2</sub>:** Consumo de oxígeno.

**VO<sub>2</sub>max:** Consumo máximo de oxígeno.

**W:** Vatios.

**RESUMEN GENERAL  
(SUMMARY)**

## Resumen general

El estudio de los factores que influyen en el desarrollo de la masa muscular y ósea, así como de la acumulación de masa grasa durante el crecimiento es de gran interés en las Ciencias del Deporte, de cara a la detección de talentos deportivos, así como el diseño de estrategias de entrenamiento y /o terapéuticas efectivas para el futuro. Esta tesis tiene como principal objetivo determinar parte de la variabilidad en ciertos componentes de la composición corporal como son la masa muscular, la masa ósea y la masa grasa, así como evaluar su influencia en la condición física de niños en crecimiento, desde una perspectiva genética. Por otra parte, el grado de acumulación de grasa puede variar en el periodo entre la niñez y la vida adulta, aunque los estilos de vida sean similares. Otro objetivo del presente trabajo es explicar las posibles causas de la acumulación de grasa y de la capacidad de oxidación de las grasas desde la perspectiva de la influencia de posibles variaciones genéticas, conocidas como polimorfismos genéticos. De esta manera, para determinar el efecto de ciertos polimorfismos del gen del receptor de andrógenos sobre la masa muscular y la masa ósea, se estudió una muestra poblacional de 152 niños y 116 niñas sanos y físicamente activos (estudios I y II). La composición corporal se determinó mediante absorciometría fotónica dual de rayos X (DXA) y antropometría. La condición física se evaluó mediante pruebas de carrera para medir la velocidad de carrera en 30m, la capacidad anaeróbica con el test de carrera de 300m y la potencia aeróbica con el test de Luc-Legger. Además, se determinó la potencia muscular de las extremidades inferiores mediante test de salto vertical con y sin contramovimiento (SJ y CMJ) y la fuerza isométrica y dinámica máxima de las extremidades inferiores en plataforma de fuerzas. En 45 varones adultos sanos provenientes de la cohorte de los estudios I y II se obtuvieron datos longitudinales sobre acumulación de masa grasa y capacidad máxima de oxidación de grasas (medido mediante un test de calorimetría indirecta) en un periodo de 15 años (estudio III). El número de repeticiones de los polimorfismos CAG (poliglutamina) y GGN (poliglicina) del gen del receptor de andrógenos se de-

terminó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Teniendo en cuenta la distribución alélica, la población estudiada se dividió en los siguientes grupos:

CAG corto (short) ( $CAG_S$ ): aquellos sujetos con repeticiones  $CAG \leq 21$ . CAG largo (long) ( $CAG_L$ ): si  $CAG > 21$ . GGN corto (short) ( $GGN_S$ ) si los sujetos cumplían la condición de número de repeticiones  $GGN \leq 23$  y GGN largo (long) ( $GGN_L$ ) si  $GGN \geq 23$ .

Los resultados obtenidos se analizaron mediante pruebas t, ANOVA para medidas repetidas, correlaciones bivariadas y análisis de regresión múltiple.

En general, se observó que la condición física anaeróbica es superior en los niños  $CAG_S$  y la condición física aeróbica en las niñas  $GGN_L$ . Además, los alelos largos de los polimorfismos de repetición CAG y GGN del receptor de andrógenos estaban asociados con una mayor masa ósea en niños pre púberes, sin efecto aparente en niñas pre púberes (estudios I y II). Los efectos en la condición física de los polimorfismos CAG y GGN pueden venir determinados por un mejor aprovechamiento de la actividad androgénica en aquellos individuos con un  $CAG_S$ , puesto que a edades prepuberales la cantidad de andrógenos circulantes es limitada. Por otro lado, la mayor masa ósea observada en los niños GGN y CAG largos puede venir determinada por una mayor “ventana de oportunidad” de desarrollo óseo, debido a un menor efecto androgénico en el cierre de las epífisis óseas durante el crecimiento.

En el estudio III, los resultados demuestran que el número de repeticiones polimórficas de CAG y GGN guardan una relación con la masa grasa, ya que los grupos con polimorfismos de repetición cortos mostraron una cantidad de masa grasa corporal inferior a los largos, que se mantuvo con el paso de los años, así como una capacidad máxima de oxidación de grasas superior en aquellos sujetos con  $CAG_L$ . Además,  $CAG_S$  se asoció a menor acumulación de grasa corporal con el paso de los años.

En conclusión, los polimorfismos de repetición CAG y GGN del receptor de andrógenos ejercen una influencia en la masa magra, masa grasa y condición física de niños y niñas en crecimiento. Sin embargo, no existe influencia aparente de los polimorfismos del receptor de andrógenos en la masa ósea de niñas en crecimiento. Sí que se observan diferencias en la masa ósea de las extremidades en aquellos niños que poseen alelos con repeticiones cortas del receptor de andrógenos. Por último, el estudio longitudinal de los cambios en la composición corporal desde la niñez hasta la edad adulta demuestra que el polimorfismo del receptor de andrógenos, más concretamente el GGN y CAG cortos, influyen en la acumulación de grasa corporal y la máxima capacidad de oxidación de grasas sólo en los varones.

## Summary

The study of factors that influence the development of muscle mass and bone mass, as well as the accumulation of fat mass during growth have a great interest in sports science, in order to detect sporting talents and designing training strategies and / or effective for future therapeutic effective in the future.

The main objective of this thesis was to determine, from a genetic perspective, some of the variability in certain components of body composition such as muscle mass, bone mass and fat mass, and to assess influence on the physical condition of children in growth. Moreover, the degree of fat accumulation may vary during the period between childhood and adulthood, although lifestyles are similar. Another objective of this study was to explain the possible causes of fat accumulation and fat oxidation capacity from the perspective of the influence of possible genetic variations, known as polymorphisms. To determine the effect of certain polymorphisms of the androgen receptor gene on muscle and bone mass, a population sample of 152 children and 116 healthy and physically active girls (Studies I and II) was studied. Body composition was determined by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) and anthropometry. Physical fitness was assessed by running tests to measure running speed at 30m, and to estimate the anaerobic capacity (running test 300m), and aerobic capacity (Course Navette). In addition, the muscular power of the lower limbs was determined by vertical jump test with and without countermovement (SJ and CMJ); and maximum isometric force and dynamics of the lower extremities using a force platform. In 45 healthy male adults from cohort studies I and II longitudinal data on accumulation of fat mass and maximum capacity for fat oxidation (measured by indirect calorimetry test) were obtained over a period of 15 years (Study III). The number of CAG repeats (polyglutamine) and GGN polymorphisms (polyglycine) of the androgen receptor gene was determined by the technique of Polymerase chain reaction (PCR). Considering the allelic distribution, the study population was divided into the following groups:



CAG short (short) (CAG<sub>S</sub>) repeats those subjects with CAG ≤ 21. CAG long (long) (CAG<sub>L</sub>): If CAG > 21. GGN short (short) (GGN<sub>S</sub>) if subjects fulfilled the condition number of repetitions GGN ≤ 23. GGN long (long) (GGN<sub>L</sub>) if GGN ≥ 23.

The results were analyzed using t-tests, ANOVA for repeated measures, bivariate correlations and multiple regression analysis.

In general, it was observed that anaerobic fitness is higher in the CAG<sub>S</sub> and aerobic fitness in GGN<sub>L</sub> girls. Also, long alleles of polymorphisms CAG and GGN repeat androgen receptor were associated with higher bone mass in prepubertal children with no apparent effect on prepubescent girls (Studies I and II). CAG and GGN polymorphisms may influence physical fitness through increased androgenic signaling in those individuals with CAG<sub>S</sub>, since at ages prepubertal the amount of circulating androgens is limited. On the other hand, the greater bone mass observed in GGN<sub>L</sub> children and CAG<sub>L</sub> can be determined by a greater "window of opportunity" for bone development, because less androgenic effect on the closure of the bony epiphysis during the growth.

In Study III, it is shown that the number of polymorphic CAG repeats and GGN have a relationship with fat mass, as groups of short repeat polymorphisms showed lower body fat mass, which remained over the years. Nevertheless, the maximum capacity for fat oxidation was higher in CAG<sub>L</sub>.

In conclusion CAG and GGN repeat polymorphisms of the androgen receptor exerts an influence on the lean mass, fat mass and physical fitness of boys and girls during growth. However, no influence was detected on bone mass in growth in girls. Finally, the longitudinal study of the changes in the body composition from the childhood up to the adult age demonstrates that androgen receptor polymorphisms influence the accumulation of body fat and the maximum capacity for fat oxidation in males.

# **INTRODUCCIÓN**

## 1. Introducción

El importante desarrollo industrial, tecnológico y electrónico que ha experimentado nuestra sociedad durante el último siglo ha reducido la necesidad del trabajo manual y físico, incrementando en consecuencia y de forma exponencial el sedentarismo. Esta falta de actividad física también afecta a los niños en crecimiento, en los que el sobrepeso y la obesidad han aumentado de forma alarmante, constituyendo hasta un 45% del total en España, como se extrae de los datos aportados desde el estudio “Aladino”, (Alimentación, Actividad física, Desarrollo Infantil y Obesidad), desarrollado por el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad durante el curso escolar 2010/2011 en 7.659 niños y niñas de 6 a 9 años de edad pertenecientes a todas las Comunidades Autónomas de España (Perez-Farinos *et al.*, 2013) (Figura 1). Por tanto, la obesidad infantil y sus posibles complicaciones de salud (diabetes, hipertensión arterial, arterioesclerosis, dislipemia) constituyen en la actualidad un importante problema de salud pública en España.

El estudio de los factores que influyen en el desarrollo de los demás elementos que forman parte de la composición corporal (la masa ósea y muscular) durante el crecimiento, han atraído a la comunidad científica en los últimos años. Con respecto a la masa ósea, se ha postulado que la osteoporosis es una “enfermedad pediátrica”, puesto que la adecuada adquisición del pico de masa ósea en la niñez y adolescencia minimiza el riesgo del desarrollo en la edad adulta de esta patología caracterizada por una pérdida cuantitativa de masa ósea, deterioro microarquitectural, y mayor susceptibilidad a fracturas óseas. Es precisamente la infancia y la adolescencia, el período de la vida en el que se puede intervenir disminuyendo los factores de riesgo de un inadecuado pico de masa ósea, planificando estrategias para la prevención de la osteoporosis (por ejemplo, actividad física, ingesta de calcio, exposición solar) (Fassler *et al.*, 1995).

El desarrollo de la masa muscular de los niños en crecimiento ha sido principalmente estudiado de cara a la detección de talentos deportivos, especialmente en aquellos deportes donde la fuerza y/o la velocidad tienen un

papel prioritario en el rendimiento. Sin embargo, la utilidad del entrenamiento de fuerza en niños ha sido criticado al alegarse la falta de un entorno hormonal adecuado (andrógeno principalmente) en esta etapa de la vida (Lloyd *et al.*, 2014).

Mucho menos estudiado está el efecto de la variabilidad genética sobre el rendimiento físico de los niños y niñas en crecimiento, más concretamente, sobre el desarrollo de la masa muscular, masa grasa y masa ósea. Las Ciencias de la Actividad física y del Deporte son un ámbito de investigación que no puede escapar a los cambios que está experimentando la biología molecular y, en concreto, el campo de la genómica y de la genética humana. En este sentido, las investigaciones tratan de buscar un gen candidato que se cree que tiene una influencia en la regulación de alguno de los fenotipos de la condición física. El grupo de investigación de la ULPGC “Rendimiento Humano, Ejercicio Físico y Salud” ha descrito con anterioridad la asociación de los diversos polimorfismos del gen del receptor de andrógenos (AR) en la composición corporal y condición física de hombres y mujeres adultos (Guadalupe-Grau *et al.*, 2010b; Guadalupe-Grau *et al.*, 2011; Ponce-Gonzalez *et al.*, 2012). En consecuencia, y con el ánimo de completar estos estudios, la presente tesis se centra en identificar las posibles asociaciones de los diferentes polimorfismos del gen del receptor de andrógenos, como principal candidato a influenciar en el rendimiento físico y composición corporal en el crecimiento de los niños y niñas.

## **1.1. Tejido óseo**

### **1.1.1. Características generales**

En los seres humanos, el desarrollo del esqueleto comienza en el periodo embrionario. Cuando el desarrollo fetal está completo, se han formado el esqueleto, los músculos, el tejido conjuntivo y el corazón a partir de la capa mesodérmica original embrionaria. La regulación del crecimiento del esqueleto en el niño está controlada por la hormona del crecimiento (GH) hasta la

pubertad, momento en el cual la testosterona y los estrógenos desempeñan el papel más importante.

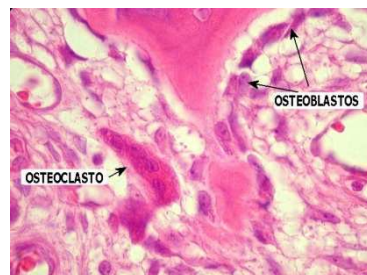
Los huesos son los órganos del sistema esquelético, y el tejido óseo es el componente estructural de los huesos. Algunas de las funciones que les atribuimos a los huesos son la fijación para los músculos (función biomecánica), proteger los tejidos delicados tales como los órganos vitales y el sistema nervioso central (función protectora), actuar como reservas de calcio y fósforo (función metabólica), e incluso participar en la formación de glóbulos rojos (Ross, 2009).

Los componentes básicos del hueso son la matriz ósea y los elementos estructurales celulares específicos, entre los que destacamos los siguientes:

**Osteoblastos:** sintetizan osteoide e intervienen en la mineralización. La garantía de su abundancia depende en buena medida del factor de crecimiento epidérmico (EGF) que activa genes específicos (Figura 2).

**Osteoclastos:** es el agente principal del recambio óseo (Figura 2). Esto le otorga una gran transcendencia, puesto que la mayoría de las enfermedades del esqueleto están ligadas a un exceso de actividad osteoclástica, que conduce a un incremento de la resorción ósea. Dentro de estas enfermedades destacamos la osteoporosis, la artritis reumatoide, la enfermedad de Paget o las metástasis óseas de los tumores malignos.

**Osteocitos:** constituyen el 90% de la población celular del hueso, que se encuentra distribuida a lo largo del tejido. Se trata de células diferenciadas que proceden de los osteoblastos, una vez que estos quedan encastrados en la matriz ósea que ellos fabrican.

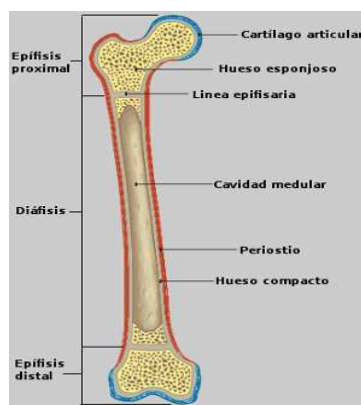


**Figura 2.** Micrografía con osteoclastos y osteoblastos. Conceptos básicos.

### 1.1.2. Estructura del hueso durante el crecimiento

Los huesos largos del esqueleto maduro tienen una estructura hueca cilíndrica que forma el cuerpo del hueso llamada diáfisis y dos extremos más anchos con una superficie articular recubierta de cartílago que recibe el nombre de epífisis. La porción de hueso que se encuentra entre la diáfisis y la epífisis se denomina metafisis, y se define como la unión de la diáfisis con la placa de crecimiento (Young, 2008) (Figura 3).

El crecimiento de los huesos largos tiene lugar en las placas de crecimiento epifisiario a través de un proceso continuo de formación de hueso endocondral. Una vez completo el crecimiento longitudinal, se fusionan las placas epifisarias de los extremos de los huesos largos (Ljunggren, 2006; Young, 2008).



**Figura 3.** Estructura del hueso largo.  
Anatomía de los huesos.  
[www.sabelotodo.org](http://www.sabelotodo.org)

### 1.1.3. Proceso de remodelado óseo en el crecimiento

El hueso es un tejido de origen conectivo, de carácter dinámico, que como se ha señalado anteriormente desempeña primordialmente una función de sostén y una labor metabólica. Ambas funciones son posibles gracias a un proceso continuo de recambio al que se ven expuestos los huesos, conocido como remodelado óseo (RO).

Durante la niñez y la adolescencia hay un modelado constante del hueso que comprende el crecimiento longitudinal, transversal y por aposición. Es preciso señalar dos actividades celulares básicas, el depósito mineral y la reabsorción ósea. Ambas permiten los procesos de crecimiento y remodelado. El crecimiento del hueso endocondral se inicia en el segundo trimestre de la vida fetal y continúa después del nacimiento hasta el principio de la vida adulta (Ross, 2009).

El RO es una compleja secuencia de eventos celulares que tiene como función principal el “rejuvenecimiento de los huesos”. Por otro lado el RO desempeña un papel importante en el control de la homeostasis mineral, mediante la liberación de iones de calcio y fósforo al torrente sanguíneo. Cualquier desequilibrio en este balance resorción-formación conduce a una pérdida del tejido óseo si la resorción excede la formación (Young, 2008).

El desarrollo del RO se lleva a cabo en múltiples unidades microscópicas bien delimitadas, dispersas por todo el esqueleto. En cada una de ellas, el hueso es destruido y después sustituido por otro recién formado. El conjunto de células que desarrollan este proceso en cada una de las localizaciones, constituye lo que llamamos “*Unidades de Remodelación Ósea*” (URO), (Roca, 2010). Este proceso que se produce a lo largo de toda la vida es controlado por una etapa permanente de reabsorción llevada a cabo por los osteoclastos y seguido por un perfecto equilibrio de formación realizado por los osteoblastos.

El hueso renueva cada año el 25% del hueso trabecular y el 3% del hueso cortical. Mediante estas remodelaciones óseas se evita la aparición de lesiones por fatiga, manteniendo una estructura que permita la adaptación de las tensiones mecánicas (Castelo-Branco, 2009).

En la fase de crecimiento y modelado, hay un desequilibrio entre la formación y la resorción de hueso. Durante este período, el esqueleto alcanza su forma y densidad finales (Maimoun & Sultan, 2011). A partir de los 20 a 30 años el recambio esquelético anual supone alrededor del 5 al 10% de la masa ósea total y hay un equilibrio entre la cantidad de hueso que se forma y que se reabsorbe. A continuación, a partir de los 30 a 40 años, la cantidad de hueso que se reabsorbe comienza a superar a la que se renueva (Ljunggren, 2006). El resultado es una disminución constante de la masa ósea en un pequeño porcentaje anual. El proceso de remodelado completo dura unos 10 años. Se calcula que en un adulto joven se ponen en marcha 3-4 millones de URO cada año (Castelo-Branco, 2009).

#### 1.1.4. Efectos del ejercicio durante el crecimiento óseo.

Los niños cada vez realizan menos actividad física y se ven atraídos por comportamientos sedentarios como ver la televisión, estando esto asociado con un mayor riesgo de poseer una baja “densidad mineral ósea” (DMO) (Vicente-Rodríguez *et al.*, 2009; Gracia-Marco *et al.*, 2012).

Los efectos provocados por la práctica deportiva en la infancia apoyan la conjetura sobre la persistencia de la acumulación de masa ósea durante la edad adulta (Baxter-Jones *et al.*, 2008). Alrededor de un 90% del total de los recursos óseos que se obtienen durante la etapa adulta han sido depositados hacia el final de la adolescencia (Glastre *et al.*, 1990; Matkovic *et al.*, 1990). El pico de masa ósea se alcanza alrededor de los 25-30 años, pero es en la adolescencia, la etapa más sensible, donde se aprecian las mayores ganancias en la masa ósea, especialmente entre los 11 y 14 años en el caso de las chicas y entre los 14 y 16 en el caso de los chicos, pudiendo alcanzar hasta un 51% del pico de masa ósea en este periodo de desarrollo puberal (Gordon *et al.*, 1991; MacKelvie *et al.*, 2002).

Aquellas actividades físicas que conllevan especialmente cargas de alto impacto, realizadas antes de la maduración del esqueleto, tienen una gran influencia en el crecimiento de la masa ósea. La práctica de ejercicio físico desde edades tempranas está justificada no sólo a nivel de mejora de la salud general, sino también a nivel de salud ósea (Gunter *et al.*, 2012). Por ello, para obtener el máximo beneficio derivado de la práctica deportiva es preciso que este se realice antes de que los niños/as hayan superado el estadio 2-3 de Tanner (Vicente-Rodríguez *et al.*, 2003). Una masa ósea “máxima” elevada puede actuar como un “banco óseo” en una fase posterior de la vida y reducir el riesgo de fracturas y padecer osteoporosis (Ljunggren, 2006).

Actualmente, se ha demostrado que en edades prepuberales los niños y niñas físicamente activos/as tienen mayor BMD en la columna lumbar y/o fémur que los niños y niñas de sus mismas características menos activos (Lehtonen-Veromaa *et al.*, 2000; Lima *et al.*, 2001; Vicente-Rodríguez *et al.*,



2003). La influencia sobre el efecto que tiene la práctica de actividad física sobre la masa ósea en niños y niñas en edades pre y postpuberales, ha sido bastante estudiada (Bradney *et al.*, 1998; Calbet *et al.*, 1998; Courteix *et al.*, 1998; Flodgren *et al.*, 1999; Andreoli *et al.*, 2001; Bahouth *et al.*, 2001; Calbet *et al.*, 2001).

El aumento de la masa magra es uno de los predictores más importantes para la acumulación de masa ósea durante el crecimiento prepupal en la población (Vivanco-Munoz *et al.*, 2012). El músculo esquelético es el principal componente de la masa magra, la participación en actividades deportivas podría tener no solo un efecto osteogénico directo, sino también una forma indirecta de aumentar la masa muscular y, con ellos, las tensiones generadas en los huesos durante los años pre púberes (Vicente-Rodríguez, 2006). Por tanto, la práctica deportiva tiene un efecto directo de ganancia de masa ósea, pero también indirecto a través del incremento de la masa magra debido al ejercicio (Vicente-Rodríguez *et al.*, 2004; El Hage *et al.*, 2009).

## **1.2. Tejido muscular**

### **1.2.1. Características generales**

Los músculos esqueléticos son un tipo de músculos estriados unidos al esqueleto. Formados por células o fibras alargadas y multinucleadas que sitúan sus núcleos en la periferia. Obedecen a la organización de proteínas de actina y miosina que le confieren esa estriación que se ve perfectamente al microscopio. Son usados para facilitar el movimiento y mantener la unión hueso-articulación a través de su contracción. Son, generalmente, de contracción voluntaria (a través de inervación nerviosa), aunque pueden contraerse involuntariamente. El cuerpo humano está formado aproximadamente por un 90% de este tipo de músculo y un 1% de músculo cardíaco y 9% visceral. En el músculo esquelético humano existen dos tipos diferentes de fibras: de contracción rápida y de contracción lenta. La proporción de cada tipo de fibra en un determinado músculo probablemente es bastante constante a lo largo de la vida. Las fibras musculares de contracción rápida, que

también se denominan fibras tipo II, poseen una capacidad elevada de producción anaeróbica de ATP durante la glucólisis.

Las fibras musculares de contracción lenta o fibras de tipo I tienen una velocidad de contracción de alrededor de la mitad que las fibras de contracción rápida. Las fibras de contracción lenta poseen numerosas mitocondrias y una concentración elevada de las enzimas del metabolismo aeróbico.

### **1.2.2. Efectos del ejercicio en el tejido muscular durante el crecimiento**

La información sobre el efecto que tiene la práctica de actividad física sobre la masa muscular en niños y niñas en edades pre y postpuberales es muy escasa (Ramsay *et al.*, 1990; Vicente-Rodríguez *et al.*, 2003; Vicente-Rodríguez *et al.*, 2004). La verdad es que aún se discute si la práctica de actividad física podría influir en una respuesta hipertrófica en la niñez. Ramsay y colaboradores (Ramsay *et al.*, 1990) observaron que 20 semanas de entrenamiento de fuerza aumentó la fuerza dinámica, isotónica e isométrica en niños pre púberes. Sin embargo, estos resultados fueron explicados como adaptaciones de la actividad neural de los músculos, descartando que fuera debido a mecanismos hipertróficos (Ramsay *et al.*, 1990). Por el contrario, un estudio más actual de Vicente-Rodríguez y colaboradores (Vicente-Rodríguez *et al.*, 2007) observó que las niñas prepúberes que practicaban gimnasia artística tenían una masa magra ajustada por las diferencias en masa corporal, altura y edad, un 6% y un 9% mayor que las niñas que practicaban gimnasia rítmica y que las niñas control respectivamente. Estos resultados sugieren que la práctica de gimnasia deportiva podría producir una hipertrofia muscular en edades pre púberes (Vicente-Rodríguez *et al.*, 2007). Más recientemente, Joaquín Sanchis y col. Han demostrado que los niños tenistas prepúberes pueden tener de un 10-15% más masa muscular en el brazo dominante que en el contralateral, lo que definitivamente demuestra que el ejercicio físico puede producir hipertrofia muscular en niños prepúberes (Sanchis-Moysi *et al.*, 2010).

### 1.3. Tejido adiposo

#### 1.3.1. Características generales

El tejido adiposo es un tejido conjuntivo especializado en el que predominan las células conjuntivas llamadas adipocitos. El tejido adiposo es uno de los tejidos más abundantes y representa alrededor del 15-20% del peso corporal del hombre y del 20-25% del peso corporal en mujeres.

El tejido adiposo, por un lado cumple funciones mecánicas: una de ellas es servir como amortiguador, protegiendo y manteniendo en su lugar los órganos internos así como otras estructuras más externas del cuerpo, y también tiene funciones metabólicas: es el encargado de liberar ácidos grasos. Además tiene una función endocrina. Sin embargo, su función principal es ser una reserva de lípidos, los cuales, pueden ser utilizados para generar la energía necesaria para el cuerpo y protegernos del exceso de glucosa (Aarsland *et al.*, 1997).

En 1.200.000 generaciones del ser humano, el genoma ha sido siempre el mismo y solo en 2-3 generaciones con abundancia energética y modificación de los hábitos de vida, se ha producido el cambio en dieta, actividad física, figura corporal y prevalencia de enfermedades crónicas.

#### 1.3.2. Efectos del ejercicio en el tejido adiposo durante el crecimiento

Los niños y adolescentes que realizan actividad física conforme a las recomendaciones de las instituciones de referencia presentan niveles de grasa corporal inferiores a los que no la hacen (Ekelund *et al.*, 2004; Gutin *et al.*, 2005). De hecho, la práctica de actividad física junto con el control de la ingesta de calorías es una de las herramientas más importantes para combatir el sobrepeso o la obesidad infantil durante el crecimiento. El desarrollo de la obesidad desde la infancia está indiscutiblemente vinculado a factores ambientales de: alimentación, materno-fetal, (Koletzko, 2005) crecimiento en el primer año de vida, (Monteiro & Victora, 2005) dieta (Buchan *et al.*, 2005) y nivel de actividad física (Pate *et al.*, 1990) adecuados.

#### 1.4. Andrógenos y Testosterona

Los andrógenos son hormonas sexuales masculinas, cuyos principales componentes son la testosterona, la androsterona y la androstendiona. Los andrógenos son esteroides del tipo C-19 secretados principalmente por los testículos y las glándulas adrenales, y en las mujeres en menor medida por los ovarios. El andrógeno más importante en los hombres es la testosterona (T), que circula por el torrente sanguíneo unida a la albúmina y a una proteína específica del plasma, la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG).

El efecto de los andrógenos sobre el hueso es variable dependiendo de la especie, sexo, estado de maduración del esqueleto y del compartimiento óseo (cortical o esponjoso).

El efecto neto de los andrógenos sobre el hueso es aumentar la formación ósea y el crecimiento longitudinal. Un rasgo diferencial entre sexos es que la testosterona aumenta la aposición perióstica, (Wang *et al.*, 2006) mientras que los estrógenos la inhiben.

Las hormonas sexuales juegan un papel importantísimo en la construcción y conservación del esqueleto adulto. El déficit estrogénico es la causa principal de osteoporosis involutiva, tanto en mujeres, como en varones.

La testosterona es una hormona anabólica, teniendo un efecto contrastado sobre la masa muscular y tejido adiposo. Los andrógenos estimulan la síntesis de proteínas y el crecimiento muscular (Bhasin *et al.*, 1997; Bhasin *et al.*, 2001). Además, los andrógenos inhiben la capacidad de formación y diferenciación de adipocitos, reduciendo su capacidad para almacenar lípidos bloqueando a través del receptor de andrógenos la activación de factores genéticos relacionados con la adipogénesis.

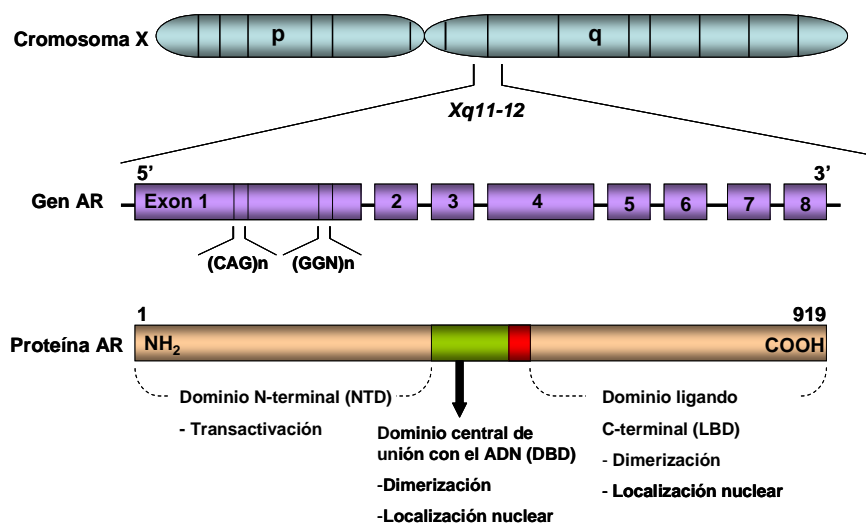
#### 1.5. Polimorfismo del receptor de andrógenos

El receptor de andrógenos (AR), también conocido como NRC4 (subfamilia de receptores nucleares 3, grupo C, miembro 4), es un tipo de receptor nuclear transmembrana que se activa por su unión con las hormonas

androgénicas como son la testosterona o la dihidrotestosterona (Roy *et al.*, 1999). El AR está íntimamente relacionado con el receptor de progesterona, de hecho, dosis altas de progesterona pueden bloquear al AR (Raudrant & Rabe, 2003). La función principal del receptor de andrógenos es actuar como un factor de transcripción de unión al ADN (Roy *et al.*, 1999).

El gen del receptor de andrógenos, (AR) se localiza en el brazo largo del cromosoma X (Xq 11-12) (Lubahn *et al.*, 1988). Este gen está formado por 8 exones y codifica una proteína que posee 919 residuos de aminoácidos. El exon 1 de este gen posee dos motivos de repeticiones polimórficas (CAG y GGN), que codifican poliglutaminas y poliglicinas respectivamente, de longitudes variables en la región N-terminal (dominio de transactivación) de la proteína AR (Faber *et al.*, 1989); (Lubahn *et al.*, 1988) (Figura 4). Las dos regiones de repeticiones están separadas por 248 aminoácidos de una secuencia no polimórfica. El AR comparte con otros miembros de la familia de (Rajender *et al.*, 2007) receptores nucleares una estructura y organización funcional que incluye un dominio N-terminal de transactivación (TAD), un dominio central de unión con el ADN (DBD), un dominio ligando C terminal (LBD), y una región “bisagra” que conecta el LBD y el DBD (Rajender *et al.*, 2007) (Figura 4). Diversos estudios han demostrado gran expresión de ARs en el tejido muscular esquelético (Bhasin *et al.*, 2001); (Sheffield-Moore, 2000), siendo ésta aún mayor en respuesta a la sobrecarga muscular (Bamman *et al.*, 2001).

En el caso de las mujeres, las células somáticas poseen dos cromosomas X, y en teoría, uno de ellos está inactivado en la mitad de las células, mientras que la otra mitad se encuentra activo. Este proceso de inactivación del cromosoma X ocurre en el desarrollo temprano y es aleatorio, por lo que normalmente tiene como resultado el desarrollo de tejidos con un número de células de origen paterno o materno aproximadamente similar (Buller *et al.*, 1999).



**Figura 4.** Organización genética del gen del receptor de andrógenos (AR) en el cromosoma X y principales dominios funcionales de la proteína codificada. Adaptado de Rajender y col. (Rajender *et al.*, 2007).

La repetición CAG varía en longitud o número de repeticiones entre 8 y 35, siendo la mediana de 22, mientras que GGN, que es una repetición compleja que se representa como (GGT)3GGG(GGT)2(GGC)<sub>n</sub> que oscila entre 10 y 30 repeticiones (Brinkmann *et al.*, 1989; Faber *et al.*, 1989), siendo la mediana de 23 (residuos de glicina) en varones y en mujeres caucásicos, incluida la población canaria (Ding *et al.*, 2005);(Rodríguez *et al.*, 2006); (Rodríguez-Gonzalez *et al.*, 2009). La longitud de repeticiones del polimorfismo CAG y el potencial de transactivación de AR están inversamente correlacionados (Chamberlain *et al.*, 1994); (Kazemi-Esfarjani *et al.*, 1995).

Estudios “in vitro”, muestran que los alelos de AR con más de 40 repeticiones CAG poseen una actividad de transcripción reducida en comparación con las moléculas de 25, 20 y de ninguna repetición (Chamberlain *et al.*, 1994); (Kazemi-Esfarjani *et al.*, 1995). Por lo tanto, las evidencias sugieren que un mayor número de repeticiones CAG se asocian con una menor actividad AR, y por consiguiente, con las afecciones relacionadas con una menor actividad de los andrógenos. En humanos, un menor número de repeticiones de los polimorfismos CAG han sido relacionados con

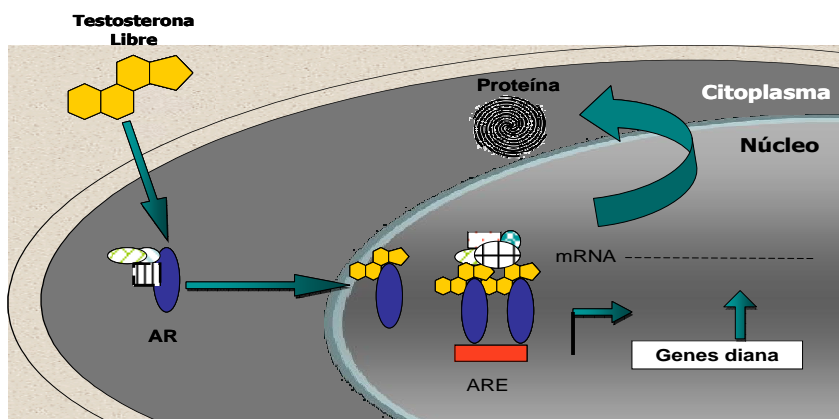
la cantidad de masa libre de grasa en ancianos sanos (Walsh & Celeste, 2005), así como con la hipertrofia benigna de la próstata, cáncer de próstata e infertilidad masculina (Giovannucci *et al.*, 1997); (Kukuvitis *et al.*, 2002); (Mitsumori *et al.*, 1999); (Rodriguez-Gonzalez *et al.*, 2009).

De forma similar, si se eliminan las repeticiones GGN, se obtiene como resultado una disminución del 30% en el potencial de transactivación (Gao *et al.*, 1996). Esto se ha visto demostrado en cultivos celulares, donde los polimorfismos GGN que poseen un menor número de repeticiones poseen también un mayor contenido de la proteína AR, que por otro lado puede mejorar la respuesta a la estimulación por andrógenos (Aubert *et al.*, 2005).

### **1.5.1. Mecanismo de acción clásico o genómico del receptor de andrógenos**

El principal mecanismo de acción del receptor de andrógenos es la regulación directa de la transcripción génica. La testosterona libre atraviesa fácilmente la membrana celular porque es una hormona hidrofóbica. Entonces interacciona con el receptor de andrógenos que se encuentra en el citoplasma. Esto produce un cambio conformacional en el receptor y la activación del complejo testosterona libre-receptor, que se traslada al núcleo celular donde interacciona como un dímero con moduladores de transcripción y elementos de respuesta androgénica (una secuencia específica del ADN), localizados en la zona promotora de los genes diana. El complejo interacciona con otras proteínas en el núcleo que resultan en una regulación al alza o a la baja de la transcripción génica específica (Heemers & Tindall, 2007). La regulación al alza o activación de la transcripción produce a su vez un incremento en la síntesis del ARN mensajero, que sucesivamente es transcrito por los ribosomas para producir proteínas específicas (Heemers & Tindall, 2007).

**RECEPTOR DE ANDRÓGENOS:  
MECANISMO DE ACCIÓN CLÁSICO O GENÓMICO**



*Figura 5. Mecanismo de acción clásico o genómico del receptor de andrógenos. ARE, elementos de respuesta androgénica. Adaptado de (Heemers & Tindall, 2007).*

**1.6. Efectos del polimorfismo del receptor de andrógenos en el crecimiento**

El polimorfismo del receptor de andrógenos CAG y GGN parece jugar un papel importante en la masa magra y grasa en humanos adultos (Gustafson *et al.*, 2003; Walsh *et al.*, 2005; Stanworth *et al.*, 2008; Nielsen *et al.*, 2010; Ponce-Gonzalez *et al.*, 2012). Sin embargo, poco se sabe acerca de la influencia del polimorfismo AR sobre la composición corporal en niños y su desarrollo puberal hasta la edad adulta.

La pubertad es la primera fase de la adolescencia y de la juventud, normalmente se inicia a los 10 años en las niñas y a los 11 años en los niños y finaliza a los 14-15 años. En la pubertad se lleva a cabo el proceso de cambios físicos en el cual el cuerpo del niño o niña se convierte en adolescente, capaz de la reproducción sexual.

El crecimiento se acelera en la primera mitad de la pubertad, y alcanza su desarrollo al final. Las diferencias corporales entre niños y niñas antes de



la pubertad son casi únicamente sus genitales. Los cambios más importantes en la composición corporal, incluyendo alteraciones en las proporciones relativas de agua, músculo, hueso y grasa corporal, acontecen durante la pubertad. Bajo la influencia de los esteroides gonadales y la GH, se produce un incremento en el contenido mineral óseo y en la masa muscular, y el depósito de grasa alcanza el momento de máxima expresión en su dimorfismo sexual. En términos generales, desde los 5 a los 10 años de edad, los varones tienen de 1 a 3 kg más de masa grasa que las niñas, pero ambos ganan masa grasa en proporciones similares (Ojeda *et al.*, 2006).

# **OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

## 2. Objetivos

1. Determinar la influencia del polimorfismo (CAG)<sub>n</sub> del gen del receptor de andrógenos en las diferencias fenotípicas de la masa muscular y su distribución regional en niños de ambos sexos.
2. Evaluar si el polimorfismo (CAG)<sub>n</sub> del gen del receptor de andrógenos influye en la condición física en niños de ambos sexos.
3. Elucidar si el polimorfismo (CAG)<sub>n</sub> del gen del receptor de andrógenos influye en la masa ósea en niños de ambos sexos.
4. Establecer si el polimorfismo del AR CAG y GGN está asociado con los cambios de composición corporal de la adolescencia a la edad adulta (artículo III).
5. Determinar si el polimorfismo del AR se asocia a la capacidad máxima de oxidación de grasas en los hombres y como podría influir en la acumulación de masa grasa durante el crecimiento (artículo III).

### 3. Hipótesis

1. Determinados polimorfismos del gen que codifica el receptor de andrógenos se asocian a una mayor masa muscular en niños de ambos sexos.
2. Determinados polimorfismos del gen que codifica el receptor de andrógenos se asocian a una mayor condición física en niños de ambos sexos.
3. Determinados polimorfismos del gen que codifica el receptor de andrógenos se asocian a una mayor masa ósea en niños de ambos sexos.
4. Determinados polimorfismos del gen que codifica el receptor de andrógenos se asocian a niveles de grasa y masa grasa en edades tempranas.
5. Determinados polimorfismos del gen que codifica el receptor de andrógenos se asocian a cambios longitudinales desde la pubertad hasta la edad adulta.

# **METODOLOGÍA**

## 4. Metodología

### 4.1. Sujetos

Todos los sujetos fueron instruidos para que no realizaran actividad física vigorosa, ni tomarán cafeína y/o derivados, bebidas energéticas, alcohol ni tabaco desde el día antes de los experimentos con test sensibles a estos factores como son la recogida de saliva, y test relacionados con medidas de gases ventilatorios y de tolerancia a la glucosa. Además, los sujetos debieron pasar una noche en ayunas previo a estos test, pudiendo comer una vez finalizados.

Se midieron un total de 268 niños/as, 152 niños y 116 niñas de la población Gran Canaria con edades comprendidas entre los 7 y 13 años.

El estado de desarrollo puberal se determinó mediante autoevaluación siguiendo el método Tanner (Tanner, 1962), que es un método de reconocida validez (Duke *et al.*, 1980) y reproductibilidad ( $r = 0.97$ ) (Morris & Udry, 1980).

Los valores medios de los parámetros edad, talla, peso corporal y porcentaje de grasa de los sujetos que participaron en cada estudio realizado se describen en la Tabla 1.

#### Estudio I

Un total de 152 niños y 116 niñas caucásicos participaron en este estudio. Fueron reclutados de diferentes clubes deportivos de Gran Canaria. Todos los sujetos y padres fueron informados de los beneficios y riesgos del estudio y firmaron un consentimiento antes de empezar el estudio.

Los criterios de inclusión eran 1) que hicieran un mínimo 3h de actividad física a la semana, 2) que no tuvieran ninguna enfermedad crónica y 3) que no tomaran medicamentos.

Estudio II

En este estudio participaron los mismos niños que en el estudio I, un total de 152 niños y 116 niñas caucásicos. Los participantes fueron reclutados de diferentes clubes deportivos de Gran Canaria. Todos los participantes y padres fueron informados de los beneficios y riesgos del estudio y firmaban un consentimiento antes de empezar el estudio.

Los criterios de inclusión fueron los mismos que en el estudio I.

Estudio III

Inicialmente partimos con un total de 129 niños de Gran Canaria pertenecientes a estudios previos del grupo de investigación Rendimiento Humano, Ejercicio Físico y Salud, de los cuales se obtuvieron datos longitudinales de 45 sujetos. El primer reclutamiento comenzó en Febrero de 1998 y la segunda medición se obtuvo en Enero de 2013.

Los criterios de inclusión fueron 1) que no tuvieran ningún tipo de enfermedad crónica, 2) que no tomaran medicamentos y 3) que no fueran fumadores.

**Tabla1.** Características de los sujetos.

	Estudio I y II		Estudio III	
	Niños	Niñas	pre	post
	n=152	n=116	n=45	n=45
Edad (años)	11.5 ± 2.6	10.1 ± 3.2	12.8 ± 3.6	26.6 ± 4.0
Talla (cm)	147.9 ± 14.8	138.4 ± 15.9	155.1 ± 17.6	179 ± 7.2
Peso (kg)	41.7 ± 13.1	36.4 ± 12.6	49.5 ± 16.6	81.3 ± 17.6
Grasa corporal (%)	21.1 ± 8.7	27.2 ± 8.5	22.1 ± 10.5	20.8 ± 9.9

Datos representados como Media ± SD. \* (P<0.05).

## 4.2. Composición corporal

### 4.2.1. Antropometría.

Para la determinación de las medidas antropométricas se utilizó el protocolo “O-Scale System” (Ward et al. 1989). La talla se midió en bipedestación con los talones, los glúteos, la espalda y la región occipital en contacto con el plano del tallímetro. Estas medidas se efectuaron mediante un tallímetro de 1mm de precisión (Atlántida, Año Sayol, Barcelona, España), manteniendo la cabeza en el plano de Francfort. La masa corporal se midió mediante una báscula (Atlántida, Año Sayol, Barcelona, España) de 50 g de precisión, calibrada a 50.0, 70.0 ó 90.0 Kg, mediante masas patrón de la clase M1. Todos los pliegues cutáneos se midieron mediante un plicómetro Holtain, que ejerce una presión constante de 10 g·mm<sup>-2</sup> y tiene una precisión de 0.1mm. Cada pliegue se determinó por triplicado, eligiendo el valor medio de las tres mediciones. Aquellas mediciones que se apartaron 2 o más desviaciones estándar de la media fueron descartadas y nuevamente repetidas. Las lecturas del grosor de los pliegues se efectuaron hacia el cuarto segundo de la aplicación del plicómetro, para reducir la variabilidad asociada a las diferencias de comprensibilidad cutánea.

Todos los perímetros fueron medidos 3 veces con una cinta métrica inextensible de 1mm de precisión. Como valor correspondiente a cada perímetro se tomó la media de las 3 mediciones efectuadas. Cuando alguna se apartó 2 o más desviaciones estándar de la media, ésta fue descartada y repetida.

### 4.2.2. Absorciometría fotónica dual de rayos x

La composición corporal de los sujetos se analizó mediante absorciometría fotónica de rayos X (DXA) (Hologic QDR-1500, Hologic, software versión 7.10, Waltham, MA), tal como se describe en numerosos trabajos publicados por nuestro grupo de investigación (Ara *et al.*, 2004); (Guadalupe-Grau *et al.*, 2010a).



### 4.3. Condición física

#### 4.3.1. Capacidad de salto

Las fuerzas generadas durante el salto vertical se midieron mediante una plataforma de fuerza (Kistler, Winterthur, Suiza). Cada sujeto realizó dos tipos diferentes de saltos verticales máximos en los que se eliminó la contribución de los brazos:

1) *Squat jump (SJ)*: Es un tipo de salto en el que hay que saltar desde una posición de salida con las piernas flexionadas, la rodilla a 90º, y durante el cual no se puede realizar contramovimiento previo. Un goniómetro digital (Lafayette Instrument Company, Lafayette, IN) fue utilizado para verificar la flexión de rodilla a 90º antes de realizar el SJ.

2) *Salto con contramovimiento (CMJ)*: Es un tipo de salto en el que se parte de la posición de pie y se realiza un contramovimiento flexionando rápidamente las rodillas hasta unos 90º para conseguir impulso previo. A partir de los datos recogidos con la plataforma de fuerza se determinó la altura de vuelo (VJH), la fuerza máxima (Fp), siendo Fp = fuerza máxima – masa corporal, la potencia media (MP), el impulso mecánico positivo (PI) y la velocidad de desarrollo de fuerza (RFD) entre otras variables. Para ambos tipos de salto se empleó el mejor de tres intentos. La RFD media fue calculada a través de regresión lineal mediante la relación de la fuerza-tiempo durante la fase de impulso en el SJ y CMJ entre el 25 y 75% del pico de fuerza.

#### 4.3.2. Capacidad anaeróbica

Para estimar la capacidad anaeróbica se utilizó un test de carrera de 300m. Este test fue elegido debido a que la capacidad anaeróbica es el principal determinante del rendimiento en esfuerzos máximos que llevan al agotamiento entre 30 y 60s (Calbet *et al.*, 1997). El test se realizó en una pista de atletismo de 400m y se midieron los tiempos mediante un cronómetro. A todos los sujetos se les pidió que corrieran los 300m tan rápido

como pudieran y los test fueron efectuados individualmente, realizándose un solo intento.

#### **4.3.3. Capacidad aeróbica máxima.**

Para estimar el consumo máximo de oxígeno ( $VO_2\text{max}$ ) se utilizó el test máximo de carrera de ida y vuelta de 20m descrito por Leger en 1988 (Leger *et al.*, 1988). Se requería que los participantes corrieran entre dos líneas separadas 20m, al ritmo de un pitido emitido por una cinta magnetofónica. La frecuencia de las señales sonoras se incrementaba de tal forma que la velocidad de carrera que comenzaba a  $8.5 \text{ Km}\cdot\text{h}^{-1}$  aumentaba en  $0.5 \text{ Km}\cdot\text{h}^{-1}$  cada minuto. El tiempo que los sujetos eran capaces de correr se registró para calcular el  $VO_2\text{max}$ . Este test ha mostrado una gran validez y reproducibilidad para la predicción del  $VO_2\text{max}$  (Leger & Boucher, 1980).

#### **4.3.4. Test de velocidad de carrera**

El tiempo invertido en correr 30m se midió utilizando células fotoeléctricas (General ASDE, Valencia). El cronómetro se activa de forma automática cuando el sujeto cruza la primera célula, y de ahí en adelante se registran los tiempos cada 5m. Se motivó a los sujetos para que corrieran todo lo rápido que pudieran, y se tomó como valor representativo de la prueba el mejor de tres intentos, separados por al menos 1 minuto de descanso.

#### **4.3.5. Test de oxidación máxima de grasa (MFO): calorimetría indirecta**

Tras una noche en ayunas, se midió el gasto energético en reposo en una camilla estando los sujetos acostados en posición supina y conectados al analizador de gases mediante máscara ( $V_{\text{max}} \text{ N29}$ ; Sensormedics, California, USA) durante 30 minutos. Seguidamente, se realizó un test incremental en cicloergómetro para determinar la oxidación máxima de grasa (MFO) de las piernas y de los brazos, y a la intensidad que ésta tiene lugar (FatMax) (Achten *et al.*, 2002). La prueba comenzó con un escalón inicial de 30 vatios durante 5 minutos, seguido de incrementos de 30 vatios cada 3 min. Cuando los sujetos llegaron a un  $\text{RER} > 1.0$ , el ejercicio fue detenido

dejando terminar el correspondiente periodo de carga de 3 min. Después de 5 minutos de recuperación, el sujeto realizó un test incremental (30 W/min) a partir de la última carga de la prueba de MFO para determinar su  $VO_2$ max. Los sujetos fueron instruidos para mantener un ritmo de pedaleo a 80 rpm. La oxidación de hidratos de carbono y grasas durante cada escalón a valores

La oxidación de hidratos de carbono y grasas durante cada escalón del ejercicio fue calculada a partir de los valores medios de  $VO_2$  y  $VCO_2$  de los últimos 60 segundos de cada carga, utilizando las ecuaciones de calorimetría indirecta propuestas por (Frayn, 1983).

#### 4.4. Muestras de saliva

##### 4.4.1. Aislamiento de ADN mediante saliva y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la medición de los polimorfismos CAG y GGN del gen del receptor de andrógenos.

El ADN fue aislado y purificado a partir de 200  $\mu$ l de saliva usando el sistema High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Indianapolis, USA). Para la determinación de la longitud de las repeticiones de los tripletes CAG y GGN, las correspondientes regiones, localizadas en el exón 1 del gen del Receptor de Andrógenos (GeneBank M27423) se amplificaron usando primers previamente descritos por otros grupos de investigación (Rodríguez *et al.*, 2006). La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ l usando 50ng de ADN genómico, 200  $\mu$ M de desoxinucleótido trifosfato, tampón para regiones ricas en GC al 1X (Roche, Indianapolis, USA), y tampón de reacción de la polimerasa de ADN al 1X y 1U de Taq polimerasa (Fast Start, Roche). La concentración de cada par de primers fue de 1'2  $\mu$ M (para CAG) y 1'5  $\mu$ M (para GGN).

Las condiciones de la PCR fueron: 30 ciclos de 95°C durante 45s, 56°C durante 30seg y 72°C durante 30seg para la amplificación de CAG. Para la amplificación de GGN se usaron 30 ciclos de 95°C durante 1min, 55°C durante 2min y 72°C durante 2min. Cada PCR fue iniciada con un ciclo de des-

naturalización a 95°C durante 5min y terminada con un paso de expansión a 72°C durante 5min.

Los productos de PCR fueron diluidos a 1:100 con agua destilada y 1 µl de la dilución fue mezclado con 10 µl de formamida y 0´3 µl del estándar de peso molecular (GeneScan 500LIZ Size Standard, Applied Biosystems). Tras desnaturalización a 98°C durante 5min la mezcla fue enfriada rápidamente en hielo previamente a la electroforesis capilar mediante el uso del secuenciador ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) y se realizó el análisis de fragmentos mediante el Gene Scan Analysis Software (versión 3.7) (Applied Biosystem). La longitud exacta de los fragmentos fue corregida mediante un estándar de peso molecular de fabricación propia.

#### **4.5. Consentimientos y aprobación ética**

Todos los sujetos analizados en los estudios fueron informados acerca de los procedimientos y objetivos del estudio así como de los posibles riesgos y beneficios, tras lo cual firmaron la correspondiente autorización. Los estudios se desarrollaron de acuerdo a lo regulado para los estudios clínicos en la Declaración de Helsinki de 1975, y bajo la aprobación del comité ético u órganos competentes de la ULPGC.

#### **4.6. Estadística**

Como estadísticos descriptivos se presentan los valores de la media y la desviación estándar (SD). La homogeneidad de las varianzas se estableció mediante el test de Levene. La distribución normal fue comprobada con el test de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk, y cuando fue necesario el análisis estadístico fue realizado con los datos transformados logarítmicamente. Las diferencias entre sujetos de grupos diferentes se establecieron mediante la prueba ANOVA para medidas repetidas, analizando también los cambios en función del tiempo, género, edad, talla, masa total libre de grasa y  $VO_{2max}$ . Las diferencias entre los polimorfismos cortos y largos en el estudio II se realizaron mediante el test t-Student. Los efectos longitudinales, y los cambios entre el inicio y el final del estudio III se establecieron mediante la

prueba ANOVA para medidas repetidas, analizando también los cambios en función del tiempo pasado entre las dos medidas, grasa corporal al inicio, edad, talla, masa total libre de grasa, oxidación de grasa a nivel basal, MFO y  $VO_{2max}$ . También se utilizó en el estudio III un análisis de regresión múltiple para determinar qué variables tenían el mayor valor predictivo para MFO. Además, se examinó la existencia de relaciones lineales ente variables usando el test de correlación de Pearson.

La influencia de la longitud de las repeticiones del polimorfismo CAG y GGN en la composición corporal, MFO, y variables de condición física fue determinada tomando los polimorfismos como variables continuas o dicotómicas mediante límites alélicos correspondientes a la mediana de las distribuciones de las longitudes de CAG y GGN. El análisis estadístico se realizó con el paquete informático SPSS (SPSS 15.0 Inc., Chicago, IL, USA). Se han asumido diferencias significativas para  $P < 0.05$ .

Estudios I y II: puesto que el gen del receptor de andrógenos está localizado en el cromosoma X y uno de los dos alelos está aleatoriamente inactivado en las mujeres (Lyon, 1999), decidimos calcular la media de los dos alelos como una medida representativa de cada par en mujeres (Gonzalez *et al.*, 2007; Jaaskelainen *et al.*, 2008). El valor medio que mostró el mejor balance entre los grupos de niñas y niños se usó como punto de corte, en consecuencia, los sujetos que tuvieran un número de repeticiones  $\leq 21$  en niños y  $\leq 22$  en niñas se clasificaron como CAG cortos ( $CAG_S$ ), y aquellos sujetos que mostraran un número de repeticiones  $> 21$  en niños y  $> 22$  en niñas, fueron clasificados como CAG largos ( $CAG_L$ ). En el caso de GGN, aquellos sujetos que tuvieron un número de repeticiones  $\leq 23$  tanto en niños como en niñas fueron clasificados como GGN cortos ( $GGN_S$ ), el resto de los sujetos fueron clasificados como GGN largos ( $GGN_L$ ).

# **RESULTADOS**

## 5. Resultados

En el siguiente apartado se resumen los resultados más relevantes de cada uno de los artículos. La descripción detallada de los resultados se encuentra en las publicaciones anexas que forman parte de esta tesis doctoral.

### 5.1. Resumen de los resultados del artículo I (En revisión)

*Androgen receptor CAG and GGN repeat polymorphisms are associated with performance in boys and girls.*

La información descriptiva sobre los niños y niñas, la composición corporal, la antropometría, el estado de crecimiento, y la forma física se muestra en la Tabla 1 (incorporada en anexo del artículo 1).

En los niños una distribución normal de 16 diferentes alelos del CAG, que van desde 13 a 33 repeticiones y 12 alelos GGN que van desde 14 a 30 repeticiones. En las niñas se encontraron 11 alelos CAG diferentes, que van desde 14 a 25 repeticiones, mientras que el número de alelos GGN fue de 9, que van desde 13 a 24 repeticiones.

#### **Efectos del polimorfismo CAG del AR en la condición física.**

No hubo diferencias significativas en la edad, talla, peso, en la masa muscular segmentada y masa grasa entre los grupos CAG<sub>S</sub> y CAG<sub>L</sub> en niños y niñas. La capacidad aeróbica máxima (VO<sub>2</sub>max), la media de velocidad del test de carrera de 30m, así como la altura de los saltos SJ y CMJ fueron similares en ambos grupos. Sin embargo, el grupo CAG<sub>S</sub> de los niños completó el test de 300m un 5.5% más rápido que el grupo CAG<sub>L</sub>. Estas diferencias seguían siendo significativas incluso después de considerar la edad, talla, masa corporal y la maduración sexual (P<0.05, Tabla 2, incorporada en anexo del artículo 1).

#### **Efectos del polimorfismo GGN del AR en la condición física.**

No hubieron diferencias significativas en la edad, talla, peso, en la masa muscular segmentada y masa grasa entre el grupo GGN<sub>S</sub> y GGN<sub>L</sub>. La velocidad

media en el test de 30m y 300m, así como la altura de los saltos SJ y CMJ fueron similares en ambos grupos y sexos. Sin embargo, en las niñas el grupo GGN<sub>L</sub> mostraron unos valores mayores de VO<sub>2</sub>max comparado con el grupo GGN<sub>S</sub> ( $48.6 \pm 6.0$  vs  $45.4 \pm 4.4$  ml·kg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>) respectivamente (P<0.05, Tabla 3, incorporada en anexo artículo 1).

## 5.2. Resumen de los resultados del artículo II (En revisión)

*Androgen receptor CAG and GGN repeat polymorphisms and bone mass in boys and girls.*

En los niños se observaron 16 alelos del polimorfismo CAG (rango de 13 a 33 repeticiones) y 12 alelos del polimorfismo GGN, con un rango de 14 a 33 repeticiones. En las niñas existían 11 alelos diferentes del polimorfismo CAG (rango de 14 a 35 repeticiones) y 9 alelos del polimorfismo GGN, con un rango de 13 a 24 repeticiones. La composición corporal de los niños y niñas, los datos antropométricos, la masa ósea total y regional se reportan en la Tabla 1 (incorporada en anexo artículo 2). En general los niños eran más altos, más pesados y tenían mayor peso corporal, BMD y BMC que las niñas (P<0.05, Tabla 1, incorporada en anexo artículo 2).

### Efectos del polimorfismo CAG del AR en la composición corporal

El grupo CAG<sub>L</sub> de los niños mostró una mayor talla, masa corporal, densidad mineral ósea en el cuerpo entero (BMD), contenido mineral óseo en el cuerpo entero (BMC), en las extremidades superiores (BMC), en las extremidades inferiores (BMC), en el cuello femoral (BMD), triangulo de Ward's (BMC), triangulo de Ward's (BMD) y en la espina lumbar que los niños del grupo CAG<sub>S</sub> (P<0.05, Tabla 2, incorporada en anexo artículo 2).

No hubo diferencias significativas en las niñas entre los grupos CAG<sub>S</sub> y CAG<sub>L</sub> (Tabla 2, incorporada en anexo artículo 2). Después de ajustar por las variables confusoras (edad, talla, peso, porcentaje de grasa, Tanner H, Tanner G), no se apreciaron diferencias significativas en ninguna región medida en relación al CAG<sub>S</sub> y CAG<sub>L</sub> en niños ni en niñas.



### **Efectos del polimorfismo GGN del AR en la composición corporal**

Los niños que poseían un polimorfismo GGN<sub>L</sub> tenían una mayor densidad mineral ósea en las extremidades superiores que aquellos con un GGN<sub>S</sub>. Estas diferencias se mantuvieron significativas después de ajustar por las variables confusoras (edad, talla, peso, porcentaje de grasa, Tanner H, Tanner G) (P<0.05). Las niñas clasificadas tanto en el grupo GGN<sub>S</sub> o GGN<sub>L</sub> no mostraron ninguna diferencia en cualquiera de las mediciones.

### **Correlaciones**

Las correlaciones de Spearman ajustadas mostraron una asociación positiva entre el número de repeticiones CAG, el BMD de las extremidades inferiores y el BMC del triángulo de Ward's en niños (r=0.16 and 0.14 respectivamente, P<0.05), y una asociación negativa entre el BMC del triángulo de Ward, BMD y la longitud de repeticiones del GGN en niños (r = -0.18 y 0.17, respectivamente, p < 0.05).

### **5.3. Resumen de los resultados del artículo III (En revisión)**

*Androgen receptor gene CAG and GGN repeat polymorphism influence fat accumulation: a longitudinal study from adolescence to adult age.*

### **Polimorfismo CAG del AR, composición corporal y VO<sub>2</sub>max al inicio del estudio.**

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la edad, peso, talla, masa corporal magra ni en la aptitud cardiorrespiratoria (VO<sub>2</sub>max) entre los grupos CAG<sub>S</sub> y CAG<sub>L</sub> (Tabla 1, incorporada en anexo artículo 3).

Sin embargo, el BMI, el porcentaje de grasa corporal, el cuerpo entero y la masa grasa del tronco fueron menores en el CAG<sub>S</sub> comparado con el grupo del CAG<sub>L</sub>. (P=0.04, P=0.03, P=0.03 y P=0.05, respectivamente) (Figura 2a), incluso teniendo en cuenta el estado puberal (P=0.002, P=0.05, P=0.01, P=0.02; respectivamente), la edad (P=0.003, P=0.07, P=0.01 y P=0.03, respectivamente), o ambos como covariables (P=0.002, P=0.05, P=0.01, P=0.02; respectivamente) (Tabla 1, incorporada en anexo artículo 3). Estas diferen-

cias se mantuvieron estadísticamente diferentes después de considerar el  $VO_2\text{max}$  (ml/kg de peso corporal/min), la edad y el estadio del Tanner ( $P=0.004$ ,  $P=0.08$ ,  $P=0.02$  y  $P=0.04$ , respectivamente).

El grupo  $CAG_S$ , en comparación con el grupo  $CAG_L$  poseía una mayor masa total corporal magra, y masa magra en las extremidades inferiores y superiores después de considerar el estadio del Tanner (todos  $P<0.05$ ), edad (todos  $P<0.05$ ), estadio de Tanner y la edad (todos  $P=0.01$ ) o  $VO_2\text{max}$  (L/min) mostraron una tendencia a ser mayor en  $CAG_L$  comparado con el  $CAG_S$  después de considerar la etapa de Tanner ( $P=0.07$ ), la edad ( $P=0.13$ ), o ambos como covariables ( $P=0.08$ ).

### **Polimorfismo GGN del AR, composición corporal y $VO_2\text{max}$ al inicio del estudio.**

No se observaron diferencias significativas entre los grupos  $GGN_S$  y  $GGN_L$  en la edad, la masa corporal, la talla, la composición corporal y el  $VO_2\text{max}$  (Tabla 2, incorporada en anexo artículo 3). Sin embargo, el porcentaje de grasa corporal, la masa corporal y la grasa del tronco fueron menores en  $GGN_S$  en comparación con el grupo  $GGN_L$  después de considerar la etapa del Tanner y el  $VO_2\text{max}$  (ml/kg de peso corporal/min) (todos  $P<0.05$ ).

No se observaron diferencias significativas en la masa magra entre grupos GGN incluso después de considerar el estadio del Tanner, la edad o el  $VO_2\text{max}$ . Tampoco hubo una diferencia en el  $VO_2\text{max}$  entre grupos GGN, incluso teniendo en cuenta el estadio de Tanner, la edad, la masa magra total o la masa magra de las extremidades inferiores.

### **Polimorfismo CAG del AR en la edad adulta y cambios longitudinales en la composición corporal.**

No se observaron diferencias significativas entre los grupos  $CAG_S$  y  $CAG_L$  en la edad, la talla, el gasto diario de energía y el tiempo transcurrido entre las dos medidas. Sin embargo, el grupo  $CAG_L$  acumuló  $11.4 \pm 2.0$  kg más de masa corporal total y  $2.3 \pm 3.4$  kg de grasa corporal total que el grupo  $CAG_S$  durante los  $13.7 \pm 0.6$  años de seguimiento ( $P=0.04$  y  $P=0.03$ , respectivamen-

te). Por otra parte, el grupo CAG<sub>L</sub> mostró una mayor masa corporal, BMI, masa grasa del cuerpo entero y del tronco en comparación con CAG<sub>S</sub> (P=0.001, P=0.001, P=0.05 y P=0.04, respectivamente), incluso teniendo en cuenta la edad (P=0.001, P=0.001, P=0.04 y P=0.06, respectivamente), por el gasto total de energía (P=0.002, P=0.001, P=0.04 y P=0.03, respectivamente), el VO<sub>2</sub>max (ml/kg de masa corporal/min) ( todos P<0.001 ), MFO por kg de masa magra total (P=0.003, P=0.002, P=0.06 y P=0.04, respectivamente) o para todas las covariables conjuntamente (todos P< 0.01). No hubo diferencias significativas en el porcentaje de grasa corporal entre los grupos (P=0.25), incluso teniendo en cuenta la edad (P=0.29), el gasto energético total (P=0.20), o el MFO por kg de masa magra total (P=0.27). Sin embargo, después de ajustar por el VO<sub>2</sub>max (ml/kg de peso corporal/min), el porcentaje de grasa corporal fue de un 27% mayor en CAG<sub>L</sub> en comparación con el CAG<sub>S</sub> (P=0.03).

Por otra parte, el CAG<sub>L</sub> también mostró mayor masa magra en las extremidades inferiores (15%) y de las extremidades superiores (22%), así como una mayor masa magra total corporal (16%) en comparación con el CAG<sub>S</sub> (todos, P<0.01), incluso después de considerar como covariable la edad (todos, P<0.01), el gasto energético total (todos, P<0.01), VO<sub>2</sub>max (ml/kg de masa corporal/min) (todos, P<0.01), o para todas las covariables conjuntamente (todos, P<0.01). A su vez, el grupo CAG<sub>L</sub> acumuló 5.8 g/día más de masa magra total en comparación con CAG<sub>S</sub> (4.1 g/día) durante el tiempo de seguimiento (P=0.02).

El grupo CAG<sub>L</sub> mostró un 9% mayor de masa magra en las extremidades inferiores que el CAG<sub>S</sub> (P=0.048), pero esta diferencia se perdió después de considerar la edad (P=0.06). La MFO (valores absolutos), MFO por kg de la masa magra de las extremidades inferiores y MFO por kg de la masa magra total fueron mayores en el CAG<sub>L</sub> que en el grupo CAG<sub>S</sub> (P=0.01, P=0.09, y P=0.12, respectivamente, incluso después de considerar la edad (P=0.01, P=0.09, y P=0.12, respectivamente), el VO<sub>2</sub>max (P=0.02, P=0.12, y P=0.16, respectivamente), o ambas covariables conjuntamente (P=0.01, P=0.12, y P=0.16, respectivamente). El RMR fue un 15% mayor en el CAG<sub>L</sub> que en el

grupo CAG<sub>S</sub> (P=0.03). Esta diferencia desapareció después de considerar la edad (P=0.06), la masa magra total (P=0.30) o para ambas conjuntamente (P=0.98).

### **Polimorfismo GGN del AR en la edad adulta y cambios longitudinales en la composición corporal.**

No existieron diferencias significativas en la edad, la talla, el gasto diario de energía y el tiempo transcurrido entre las dos mediciones observadas entre los grupos GGN<sub>S</sub> y GGN<sub>L</sub>. Ambos grupos del GGN tenían similar composición corporal, incluso después de considerar la edad, el gasto energético total, el VO<sub>2</sub>max, (ml.kg de masa corporal<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) o MFO por kg de masa magra total. Sin embargo, el GGN<sub>L</sub> tenía un porcentaje mayor de masa grasa de todo el cuerpo y masa grasa del tronco que el grupo GGN<sub>S</sub> después de considerar el VO<sub>2</sub>max (ml.kg de masa corporal<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) y MFO por kg de masa magra total conjuntamente (todo P<0.05). Los sujetos del grupo GGN<sub>S</sub> y los sujetos con un GGN<sub>L</sub> acumularon un 6.4 ± 8.3 y 7.6 ± 10.8 kg de grasa en todo el cuerpo 13.7 ± 0.6 en los años de seguimiento respectivamente. Esta diferencia en la acumulación de masa grasa no fue estadísticamente significativa (P=0.67), incluso después de considerar la edad inicial, cambios en el VO<sub>2</sub>max, la talla corporal, la masa inicial de grasa corporal, la oxidación de grasas basal y el MFO como covariables.

## **DISCUSIÓN**

## 6. Discusión

**Estudio I:** *Androgen receptor CAG and GGN repeat polymorphisms are associated with performance in boys and girls. (En revisión).*

Este estudio demostró que los niños prepúberes con un alelo CAG<sub>S</sub> tenían un rendimiento en el test de 300m un 5.5% superior a aquellos que poseían un CAG<sub>L</sub>, indicando que un genotipo CAG<sub>S</sub> podría ser asociado con un incremento de la capacidad anaeróbica. Este estudio también demuestra que un genotipo GGN largo está asociado con un mejor VO<sub>2</sub>max en niñas prepúberes. Estos resultados contrastan con los obtenidos en estudios realizados por nuestro laboratorio y por otros autores, en los que no se observa asociación entre las repeticiones CAG y GGN y la composición corporal y condición física en 282 hombres jóvenes (Guadalupe-Grau *et al.*, 2011), y masa muscular en 677 en hombres respectivamente (De Naeyer *et al.*, 2014).

Se ha demostrado que un número de repeticiones cortas del polimorfismo CAG y GGN está asociado con una mayor actividad androgénica (Chamberlain *et al.*, 1994; Ding *et al.*, 2005; Perez-Gomez *et al.*, 2008). Esto podría facilitar una mayor adquisición de masa muscular durante el crecimiento en humanos. Durante el crecimiento el eje gonadal hipotalámico-pituitario está relativamente silenciado y las gónadas sólo producen una cantidad pequeña de andrógenos. En este entorno de baja biodisponibilidad de andrógenos los individuos que posean cualquiera de las repeticiones polimórficas, bien CAG o GGN cortos podrían beneficiarse de una señalización androgénica más eficiente, estimulando una mayor adquisición de masa muscular en comparación con sus contrapartes que tengan el alelo más largo. De acuerdo con esta hipótesis, la presente investigación muestra que los niños que poseen un número de repeticiones CAG<sub>≤21</sub>, desarrollaron una velocidad un 5.5% mayor en el test de carrera de 300m que los que tenían un CAG<sub>>21</sub>. El rendimiento en el test de 300m, depende de la masa muscular, del VO<sub>2</sub>max y de la capacidad anaeróbica (Perez-Gomez *et al.*, 2008). Como nosotros no encontramos diferencias ni en la masa muscular ni en el VO<sub>2</sub>max

entre el grupo CAG corto y largo, la explicación más probable para las diferencias en el rendimiento es una mayor capacidad anaeróbica asociada con el fenotipo CAG<sub>S</sub>. Esto concuerda bien con la mayor capacidad anaeróbica de los hombres en comparación con las mujeres, en parte debido a su mayor capacidad glucolítica muscular (Komi & Karlsson, 1978; Green *et al.*, 1984). Esto puede ser debido también en parte a la expresión aumentada de fibras musculares de tipo II con aumento de la sensibilidad de andrógenos. De hecho, algunos estudios sugieren que los hombres poseen mayor proporción de fibras tipo II en el músculo vasto lateral que las mujeres (Steffensen *et al.*, 2002; Guadalupe-Grau *et al.*, 2009).

Voorhoeve y colaboradores investigaron la relación entre la repetición polimórfica CAG del receptor de andrógenos (AR) y el crecimiento longitudinal desde la pre pubertad hasta la edad adulta joven (Voorhoeve *et al.*, 2011). En este estudio, se encontró que la desviación estándar de la talla estaba asociada inversamente con la longitud del número de repeticiones CAG en niños prepúberales y púberes. Esta asociación disminuye en los años siguientes y desaparece por completo después de la edad de 16 años. En concordancia, la presente investigación no encontró ninguna diferencia en la longitud del número de repeticiones CAG<sub>S</sub> y CAG<sub>L</sub> en nuestros niños de mayor edad. Voorhoeve y col no encontraron ninguna asociación entre la longitud del CAG y las variables de composición corporal (Voorhoeve *et al.*, 2011). Sin embargo, la condición física no fue evaluada en esta investigación (Voorhoeve *et al.*, 2011).

La influencia de las repeticiones polimórficas GGN del AR en la composición corporal o en el rendimiento no ha sido estudiada en niños y los datos en adultos son escasos (Guadalupe-Grau *et al.*, 2010b; Guadalupe-Grau *et al.*, 2011; Ponce-Gonzalez *et al.*, 2012). Los estudios existentes han informado de la falta de asociación entre la longitud de repeticiones del GGN con la condición física (Guadalupe-Grau *et al.*, 2010b; Guadalupe-Grau *et al.*, 2011; Ponce-Gonzalez *et al.*, 2012) y la composición corporal (Guadalupe-Grau *et al.*, 2010b; Guadalupe-Grau *et al.*, 2011; Ponce-Gonzalez *et al.*, 2012; De

Naeyer *et al.*, 2014). En las niñas, nosotros hemos observado una mayor capacidad aeróbica ( $VO_2\max$ ) en el grupo  $GGN_L$ . Dado que esta diferencia estaba presente después de considerar las diferencias en la composición corporal, parece razonable suponer que el polimorfismo de repetición GGN puede influir en el sistema de transporte y/o de utilización de oxígeno. Durante el ejercicio del cuerpo entero el  $VO_2\max$  depende en mayor medida de la difusión de  $O_2$  y en menor medida de la extracción de  $O_2$  por los músculos (Saltin & Strange, 1992; Saltin & Calbet, 2006). La asociación entre la longitud de repetición GGN y el  $VO_2\max$  podrían deberse a una mayor capacidad de transporte de oxígeno en el grupo  $GGN_L$ , lo que podría explicarse por una mayor capacidad de bombeo del corazón o del aumento arterial del contenido de  $O_2$  por un aumento en la concentración de hemoglobina o un intercambio pulmonar de gases más eficiente. Sin embargo, los parámetros hematológicos no han sido asociados a los polimorfismos del AR (van der Harst *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013). El corazón expresa tanto receptores de andrógenos como de estrógenos y es funcionalmente sensible a los esteroides sexuales circulantes. Aunque la testosterona puede facilitar la hipertrofia cardíaca (Marsh *et al.*, 1998; Basualto-Alarcon *et al.*, 2013) ninguna asociación se ha informado hasta ahora entre la capacidad de bombeo del corazón y la cantidad o actividad de los andrógenos. Por otra parte, la longitud de repeticiones polimórficas del GGN está asociada lineal e inversamente con el contenido de proteína del AR en cultivos celulares (Ding *et al.*, 2005). Debido a la interacción de esteroides sexuales en el corazón, un  $GGN_L$  podría traducirse en un manejo más eficiente del calcio, lo que podría favorecer una mayor capacidad de bombeo del corazón (Bell *et al.*, 2013). Sin embargo, esto último requiere pruebas específicas que no son posibles de realizar en niños, debido a la necesidad de la utilización de catéteres para obtener valores precisos de gasto cardíaco durante el ejercicio. Finalmente, otro mecanismo por el que un polimorfismo  $GGN_L$  podría influir en el  $VO_2\max$  es por favorecer una mayor expresión de las fibras tipo I. Una mayor acción androgénica se asocia con una mayor expresión de fibras de tipo IIa, como se muestra por la mayor área de sección transversal y proporción de fibras tipo IIa en los hombres



que en las mujeres (Staron *et al.*, 2000). Las fibras musculares tipo I tienen mayor capacidad oxidativa en comparación con las tipo IIa y IIx (Shortreed *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2010), por lo que un fenotipo muscular con fibras tipo I predominantes, favorecerían una mayor extracción muscular de O<sub>2</sub> y por lo tanto el VO<sub>2</sub>max (Calbet *et al.*, 2005). De acuerdo con esta explicación estudios basados en necropsias han demostrado en los niños un aumento progresivo en la proporción de fibras tipo II con la maduración (Lexell *et al.*, 1992), esto es debido al aumento de los niveles de testosterona. En resumen, los polimorfismos de repetición del receptor de andrógenos CAG y GGN están asociados con la capacidad de ejercicio en niños. En los varones un genotipo CAG más corto se asocia con un mayor rendimiento en el sprint prolongado, probablemente mediado por una capacidad anaeróbica mejorada. En niñas un GGN largo de repeticiones polimórficas está asociado con un aumento del VO<sub>2</sub>max, después de considerar el tamaño del cuerpo. Se requieren más estudios con un enfoque mecanicista para determinar los mecanismos por los cuales una repetición polimórfica del GGN largo podría favorecer un mayor VO<sub>2</sub>max en las niñas.

**Estudio II:** *Androgen receptor CAG and GGN repeat polymorphisms and bone mass in boys and girls. (En revisión).*

En contraste con nuestra hipótesis, el principal resultado de este estudio muestra que los niños clasificados como GGN largo, después de ajustar por posibles factores de confusión como la altura, el peso y estado puberal, muestran una mayor masa ósea en las extremidades superiores que aquellos que tienen un polimorfismo GGN corto. Además, ni la longitud del polimorfismo CAG ni GGN parecen tener una influencia sobre la masa ósea y la densidad mineral ósea en niñas prepúberes.

La longitud del CAG largo ha sido asociada con un aumento del BMC y BMD (Kannus *et al.*, 1995; Simm *et al.*, 2008; Guadalupe-Grau *et al.*, 2010b), en el presente estudio los niños con un CAG largo, tenían un promedio más alto de los valores en las siguientes variables: estatura, peso, contenido mi-

neral óseo de todo el cuerpo, extremidades superiores e inferiores, y del triángulo de Ward's así como la densidad mineral ósea del cuerpo total, extremidades inferiores, cuello femoral, triángulo de Ward's y columna lumbar. De esta manera, Lappalainen y col informaron de una correlación positiva entre el IMC y el número de repeticiones del CAG (Lappalainen *et al.*, 2008), mientras que otro estudio realizado con varones adolescentes no confirmó tal asociación entre la composición corporal y las repeticiones del CAG (Voorhoeve *et al.*, 2011). El trabajo previo de nuestro laboratorio ha demostrado que no hay relación entre la actividad física, masa muscular, niveles de testosterona libre, osteocalcina y la longitud del número de repeticiones de CAG en un grupo de 282 hombres jóvenes sanos (Guadalupe-Grau *et al.*, 2010b; Guadalupe-Grau *et al.*, 2011). Sin embargo, otro estudio que investigó la relación entre el polimorfismo CAG del receptor de andrógenos y el crecimiento longitudinal desde la prepubertad hasta la adolescencia encontró que las puntuaciones de la desviación estándar de la altura fueron inversamente asociadas con la longitud de repeticiones del receptor de andrógenos CAG en varones jóvenes, prepuberales y puberales de temprana edad. Esta asociación disminuye en los años siguientes y desaparece por completo después de los 16 años de edad (Voorhoeve *et al.*, 2011). De acuerdo con este estudio, nosotros no encontramos diferencias en la altura en el CAG<sub>S</sub> y CAG<sub>L</sub> en nuestros niños mayores. Otros estudios indican que la edad, la actividad física, la composición corporal, los niveles de esteroides sexuales y la antropometría son determinantes de la masa muscular y la función en hombres jóvenes, y aunque el número de repeticiones del CAG del AR están relacionados con los niveles de esteroides sexuales y la antropometría, no hay evidencias de que estas variaciones en el gen AR también afecta a la masa o a la función del músculo (De Naeyer *et al.*, 2014).

Las diferencias observadas en la presente investigación con los datos publicados anteriormente podrían explicarse por el grado de actividad física de los niños. Nuestros participantes practicaban actividad física al menos tres veces a la semana durante dos o más años en la escuela o en clubes deportivos como actividad extraescolar. Por lo tanto, el efecto añadido del po-

tencial de albergar un polimorfismo CAG<sub>s</sub> en la masa ósea puede no ser suficientemente grande para ser detectado por encima del bien conocido efecto de la actividad física y la participación deportiva en la adquisición de masa ósea durante el crecimiento (Vicente-Rodríguez *et al.*, 2005). Se requieren estudios adicionales para determinar si la repetición del polimorfismo CAG está asociada con la masa ósea en los niños sedentarios y cómo este polimorfismo podría modular los efectos osteogénicos en la actividad física.

Alternativamente, se puede argumentar que en un adulto en el que el funcionamiento del eje hipotalámico-pituitario gonadal sea normal, un feedback de testosterona disminuido en el caso de un polimorfismo largo CAG del AR, está compensado por una producción de andrógenos incrementada mediante estimulación por LH (Krithivas *et al.*, 1999; Walsh *et al.*, 2005; Crabbe *et al.*, 2007). Se ha sugerido que varios efectos fenotípicos son probablemente más atribuibles a la acción del estrógeno que a la acción de los andrógenos, debido a la mayor eficacia en la proporción bioactiva de estrógeno/andrógeno al aumentar la longitud del CAG en el AR (Huhtaniemi *et al.*, 2009). En los niños prepúberes el eje hipotalámico-hipofisario-gonadal no responde como en la edad adulta, debido a que el eje está relativamente silenciado y las gónadas sólo producen pequeñas cantidades de andrógenos.

Además, una cantidad muy pequeña de andrógenos es producida por las glándulas suprarrenales, que no son controladas bajo el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal. Se podría argumentar que en estos niños, el mecanismo de compensación de aumentar la producción de andrógenos en el aumento de AR en la longitud de repetición del CAG está ausente. Por lo tanto, los niños prepúberes con repeticiones en el CAG largo del AR son relativamente andrógeno-deficientes en comparación con los niños prepúberes con repeticiones cortas CAG del AR, dando lugar a diferencias sutiles en el crecimiento puberal como se muestra en nuestro estudio.

Aunque la influencia de las repeticiones del polimorfismo GGN del AR sobre la masa ósea no ha sido estudiada en niños, nosotros hemos encontra-

do una correlación positiva entre la longitud de sus repeticiones, la BMD en diferentes regiones del esqueleto y marcadores de formación ósea (osteocalcina) en hombres jóvenes (Guadalupe-Grau *et al.*, 2010b) y mujeres jóvenes (Ponce-Gonzalez *et al.*, 2012). Estos estudios apoyan la hipótesis mencionada anteriormente de un periodo de oportunidad de crecimiento óseo en aquellos niños con una actividad androgénica relativamente menor. Sin embargo, se necesitan más estudios que corroboren esta hipótesis, especialmente en niños físicamente inactivos.

En conclusión, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que los alelos largos del polimorfismo CAG y GGN del AR están asociados con un aumento de la masa ósea en niños prepuberales, mientras que ninguna asociación aparente se encuentra en niñas prepúberes.

**Estudio III:** *Androgen receptor gene CAG and GGN repeat polymorphism influence fat accumulation: a longitudinal study from adolescence to adult age. (En revisión).*

Este estudio muestra que el polimorfismo de repetición CAG determina cambios a largo plazo en la masa grasa en seres humanos. Así, los individuos jóvenes con un CAG<sub>S</sub> tenían una menor masa grasa en el cuerpo entero y en la región del tronco, y una masa magra corporal total inferior comparado con los sujetos con un CAG<sub>L</sub>. Estas diferencias en la composición corporal se mantuvieron hasta la edad adulta. Más importante aún, hemos demostrado que el CAG<sub>L</sub> se asocia con aumento de la grasa corporal total y la ganancia de masa magra con el crecimiento que el genotipo CAG<sub>S</sub>.

De acuerdo con nuestros resultados en la edad adolescente, el grupo de Mouritsen en un estudio con datos transversales de 78 chicos daneses sanos reportaron una mayor grasa corporal en CAG<sub>L</sub> comparado con el grupo CAG<sub>S</sub> (Mouritsen *et al.*, 2013). Nuestros resultados también están de acuerdo con los datos transversales obtenidos en hombres adultos informando que el polimorfismo de repetición CAG se asocia positivamente con el mayor contenido de grasa corporal (Zitzmann *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2010), y la masa

magra (Walsh *et al.*, 2005). Estas asociaciones podrían deberse a una mayor sensibilidad de los andrógenos, ya que se ha demostrado que las repeticiones del CAG corto se asocian a un aumento de la actividad de transactivación del AR y a un fuerte potencial transcripcional (Lee & Chang, 2003).

De este modo, los sujetos con un CAG más corto pueden haber aumentado la capacidad de respuesta a los andrógenos, resultando en una menor acumulación de grasa con los años. De acuerdo con esta interpretación, existe evidencia convincente que indica que la administración de andrógenos reduce la masa grasa, mientras que en los hombres los niveles de andrógenos reducidos se asocian con una menor masa magra y una mayor masa grasa (Mauras *et al.*, 1998; Emmelot-Vonk *et al.*, 2008). El aumento de masa magra observado en el grupo CAG<sub>L</sub> es probablemente debido a una mayor masa grasa, ya que se ha demostrado en 24 hombres jóvenes delgados ( $21 \pm 2$  años) que los aumentos de masa libre de grasa ( $2.8 \pm 1.5$  kg) incrementan con la acumulación de masa grasa ( $5.3 \pm 1.9$  kg) después de 100 días de sobrealimentación (Bouchard *et al.*, 1990), a pesar de un aumento no significativo ( $0.9 \pm 0.6$  nmol/L) en los niveles de testosterona (Pritchard *et al.*, 1998). De hecho, en el presente estudio la proporción entre la masa grasa y la masa magra fue similar en los grupos CAG<sub>S</sub> y CAG<sub>L</sub> (datos mostrados). La posible influencia del polimorfismo GGN sobre la acumulación de masa grasa durante el crecimiento no ha sido analizada anteriormente. Como novedad, nosotros hemos observado que el polimorfismo de repetición GGN corto se asocia con un menor porcentaje de grasa corporal, y masa grasa del cuerpo entero del tronco en adolescentes. Sin embargo, en la edad adulta, solo el porcentaje de grasa corporal y la masa grasa en la región del tronco mostraron una tendencia a ser menores en el grupo GGN<sub>S</sub> comparado con el grupo GGN<sub>L</sub>. En concordancia, se ha demostrado que la longitud del tracto GGN está lineal e inversamente asociada con el contenido de proteínas del AR en cultivos celulares (Ding *et al.*, 2005), y un tracto largo del GGN resulta en una actividad del AR linealmente reducida por célula (Ding *et al.*, 2005). Por lo tanto, esta reducción de la actividad del AR con las repeticiones más largas del GGN podría atenuar los efectos antiobesidad de los andrógenos que puede ser

más notorio en la edad joven, cuando el nivel de los andrógenos es probablemente inferior. Puesto que éste es el primer estudio que examina la influencia de la longitud de las repeticiones polimórficas del AR en la composición corporal a edades tempranas, no existen datos comparables en la actualidad. Estudios reportados previamente de nuestro laboratorio mostraron que la repetición del polimorfismo GGN se asocia positivamente con la adiposidad en mujeres adultas pero no en los hombres (Ponce-Gonzalez *et al.*, 2012). La falta de influencia de repeticiones del GGN sobre la adiposidad en la edad adulta en los hombres de este estudio podría explicarse por el hecho de que en la actual cohorte la mayoría de los hombres tenían unas repeticiones de longitudes cercanas a la media de la población. Por lo tanto, las investigaciones futuras deberían examinar la composición corporal y los cambios en el crecimiento en sujetos con repeticiones de longitud extremas en el GGN.

Ara y su equipo mostraron que los humanos obesos tienen mayor capacidad de oxidación de grasas en comparación con aquellos que tienen normopeso (Ara *et al.*, 2011). Este hallazgo está en concordancia con nuestros resultados, ya que el grupo CAG<sub>L</sub> en la edad adulta mostró mayor adiposidad y masa magra, lo que podría aumentar su capacidad RMR y MFO comparado con el grupo CAG<sub>S</sub>. Además, el número de repeticiones del polimorfismo GGN se ha asociado positivamente con la MFO en la edad adulta en nuestro estudio.

Se ha sugerido que la edad, la masa magra corporal y el VO<sub>2</sub>max son factores determinantes de la capacidad de oxidación de grasas en los seres humanos (Nordby *et al.*, 2006; Riddell *et al.*, 2008). El equipo de Venables ha demostrado en 300 sujetos (143 mujeres y 157 hombres) que el nivel de actividad física, el VO<sub>2</sub>max y el género eran predictores significativos de la MFO/FFM, siendo responsables de hasta un 12% de la varianza. Sin embargo, estos factores no pueden afectar a nuestros resultados, ya que todos los grupos eran de la misma edad, nivel de actividad física, VO<sub>2</sub>max relativa, y sólo hombres participaron en este estudio. La principal limitación de este

estudio es el pequeño número de sujetos que tienen el polimorfismo de repetición corto o largo en el AR que se incluyeron en el análisis longitudinal. Esto se debió a que algunos sujetos que comenzaron a fumar, mientras que otros se perdieron debido a los cambios de residencia o negativa a las pruebas de seguimiento. A pesar de esta limitación, nuestras conclusiones son sólidas, ya que se derivan de la evaluación de múltiples factores que influyen en la acumulación de masa grasa, como la aptitud física y la oxidación de grasa máxima y son la base de un largo periodo de seguimiento.

En conclusión, las repeticiones del polimorfismo del receptor de andrógenos CAG y GGN determinan la masa grasa y su distribución regional en varones sanos adolescentes. Además, el polimorfismo de repetición CAG también determina la tasa de acumulación de grasa durante el crecimiento, desde la adolescencia a la edad adulta. La asociación entre el polimorfismo CAG del AR y la masa magra es probablemente debido al aumento del peso corporal, ya que se explica principalmente por el aumento de la masa magra en las extremidades inferiores.

# **CONCLUSIONES (CONCLUSIONS)**



## 7. Conclusiones

Las investigaciones realizadas sobre los polimorfismos del gen del receptor de andrógenos incluidos en esta tesis permiten explicar parte de la variabilidad de variables de composición corporal como son la cantidad de masa muscular, masa grasa (y su acumulación), masa ósea así como el rendimiento físico en niños y niñas en crecimiento. Estos conocimientos son de gran interés en Medicina y en las Ciencias del Deporte, especialmente para diseñar estrategias terapéuticas para tratar enfermedades y procesos que cursan con pérdida de masa muscular y ósea durante el crecimiento, así como para tener en cuenta la influencia de ciertos polimorfismos del receptor de andrógenos en la acumulación de grasa con los años y en la capacidad de oxidación de grasas.

Las principales conclusiones alcanzadas con los estudios integrados en esta tesis doctoral son por tanto las siguientes:

- 1) Los polimorfismos CAG cortos del gen del receptor de andrógenos están relacionados con una mayor capacidad anaeróbica en niños prepúberes físicamente activos.
- 2) Los polimorfismos GGN largos del gen del receptor de andrógenos están relacionados con una mayor capacidad aeróbica en niñas prepúberes físicamente activas.
- 3) Los alelos largos de los polimorfismos de repetición CAG y GGN del receptor de andrógenos están asociados con una mayor masa ósea en niños prepúberes.
- 4) No existe relación aparente entre la masa ósea y los polimorfismos de repetición CAG y GGN del receptor de andrógenos en niñas prepúberes.

- 5) Los polimorfismos de repetición cortos del receptor de andrógenos CAG y GGN determinan una menor cantidad y distribución regional de masa grasa en varones adolescentes.
- 6) El polimorfismo CAG del gen del receptor de andrógenos influencia la acumulación de la masa grasa a lo largo de los años desde la niñez hasta la edad adulta en varones.
- 7) Los polimorfismos de repetición cortos del receptor de andrógenos influyen en la capacidad máxima para oxidar grasas en varones adultos.

## Conclusions

The research about the androgen receptor gene polymorphisms included in this thesis offers new explanations on the variability body composition variables and physical fitness of children during growth. It also partially explains the variability on fat mass accumulation.

The main conclusions are::

- 1) A short CAG androgen receptor gene polymorphism seem to be associated with greater anaerobic capacity in physically active prepubescent children
- 2) A long GGN androgen receptor gene polymorphism seem to be associated with a greater aerobic capacity in physically active prepubescent girls.
- 3) A long allele of CAG and GGN repeat polymorphisms is associated with greater bone mass in physically active prepubescent boys.
- 4) There is no apparent relationship between bone mass and CAG and GGN repeat polymorphisms in prepubescent girls.
- 5) Short CAG and GGN repeat polymorphisms is associated with lower accumulation of total and regional fat mass in male adolescent.
- 6) The CAG androgen receptor gene polymorphism seems to have an influence on the accumulation of fat mass from childhood to adult life in boys.
- 7) Short androgen receptor gene repeat polymorphisms seem to have an influence on maximal fat oxidation capacity in adult males.

# **BIBLIOGRAFÍA**

## 8. Bibliografía

- Aarsland A, Chinkes D & Wolfe RR. (1997). Hepatic and whole-body fat synthesis in humans during carbohydrate overfeeding. *Am J Clin Nutr* **65**, 1774-1782.
- Achten J, Gleeson M & Jeukendrup AE. (2002). Determination of the exercise intensity that elicits maximal fat oxidation. *Med Sci Sports Exerc* **34**, 92-97.
- Andreoli A, Monteleone M, Van Loan M, Promenzio L, Tarantino U & De Lorenzo A. (2001). Effects of different sports on bone density and muscle mass in highly trained athletes. *Med Sci Sports Exerc* **33**, 507-511.
- Ara I, Larsen S, Stallknecht B, Guerra B, Morales-Alamo D, Andersen JL, Ponce-Gonzalez JG, Guadalupe-Grau A, Galbo H, Calbet JA & Helge JW. (2011). Normal mitochondrial function and increased fat oxidation capacity in leg and arm muscles in obese humans. *Int J Obes (Lond)* **35**, 99-108.
- Ara I, Vicente-Rodriguez G, Jimenez-Ramirez J, Dorado C, Serrano-Sanchez JA & Calbet JA. (2004). Regular participation in sports is associated with enhanced physical fitness and lower fat mass in prepubertal boys. *Int J Obes Relat Metab Disord* **28**, 1585-1593.
- Aubert B, Barate R, Boutigny D, Couderc F, Karyotakis Y, Lees JP, Poireau V, (2005). Improved measurements of CP-violating asymmetry amplitudes in  $B^0 \rightarrow \pi^+ \pi^-$  decays. *Phys Rev Lett* **95**, 151803.
- Bahouth SW, Sowinski KM & Lima JJ. (2001). Regulation of human beta(1)-adrenergic receptors and their mRNA in neuroepithelioma SK-N-MC cells: effects of agonist, forskolin, and protein kinase A. *Biochem Pharmacol* **62**, 1211-1220.
- Bamman MM, Shipp JR, Jiang J, Gower BA, Hunter GR, Goodman A, McLafferty CL, Jr. & Urban RJ. (2001). Mechanical load increases muscle IGF-I and androgen receptor mRNA concentrations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280**, E383-390.
- Basualto-Alarcon C, Jorquera G, Altamirano F, Jaimovich E & Estrada M. (2013). Testosterone signals through mTOR and androgen receptor to induce muscle hypertrophy. *Med Sci Sports Exerc* **45**, 1712-1720.
- Baxter-Jones AD, Kontulainen SA, Faulkner RA & Bailey DA. (2008). A longitudinal study of the relationship of physical activity to bone mineral accrual from adolescence to young adulthood. *Bone* **43**, 1101-1107.

- Bell JR, Bernasochi GB, Varma U, Raaijmakers AJ & Delbridge LM. (2013). Sex and sex hormones in cardiac stress--mechanistic insights. *J Steroid Biochem Mol Biol* **137**, 124-135.
- Bhasin S, Storer TW, Berman N, Yarasheski KE, Clevenger B, Phillips J, Lee WP, Bunnell TJ & Casaburi R. (1997). Testosterone replacement increases fat-free mass and muscle size in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 407-413.
- Bhasin S, Woodhouse L & Storer TW. (2001). Proof of the effect of testosterone on skeletal muscle. *J Endocrinol* **170**, 27-38.
- Bouchard C, Tremblay A, Despres JP, Nadeau A, Lupien PJ, Theriault G, Dussault J, Moorjani S, Pinault S & Fournier G. (1990). The response to long-term overfeeding in identical twins. *N Engl J Med* **322**, 1477-1482.
- Bradney M, Pearce G, Naughton G, Sullivan C, Bass S, Beck T, Carlson J & Seeman E. (1998). Moderate exercise during growth in prepubertal boys: changes in bone mass, size, volumetric density, and bone strength: a controlled prospective study. *J Bone Miner Res* **13**, 1814-1821.
- Brinkmann AO, Faber PW, van Rooij HC, Kuiper GG, Ris C, Klaassen P, van der Korput JA, Voorhorst MM, van Laar JH, Mulder E & et al. (1989). The human androgen receptor: domain structure, genomic organization and regulation of expression. *J Steroid Biochem* **34**, 307-310.
- Buchan IE, Heller RF, Clayton P, Bundred PE & Cole TJ. (2005). Early life risk factors for obesity in childhood: early feeding is crucial target for preventing obesity in children. *BMJ* **331**, 453-454; author reply 454.
- Buller RE, Sood AK, Lallas T, Buekers T & Skilling JS. (1999). Association between nonrandom X-chromosome inactivation and BRCA1 mutation in germline DNA of patients with ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* **91**, 339-346.
- Calbet JA, Chavarren J & Dorado C. (1997). Fractional use of anaerobic capacity during a 30- and a 45-s Wingate test. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **76**, 308-313.
- Calbet JA, Dorado C, Diaz-Herrera P & Rodriguez-Rodriguez LP. (2001). High femoral bone mineral content and density in male football (soccer) players. *Med Sci Sports Exerc* **33**, 1682-1687.

- Calbet JA, Holmberg HC, Rosdahl H, van Hall G, Jensen-Urstad M & Saltin B. (2005). Why do arms extract less oxygen than legs during exercise? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **289**, R1448-1458.
- Calbet JA, Moysi JS, Dorado C & Rodriguez LP. (1998). Bone mineral content and density in professional tennis players. *Calcif Tissue Int* **62**, 491-496.
- Castelo-Branco C. (2009). Osteoporosis y Menopausia. *Madrid: Editorial Médica Panamericana, SA.*
- Courteix D, Lespessailles E, Peres SL, Obert P, Germain P & Benhamou CL. (1998). Effect of physical training on bone mineral density in prepubertal girls: a comparative study between impact-loading and non-impact-loading sports. *Osteoporos Int* **8**, 152-158.
- Crabbe P, Bogaert V, De Bacquer D, Goemaere S, Zmierzak H & Kaufman JM. (2007). Part of the interindividual variation in serum testosterone levels in healthy men reflects differences in androgen sensitivity and feedback set point: contribution of the androgen receptor polyglutamine tract polymorphism. *J Clin Endocrinol Metab* **92**, 3604-3610.
- Chamberlain NL, Driver ED & Miesfeld RL. (1994). The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic Acids Res* **22**, 3181-3186.
- De Naeyer H, Bogaert V, De Spaey A, Roef G, Vandewalle S, Derave W, Taes Y & Kaufman JM. (2014). Genetic variations in the androgen receptor are associated with steroid concentrations and anthropometrics but not with muscle mass in healthy young men. *PLoS One* **9**, e86235.
- Ding D, Xu L, Menon M, Reddy GP & Barrack ER. (2005). Effect of GGC (glycine) repeat length polymorphism in the human androgen receptor on androgen action. *Prostate* **62**, 133-139.
- Duke PM, Litt IF & Gross RT. (1980). Adolescents' self-assessment of sexual maturation. *Pediatrics* **66**, 918-920.
- Ekelund U, Sardinha LB, Anderssen SA, Harro M, Franks PW, Brage S & Cooper AR. (2004). Associations between objectively assessed physical activity and indicators of body fatness in 9- to 10-y-old European children: a population-based study from 4 distinct regions in Europe (the European Youth Heart Study). *Am J Clin Nutr* **80**, 584-590.

- El Hage RP, Courteix D, Benhamou CL, Jacob C & Jaffre C. (2009). Relative importance of lean and fat mass on bone mineral density in a group of adolescent girls and boys. *Eur J Appl Physiol* **105**, 759-764.
- Emmelot-Vonk MH, Verhaar HJ, Nakhai Pour HR, Aleman A, Lock TM, Bosch JL, Grobbee DE & van der Schouw YT. (2008). Effect of testosterone supplementation on functional mobility, cognition, and other parameters in older men: a randomized controlled trial. *JAMA* **299**, 39-52.
- Faber PW, Kuiper GG, van Rooij HC, van der Korput JA, Brinkmann AO & Trapman J. (1989). The N-terminal domain of the human androgen receptor is encoded by one, large exon. *Mol Cell Endocrinol* **61**, 257-262.
- Fassler C, Vic P, Mazingue F, Nelken B, Robert Y, Defauw B, Courbon B & Farriaux JP. (1995). [Radiological case of the month. Cystic lymphangioma of the omentum]. *Arch Pediatr* **2**, 793-795.
- Flodgren G, Hedelin R & Henriksson-Larsen K. (1999). Bone mineral density in flatwater sprint kayakers. *Calcif Tissue Int* **64**, 374-379.
- Frayn KN. (1983). Calculation of substrate oxidation rates in vivo from gaseous exchange. *J Appl Physiol* **55**, 628-634.
- Gao T, Marcelli M & McPhaul MJ. (1996). Transcriptional activation and transient expression of the human androgen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* **59**, 9-20.
- Giovannucci E, Stampfer MJ, Krithivas K, Brown M, Dahl D, Brufsky A, Talcott J, Hennekens CH & Kantoff PW. (1997). The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3320-3323.
- Glastre C, Braillon P, David L, Cochat P, Meunier PJ & Delmas PD. (1990). Measurement of bone mineral content of the lumbar spine by dual energy x-ray absorptiometry in normal children: correlations with growth parameters. *J Clin Endocrinol Metab* **70**, 1330-1333.
- Gonzalez A, Javier Dorta F, Rodriguez G, Brito B, Rodriguez MA, Cabrera A, Diaz-Chico JC, Reyes R, Aguirre-Jaime A & Nicolas Diaz-Chico B. (2007). Increased risk of breast cancer in women bearing a combination of large CAG and GGN repeats in the exon 1 of the androgen receptor gene. *Eur J Cancer* **43**, 2373-2380.
- Gordon CL, Halton JM, Atkinson SA & Webber CE. (1991). The contributions of growth and puberty to peak bone mass. *Growth Dev Aging* **55**, 257-262.



- Gracia-Marco L, Rey-Lopez JP, Santaliestra-Pasias AM, Jimenez-Pavon D, Diaz LE, Moreno LA & Vicente-Rodriguez G. (2012). Sedentary behaviours and its association with bone mass in adolescents: the HELENA Cross-Sectional Study. *BMC Public Health* **12**, 971.
- Green HJ, Fraser IG & Ranney DA. (1984). Male and female differences in enzyme activities of energy metabolism in vastus lateralis muscle. *J Neurol Sci* **65**, 323-331.
- Guadalupe-Grau A, Ara I, Dorado C, Vicente-Rodriguez G, Perez-Gomez J, Cabrero JC, Serrano-Sanchez JA, Santana A & Calbet JA. (2010a). Osteocalcin as a negative regulator of serum leptin concentration in humans: insight from triathlon competitions. *Eur J Appl Physiol* **110**, 635-643.
- Guadalupe-Grau A, Perez-Gomez J, Olmedillas H, Chavarren J, Dorado C, Santana A, Serrano-Sanchez JA & Calbet JA. (2009). Strength training combined with plyometric jumps in adults: sex differences in fat-bone axis adaptations. *J Appl Physiol (1985)* **106**, 1100-1111.
- Guadalupe-Grau A, Rodriguez-Gonzalez FG, Dorado C, Olmedillas H, Fuentes T, Perez-Gomez J, Delgado-Guerra S, Vicente-Rodriguez G, Ara I, Guerra B, Arteaga-Ortiz R, Calbet JA & Diaz-Chico BN. (2011). Androgen receptor gene polymorphisms lean mass and performance in young men. *Br J Sports Med* **45**, 95-100.
- Guadalupe-Grau A, Rodriguez-Gonzalez FG, Ponce-Gonzalez JG, Dorado C, Olmedillas H, Fuentes T, Perez-Gomez J, Sanchis-Moysi J, Diaz-Chico BN & Calbet JA. (2010b). Bone mass and the CAG and GGN androgen receptor polymorphisms in young men. *PLoS One* **5**, e11529.
- Gunter KB, Almstedt HC & Janz KF. (2012). Physical activity in childhood may be the key to optimizing lifespan skeletal health. *Exerc Sport Sci Rev* **40**, 13-21.
- Gustafson DR, Wen MJ & Koppanati BM. (2003). Androgen receptor gene repeats and indices of obesity in older adults. *Int J Obes Relat Metab Disord* **27**, 75-81.
- Gutin B, Yin Z, Humphries MC & Barbeau P. (2005). Relations of moderate and vigorous physical activity to fitness and fatness in adolescents. *Am J Clin Nutr* **81**, 746-750.
- Heemers HV & Tindall DJ. (2007). Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocr Rev* **28**, 778-808.

- Huhtaniemi IT, Pye SR, Limer KL, Thomson W, O'Neill TW, Platt H, Payne D, John SL, Jiang M, Boonen S, Borghs H, Vanderschueren D, Adams JE, Ward KA, Bartfai G, Casanueva F, Finn JD, Forti G, Giwercman A, Han TS, Kula K, Lean ME, Pendleton N, Punab M, Silman AJ & Wu FC. (2009). Increased estrogen rather than decreased androgen action is associated with longer androgen receptor CAG repeats. *J Clin Endocrinol Metab* **94**, 277-284.
- Jaaskelainen J, Korhonen S, Kuulasmaa T, Kurl S, Niskanen L, Vanhala M, Hippelainen M, Voutilainen R & Heinonen S. (2008). Androgen receptor gene CAG repeat length in women with metabolic syndrome. *Gynecol Endocrinol* **24**, 411-416.
- Jiang LQ, Garcia-Roves PM, de Castro Barbosa T & Zierath JR. (2010). Constitutively active calcineurin in skeletal muscle increases endurance performance and mitochondrial respiratory capacity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **298**, E8-E16.
- Kannus P, Haapasalo H, Sankelo M, Sievanen H, Pasanen M, Heinonen A, Oja P & Vuori I. (1995). Effect of starting age of physical activity on bone mass in the dominant arm of tennis and squash players. *Ann Intern Med* **123**, 27-31.
- Kazemi-Esfarjani P, Trifiro MA & Pinsky L. (1995). Evidence for a repressive function of the long polyglutamine tract in the human androgen receptor: possible pathogenetic relevance for the (CAG)<sub>n</sub>-expanded neuropathies. *Hum Mol Genet* **4**, 523-527.
- Koletzko B. (2005). Early nutrition and its later consequences: new opportunities. *Adv Exp Med Biol* **569**, 1-12.
- Komi PV & Karlsson J. (1978). Skeletal muscle fibre types, enzyme activities and physical performance in young males and females. *Acta Physiol Scand* **103**, 210-218.
- Krithivas K, Yurgalevitch SM, Mohr BA, Wilcox CJ, Batter SJ, Brown M, Longcope C, McKinlay JB & Kantoff PW. (1999). Evidence that the CAG repeat in the androgen receptor gene is associated with the age-related decline in serum androgen levels in men. *J Endocrinol* **162**, 137-142.
- Kukuvitis A, Georgiou I, Bouba I, Tsirka A, Giannouli CH, Yapijakis C, Tarlatzis B, Bontis J, Lolis D, Sofikitis N & Papadimas J. (2002). Association of oestrogen receptor alpha polymorphisms and androgen receptor CAG trinucleotide repeats with male infertility: a study in 109 Greek infertile men. *Int J Androl* **25**, 149-152.

- Lappalainen S, Utriainen P, Kuulasmaa T, Voutilainen R & Jaaskelainen J. (2008). Androgen receptor gene CAG repeat polymorphism and X-chromosome inactivation in children with premature adrenarche. *J Clin Endocrinol Metab* **93**, 1304-1309.
- Lee DK & Chang C. (2003). Endocrine mechanisms of disease: Expression and degradation of androgen receptor: mechanism and clinical implication. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 4043-4054.
- Leger L & Boucher R. (1980). An indirect continuous running multistage field test: the Universite de Montreal track test. *Can J Appl Sport Sci* **5**, 77-84.
- Leger LA, Mercier D, Gadoury C & Lambert J. (1988). The multistage 20 metre shuttle run test for aerobic fitness. *J Sports Sci* **6**, 93-101.
- Lehtonen-Veromaa M, Mottonen T, Svedstrom E, Hakola P, Heinonen OJ & Viikari J. (2000). Physical activity and bone mineral acquisition in peripubertal girls. *Scand J Med Sci Sports* **10**, 236-243.
- Lexell J, Sjostrom M, Nordlund AS & Taylor CC. (1992). Growth and development of human muscle: a quantitative morphological study of whole vastus lateralis from childhood to adult age. *Muscle Nerve* **15**, 404-409.
- Li J, Glessner JT, Zhang H, Hou C, Wei Z, Bradfield JP, Mentch FD, Guo Y, Kim C, Xia Q, Chiavacci RM, Thomas KA, Qiu H, Grant SF, Furth SL, Hakonarson H & Sleiman PM. (2013). GWAS of blood cell traits identifies novel associated loci and epistatic interactions in Caucasian and African-American children. *Hum Mol Genet* **22**, 1457-1464.
- Lima F, De Falco V, Baima J, Carazzato JG & Pereira RM. (2001). Effect of impact load and active load on bone metabolism and body composition of adolescent athletes. *Med Sci Sports Exerc* **33**, 1318-1323.
- Ljunggren Ö. (2006). *El hueso vivo*. Suecia: Sparre Lifespan.
- Lubahn DB, Joseph DR, Sullivan PM, Willard HF, French FS & Wilson EM. (1988). Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science* **240**, 327-330.
- Lyon MF. (1999). X-chromosome inactivation. *Curr Biol* **9**, R235-237.
- Lloyd RS FA, Stone MH, Oliver JL, Jeffreys I, Moody JA, Brewer C, Pierce KC, McCambridge TM, Howard R, Herrington L, Hainline B, Micheli LJ, Jaques R, Kraemer WJ, McBride MG, Best TM, Chu DA, Alvar BA,

- Myer GD. . (2014). Position statement on youth resistance training: the 2014 International Consensus. *Br J Sports Med* **48(7)**, 498-505.
- Lloyd RS, Faigenbaum AD, Stone MH, Oliver JL, Jeffreys I, Moody JA, Brewer C, Pierce KC, McCambridge TM, Howard R, Herrington L, Hainline B, Micheli LJ, Jaques R, Kraemer WJ, McBride MG, Best TM, Chu DA, Alvar BA & Myer GD. (2014). Position statement on youth resistance training: the 2014 International Consensus. *Br J Sports Med* **48**, 498-505.
- MacKelvie KJ, Khan KM & McKay HA. (2002). Is there a critical period for bone response to weight-bearing exercise in children and adolescents? a systematic review. *Br J Sports Med* **36**, 250-257; discussion 257.
- Maimoun L & Sultan C. (2011). Effects of physical activity on bone remodeling. *Metabolism* **60**, 373-388.
- Marsh JD, Lehmann MH, Ritchie RH, Gwathmey JK, Green GE & Schiebinger RJ. (1998). Androgen receptors mediate hypertrophy in cardiac myocytes. *Circulation* **98**, 256-261.
- Matkovic V, Fontana D, Tominac C, Goel P & Chesnut CH, 3rd. (1990). Factors that influence peak bone mass formation: a study of calcium balance and the inheritance of bone mass in adolescent females. *Am J Clin Nutr* **52**, 878-888.
- Mauras N, Hayes V, Welch S, Rini A, Helgeson K, Dokler M, Veldhuis JD & Urban RJ. (1998). Testosterone deficiency in young men: marked alterations in whole body protein kinetics, strength, and adiposity. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 1886-1892.
- Mitsumori K, Terai A, Oka H, Segawa T, Ogura K, Yoshida O & Ogawa O. (1999). Androgen receptor CAG repeat length polymorphism in benign prostatic hyperplasia (BPH): correlation with adenoma growth. *Prostate* **41**, 253-257.
- Monteiro PO & Victora CG. (2005). Rapid growth in infancy and childhood and obesity in later life--a systematic review. *Obes Rev* **6**, 143-154.
- Morris NM & Udry JR. (1980). Validation of a self-administered instrument to assess stage of adolescent development. *J Youth Adolesc* **9**, 271-280.
- Mouritsen A, Hagen CP, Sorensen K, Aksglaede L, Mieritz MG, Main KM, Almstrup K, Rajpert-De Meyts E & Juul A. (2013). Androgen receptor CAG repeat length is associated with body fat and serum SHBG in boys: a prospective cohort study. *J Clin Endocrinol Metab* **98**, E605-609.

- Nielsen TL, Hagen C, Wraae K, Bathum L, Larsen R, Brixen K & Andersen M. (2010). The impact of the CAG repeat polymorphism of the androgen receptor gene on muscle and adipose tissues in 20-29-year-old Danish men: Odense Androgen Study. *Eur J Endocrinol* **162**, 795-804.
- Nordby P, Saltin B & Helge JW. (2006). Whole-body fat oxidation determined by graded exercise and indirect calorimetry: a role for muscle oxidative capacity? *Scand J Med Sci Sports* **16**, 209-214.
- Ojeda SR, Lomniczi A, Mastronardi C, Heger S, Roth C, Parent AS, Matagne V & Mungenast AE. (2006). Minireview: the neuroendocrine regulation of puberty: is the time ripe for a systems biology approach? *Endocrinology* **147**, 1166-1174.
- Pate RR, Dowda M & Ross JG. (1990). Associations between physical activity and physical fitness in American children. *Am J Dis Child* **144**, 1123-1129.
- Perez-Farinos N, Lopez-Sobaler AM, Dal Re MA, Villar C, Labrado E, Robledo T & Ortega RM. (2013). The ALADINO study: a national study of prevalence of overweight and obesity in Spanish children in 2011. *Biomed Res Int* **2013**, 163687.
- Perez-Gomez J, Rodriguez GV, Ara I, Olmedillas H, Chavarren J, Gonzalez-Henriquez JJ, Dorado C & Calbet JA. (2008). Role of muscle mass on sprint performance: gender differences? *Eur J Appl Physiol* **102**, 685-694.
- Ponce-Gonzalez JG, Guadalupe-Grau A, Rodriguez-Gonzalez FG, Dorado C, Olmedillas H, Fuentes T, Rodriguez-Garcia L, Diaz-Chico BN & Calbet JA. (2012). Androgen receptor gene polymorphisms and the fat-bone axis in young men and women. *J Androl* **33**, 644-650.
- Pritchard J, Despres JP, Gagnon J, Tchernof A, Nadeau A, Tremblay A & Bouchard C. (1998). Plasma adrenal, gonadal, and conjugated steroids before and after long-term overfeeding in identical twins. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 3277-3284.
- Rajender S, Singh L & Thangaraj K. (2007). Phenotypic heterogeneity of mutations in androgen receptor gene. *Asian J Androl* **9**, 147-179.
- Ramsay JA, Blimkie CJ, Smith K, Garner S, MacDougall JD & Sale DG. (1990). Strength training effects in prepubescent boys. *Med Sci Sports Exerc* **22**, 605-614.

- Raudrant D & Rabe T. (2003). Progestogens with antiandrogenic properties. *Drugs* **63**, 463-492.
- Riddell MC, Jamnik VK, Iscoe KE, Timmons BW & Gledhill N. (2008). Fat oxidation rate and the exercise intensity that elicits maximal fat oxidation decreases with pubertal status in young male subjects. *J Appl Physiol (1985)* **105**, 742-748.
- Roca LJ, Caeiro, J. R., González-Rubio, Y., Calvo-Crespo, E., Gil, E., Mesa, M., Fernández, A., Fernández, A. (2010). Guía de práctica osteoporosis.
- Rodriguez-Gonzalez G, Cabrera S, Ramirez-Moreno R, Bilbao C, Diaz-Chico JC, Serra L, Chesa N, Cabrera JJ & Diaz-Chico BN. (2009). Short alleles of both GGN and CAG repeats at the exon-1 of the androgen receptor gene are associated to increased PSA staining and a higher Gleason score in human prostatic cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* **113**, 85-91.
- Rodriguez G, Bilbao C, Ramirez R, Falcon O, Leon L, Chirino R, Falcon O, Jr., Diaz BP, Rivero JF, Perucho M, Diaz-Chico BN & Diaz-Chico JC. (2006). Alleles with short CAG and GGN repeats in the androgen receptor gene are associated with benign endometrial cancer. *Int J Cancer* **118**, 1420-1425.
- Ross MH, & Pawlina, W. . (2009). Histología : texto y atlas color con biología celular y molecular *Buenos Aires: Panamericana*.
- Roy AK, Lavrovsky Y, Song CS, Chen S, Jung MH, Velu NK, Bi BY & Chatterjee B. (1999). Regulation of androgen action. *Vitam Horm* **55**, 309-352.
- Saltin B & Calbet JA. (2006). Point: in health and in a normoxic environment, VO<sub>2</sub> max is limited primarily by cardiac output and locomotor muscle blood flow. *J Appl Physiol (1985)* **100**, 744-745.
- Saltin B & Strange S. (1992). Maximal oxygen uptake: "old" and "new" arguments for a cardiovascular limitation. *Med Sci Sports Exerc* **24**, 30-37.
- Sanchis-Moysi J, Dorado C, Olmedillas H, Serrano-Sanchez JA & Calbet JA. (2010). Bone mass in prepubertal tennis players. *Int J Sports Med* **31**, 416-420.
- Sheffield-Moore M. (2000). Androgens and the control of skeletal muscle protein synthesis. *Ann Med* **32**, 181-186.
- Shortreed KE, Krause MP, Huang JH, Dhanani D, Moradi J, Ceddia RB & Hawke TJ. (2009). Muscle-specific adaptations, impaired oxidative

- capacity and maintenance of contractile function characterize diet-induced obese mouse skeletal muscle. *PLoS One* **4**, e7293.
- Simm PJ, Bajpai A, Russo VC & Werther GA. (2008). Estrogens and growth. *Pediatr Endocrinol Rev* **6**, 32-41.
- Stanworth RD, Kapoor D, Channer KS & Jones TH. (2008). Androgen receptor CAG repeat polymorphism is associated with serum testosterone levels, obesity and serum leptin in men with type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol* **159**, 739-746.
- Staron RS, Hagerman FC, Hikida RS, Murray TF, Hostler DP, Crill MT, Ragg KE & Toma K. (2000). Fiber type composition of the vastus lateralis muscle of young men and women. *J Histochem Cytochem* **48**, 623-629.
- Steffensen CH, Roepstorff C, Madsen M & Kiens B. (2002). Myocellular triacylglycerol breakdown in females but not in males during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**, E634-642.
- Tanner JM. (1962). *Growth at adolescence*. 2nd Ed. Oxford Blackell: Londres.
- van der Harst P, Zhang W, Mateo Leach I, Rendon A, Verweij N, Sehmi J & Paul DS. (2012). Seventy-five genetic loci influencing the human red blood cell. *Nature* **492**, 369-375.
- Vicente-Rodríguez G. (2006). How does exercise affect bone development during growth? *Sports Med* **36**, 561-569.
- Vicente-Rodríguez G, Ara I, Perez-Gomez J, Dorado C & Calbet JA. (2005). Muscular development and physical activity as major determinants of femoral bone mass acquisition during growth. *Br J Sports Med* **39**, 611-616.
- Vicente-Rodríguez G, Ara I, Perez-Gomez J, Serrano-Sanchez JA, Dorado C & Calbet JA. (2004). High femoral bone mineral density accretion in prepubertal soccer players. *Med Sci Sports Exerc* **36**, 1789-1795.
- Vicente-Rodríguez G, Dorado C, Ara I, Perez-Gomez J, Olmedillas H, Delgado-Guerra S & Calbet JA. (2007). Artistic versus rhythmic gymnastics: effects on bone and muscle mass in young girls. *Int J Sports Med* **28**, 386-393.
- Vicente-Rodríguez G, Jimenez-Ramirez J, Ara I, Serrano-Sanchez JA, Dorado C & Calbet JA. (2003). Enhanced bone mass and physical fitness in prepubescent footballers. *Bone* **33**, 853-859.

- Vicente-Rodriguez G, Ortega FB, Rey-Lopez JP, Espana-Romero V, Blay VA, Blay G, Martin-Matillas M & Moreno LA. (2009). Extracurricular physical activity participation modifies the association between high TV watching and low bone mass. *Bone* **45**, 925-930.
- Vivanco-Munoz N, Jo T, Gerardo HB, Juan T & Clark P. (2012). Physical activity and dark skin tone: protective factors against low bone mass in Mexican men. *J Clin Densitom* **15**, 374-379.
- Voorhoeve PG, van Mechelen W, Uitterlinden AG, Delemarre-van de Waal HA & Lamberts SW. (2011). Androgen receptor gene CAG repeat polymorphism in longitudinal height and body composition in children and adolescents. *Clin Endocrinol (Oxf)* **74**, 732-735.
- Walsh FS & Celeste AJ. (2005). Myostatin: a modulator of skeletal-muscle stem cells. *Biochem Soc Trans* **33**, 1513-1517.
- Walsh S, Zmuda JM, Cauley JA, Shea PR, Metter EJ, Hurley BF, Ferrell RE & Roth SM. (2005). Androgen receptor CAG repeat polymorphism is associated with fat-free mass in men. *J Appl Physiol* **98**, 132-137.
- Wang Q, Alen M, Nicholson PH, Halleen JM, Alatalo SL, Ohlsson C, Suominen H & Cheng S. (2006). Differential effects of sex hormones on peri- and endocortical bone surfaces in pubertal girls. *J Clin Endocrinol Metab* **91**, 277-282.
- Young B, & Heath, J. W. . (2008). *Wheater's Histología funcional*. Ed. 4. Barcelona: Elsevier España S.L.
- Zitzmann M, Gromoll J, von Eckardstein A & Nieschlag E. (2003). The CAG repeat polymorphism in the androgen receptor gene modulates body fat mass and serum concentrations of leptin and insulin in men. *Diabetologia* **46**, 31-39.



**ANEXOS: ESTUDIO I-III**

## **ESTUDIO I**

## British Journal of Sports Medicine

### Androgen receptor CAG and GGN repeat polymorphisms are associated with performance in boys and girls.

Journal:	<i>British Journal of Sports Medicine</i>
Manuscript ID:	Draft
Article Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Rodríguez-García, Lorena; University of Las Palmas de Gran Canaria, Physical Education; University of Las Palmas de Gran Canaria, Research Institute of Biomedical and Health Sciences Ponce-Gonzalez, Jesus Gustavo; University of Las Palmas de Gran Canaria, Department of Physical Education; University of Las Palmas de Gran Canaria, Research Institute of Biomedical and Health Sciences González-Henriquez, Juan J; University of Las Palmas de Gran Canaria, Research Institute of Biomedical and Health Sciences; University of Las Palmas de Gran Canaria, Department of Mathematics Rodríguez-González, Francisco G.; University of Las Palmas de Gran Canaria, Department of Biochemistry and Physiology; Canary Islands Cancer Research Institute (ICIC), Díaz-Chico, Bonifacio N; University of Las Palmas de Gran Canaria, Department of Biochemistry and Physiology; Canary Islands Cancer Research Institute (ICIC), Calbet, Jose Antonio; University of Las Palmas de Gran Canaria, Department of Physical Education; University of Las Palmas de Gran Canaria, Research Institute of Biomedical and Health Sciences Dorado, Cecilia; University of Las Palmas de Gran Canaria, Physical Education; University of Las Palmas de Gran Canaria, Research Institute of Biomedical and Health Sciences Guadalupe-Grau, Amelia; University of Las Palmas de Gran Canaria, Physical Education

SCHOLARONE™  
Manuscripts

## Androgen receptor CAG and GGN repeat polymorphisms are associated with performance in boys and girls.

Lorena Rodríguez-García<sup>1-2</sup>, Jesús G. Ponce-González<sup>1-2</sup>, Juan J González-Henriquez<sup>2-3</sup>, Francisco G. Rodríguez-González<sup>4-5</sup>, Bonifacio N Díaz-Chico<sup>4-5</sup>, Jose A L Calbet<sup>1-2</sup>, Cecilia Dorado<sup>1-2</sup>, Amelia Guadalupe-Grau<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Department of Physical Education, University of Las Palmas de Gran Canaria, Campus Universitario de Tafira s/n, Las Palmas de Gran Canaria, 35017, Spain

<sup>2</sup> Research Institute of Biomedical and Health Sciences, University of Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, Spain

<sup>3</sup> Department of Mathematics, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Spain

<sup>4</sup> Department of Biochemistry and Physiology, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Spain

<sup>5</sup> Canary Islands Cancer Research Institute (ICIC), Las Palmas de Gran Canaria, Canary Islands, Spain

**Running title:** “Androgen receptor and performance in children”

**Keywords:** Muscle, strength, androgen receptor polymorphisms, fitness, pre and pubertal growth.

**Word count:** 2936.

Correspondence to:

Amelia Guadalupe-Grau, PhD.

Department of Physical Education,

Faculty of Sport Sciences, University of Las Palmas de Gran Canaria, Spain.

Address: Campus Universitario de Tafira s/n, Las Palmas de Gran Canaria, 35017, Spain

Phone: 0034--911349218

e-mail: [amelia.guadalupe@gmail.com](mailto:amelia.guadalupe@gmail.com)

1  
2  
3 **Abstract**  
4

5  
6 **Background.** The androgen receptor gene (AR) contains two polymorphic trinucleotide  
7  
8 microsatellites in exon 1 due to repetitions of the glutamine codon (CAG) and the  
9  
10 glycine codon (GGN). Shorter CAG and GGN repeat polymorphism is associated with  
11  
12 stronger androgen signaling, and therefore, could influence lean mass and exercise  
13  
14 performance during growth. **Methods.** Physical fitness was measured by standardized  
15  
16 procedures and the length of CAG and GGN repeats was determined by PCR and  
17  
18 fragment analysis in 152 boys ( $11.5 \pm 2.6$  years; Tanner  $\leq 5$ ) and 116 girls ( $10.1 \pm 3.2$   
19  
20 years; Tanner  $\leq 5$ ). Body composition was assessed by dual energy x-ray  
21  
22 absorptiometry (DXA). Individuals were grouped as CAG short (CAG<sub>S</sub>) if harboring  
23  
24 repeat lengths of  $\leq 21$  and CAG long (CAG<sub>L</sub>) if CAG  $> 21$ . Moreover, subjects were  
25  
26 grouped as GGN short (GGN<sub>S</sub>) if harboring repeat lengths of  $\leq 23$  and GGN long  
27  
28 (GGN<sub>L</sub>) if GGN  $> 23$ . **Results.** No significant differences in age, height, body mass, and  
29  
30 body composition were observed between either CAG<sub>S</sub> and CAG<sub>L</sub> groups and GGN<sub>S</sub>  
31  
32 and GGN<sub>L</sub> groups. Boys harboring CAG<sub>S</sub> completed the 300m test faster than their  
33  
34 CAG<sub>L</sub> counterparts. Moreover, girls from the GGN<sub>L</sub> group showed a significant higher  
35  
36 VO<sub>2</sub>max than those in the GGN<sub>S</sub> group. These differences were maintained after  
37  
38 correcting by age, body mass, tanner stage and height. **Conclusions.** The length of CAG  
39  
40 repeat of the AR gene is associated to anaerobic performance in boys, whereas the  
41  
42 length of GGN of the AR gene is associated to aerobic capacity in girls.  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## 21 Introduction

22 The androgen receptor (AR), also known as NRC4 (nuclear receptor subfamily 3, group  
23 C, member 4), is a type of nuclear receptor activated by transmembrane binding to  
24 androgenic hormones such as testosterone or dihydrotestosterone <sup>1</sup>. The AR gene is  
25 located on the long arm of chromosome X (Xq 11-12) <sup>2</sup>. This gene consists of 8 exons  
26 and encodes a protein having 919 amino acid residues. The exon 1 of this gene has two  
27 polymorphic repeats motives (CAG and GGN), which encode polyglutamine and  
28 polyglycine respectively, of variable lengths at the N-terminal (transactivation domain)  
29 of AR protein <sup>3</sup>. Several studies have shown high expression of ARs in skeletal muscle  
30 tissue <sup>4,5</sup> this being even higher in response to muscle overload <sup>6</sup>.

31 The CAG repeat varies in length or number of repetitions between 8 and 35,  
32 with an average of 22. The GGN, which is a complex repeat, is represented as  
33 (GGT<sub>3</sub>GGG<sub>1</sub>GGT<sub>2</sub>GGC)<sub>n</sub> and ranges from 10 to 30 repetitions <sup>3</sup>. The length of CAG  
34 repeat polymorphism and AR transactivation potential are inversely correlated <sup>7,8</sup>.  
35 Although GGN polymorphism has been less studied than CAG polymorphism, a short  
36 GGN is associated with more androgenic activity in cell cultures <sup>9</sup>.

37 Consequently, a greater androgenic effect is expected for AR with lower CAG  
38 and GGN repeat number. In agreement, lower number of CAG repeat polymorphisms  
39 has been linked to greater fat-free mass in healthy elders <sup>10</sup>. However, in 282 physically  
40 active young men no relationship between physical fitness, muscle mass, levels of free  
41 testosterone, osteocalcin and the length of the CAG repeat number has been reported <sup>11</sup>,  
42 <sup>12</sup>.

43 In contrast to adults, little is known about the potential effect of AR CAG and  
44 GGN repeat polymorphisms in the development of physical fitness during growth.

1  
2  
3 45 Several traits influencing fitness in children may be modulated by androgens, and  
4  
5 46 therefore, by an enhanced androgen transductional activity facilitated by shorter CAG or  
6  
7 47 GGN AR polymorphisms. For example, free androgen index levels in prepubertal and  
8  
9 48 early pubertal boys engaged in systematic resistance training are shown to be higher  
10  
11 49 than their aerobic training and sedentary counterparts, evidencing the significant effect  
12  
13 50 of a specific training stimulus in this hormone-sensitive phase of maturation<sup>13</sup>. Such  
14  
15 51 associations have not been observed in girls, mainly due to the fact that testosterone is  
16  
17 52 thought not to be the main determinant of muscle growth in girls, even at the pubertal  
18  
19 53 stage<sup>14</sup>.

20  
21  
22  
23  
24 54 However, the potential benefit of an enhanced androgen signaling in girls during  
25  
26 55 the prepubertal stage is still largely unknown. Some authors suggest that there is a  
27  
28 56 progressive increase in the exposure of peripheral tissues to testosterone, given by the  
29  
30 57 raise in the systemic testosterone levels from 4 to 7 years old<sup>15</sup>. This increment might  
31  
32 58 play a role in the muscle mass development of girls before the onset of puberty, and  
33  
34 59 might be enhanced by shorter CAG AR polymorphisms.

35  
36  
37  
38 60 Although less studied, endurance capacity may be also enhanced by the action of  
39  
40 61 androgens. Human lungs express AR<sup>16</sup> and studies performed in mammal lung showed  
41  
42 62 that androgen treatment increases expression of genes involved in oxygen transport,  
43  
44 63 such as those encoding hemoglobin, oxygen binding, heme binding and iron ion  
45  
46 64 binding, therefore suggesting a potential role of enhanced AR signaling and aerobic  
47  
48 65 fitness<sup>17</sup>. Although no differences have been observed in respect to aerobic fitness  
49  
50 66 among prepubertal boys and girls<sup>18</sup>, genetic determinants that could influence the  
51  
52 67 oxygen transport system via an enhanced androgenic environment remain unexplored.  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 68 Therefore our hypothesis is that short CAG or GGN repeat polymorphisms of  
4  
5 69 the gene encoding the androgen receptor are associated with greater muscle mass, lower  
6  
7 70 fat mass and enhanced fitness in children.  
8  
9

10  
11 71 The aim of this study was to determine whether the CAG and GGN androgen  
12  
13 72 receptor repeat polymorphisms are associated with body composition and the physical  
14  
15 73 fitness in children.  
16  
17  
18  
19  
20

## 21 **Methods**

22  
23  
24 76 Pre and peripubertal children (152 boys and 116 girls, all Tanner stage <5) agreed to  
25  
26 77 participate in this study. Subjects were recruited from sports clubs in Gran Canaria  
27  
28 78 (Spain) aged between 7 and 13 years. Children with chronic illness or taking  
29  
30 79 medications were excluded. The study was performed in accordance with the Helsinki  
31  
32 80 Declaration of 1975 as regards the conduct of clinical research, being approved by the  
33  
34 81 Ethical Committee of the University of Las Palmas de Gran Canaria. Volunteers and  
35  
36 82 parents were informed about the study risk and benefits and provided written consent  
37  
38 83 before the start of the studies. Pubertal Tanner status was self-assessed<sup>19</sup>, using a valid  
39  
40 84<sup>20</sup> and reproducible ( $r = 0.97$ )<sup>21</sup> procedure.  
41  
42  
43  
44

### 45 *Body composition*

46  
47  
48 86 Whole body composition was assessed with dual-energy X-ray absorptiometry (DXA;  
49  
50 87 QDR-1500, Hologic Corp., Software version 7.10, Waltham, Massachusetts, USA).  
51  
52 88 Upper and lower limbs lean mass were calculated using the regional analysis feature of  
53  
54 89 the software, as previously described<sup>22, 23</sup>.  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 904  
5  
6 91 *Vertical jump performance and running sprint tests*

7  
8  
9 92 The forces generated during vertical jumps were measured with a force platform  
10  
11 93 (Kistler Quattro Jump, Winterthur, Switzerland). During this test, two differing types of  
12  
13 94 jumps were executed. The first was a squat jump (SJ), performed from a static position  
14  
15 95 with the knees bent at 90°. The second type of jump was a countermovement jump  
16  
17 96 (CMJ) starting from the upright position. The CMJ was executed with a fast downward  
18  
19 97 movement down to a 90° knee flexion, followed by a rapid vertical jump. Jumping  
20  
21 98 height (JH) and the maximal power (Wmax), generated were determined in the best of  
22  
23 99 three trials.  
24  
25  
26  
27

28 100 Thirty meters running speed was measured indoor with photocells (General  
29  
30 101 ASDE, Valencia, Spain). Subjects performed three maximal 30m sprints with 5 minute  
31  
32 102 rest periods in between.  
33  
34

35  
36 10337  
38 104 *Anaerobic Capacity*

39  
40  
41 105 The anaerobic capacity was estimated using a 300 m running test. This distance was  
42  
43 106 chosen because it has been shown that for all test lasting between 30 and 60 seconds  
44  
45 107 more than 50% of the overall energy yield is supplied by anaerobic energy sources<sup>24</sup>.

46  
47 108 The test was performed in the 400m track of the University and the time needed to  
48  
49 109 complete the distance was determined using an electronic stopwatch.  
50  
51

52  
53  
54 11055  
56  
57 111 *Maximal aerobic power*  
58  
59  
60

1  
2  
3 112 The maximal oxygen uptake ( $VO_2\max$ ) was estimated using the 20m shuttle-running  
4  
5 113 test, as previously reported <sup>25</sup>.  
6  
7

8  
9 114

10  
11 115 *CAG and GGN repeat polymorphisms*  
12

13  
14 116 DNA was extracted from saliva samples (200  $\mu$ l) using High Pure PCR Template  
15  
16 117 Preparation Kits (Roche Applied Science). To determine the length of the CAG and  
17  
18 118 GGN repeats the corresponding regions located on the exon 1 of the AR gene (Genbank  
19  
20 119 accession no. M27423) were amplified using two pairs of primers whose sequences  
21  
22 120 have been previously reported <sup>26</sup>. One primer from each pair was marked with  
23  
24 121 fluorescent dye (FAM or VIC). Amplification was performed in a 25  $\mu$ l reaction  
25  
26 122 volume, containing 50 ng of genomic DNA, 200  $\mu$ M of each deoxynucleotide  
27  
28 123 triphosphate, 1x Fast Start Taq DNA polymerase Buffer (Roche Applied Science,  
29  
30 124 Mannheim, Germany), 1x GC-rich solution buffer (Roche Applied Science) and 1U of  
31  
32 125 Fast Start Taq DNA polymerase (Roche Applied Science). The concentration of each  
33  
34 126 pair of primers was 1.2 and 1.5  $\mu$ M for the amplification of the CAG and GGN repeats,  
35  
36 127 respectively. PCR conditions were: 30 cycles of 95°C for 45 sec, 56°C for 30 sec and  
37  
38 128 72°C for 30 sec for CAG amplification; 30 cycles of 95°C for 1 min, 55°C for 2 min and  
39  
40 129 72°C for 2 min for GGN amplification. Each PCR was initiated with a denaturation step  
41  
42 130 at 95°C for 5 min and terminated with an extension step at 72°C for 5 min. The PCR  
43  
44 131 product was diluted 1:100 in distilled water and 1  $\mu$ l of the dilution was mixed with  
45  
46 132 10 $\mu$ l of formamide and 0.3  $\mu$ l of GeneScan 500 LIZ Size Standard (Applied  
47  
48 133 Biosystems, Warrington, UK), denatured at 98°C for 5 min and cooled on ice. Fragment  
49  
50 134 separation was performed by automated capillary electrophoresis, using an ABI Prism  
51  
52 135 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) and the length was determined with Gene  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 136 Scan Analysis Software (version 3.7) (Applied Biosystems). Internal standards supplied  
4  
5 137 by the manufacturer were used for quality control. We blindly repeated the genotype  
6  
7 138 analysis in 54 of the samples, and the results were completely coincident. The fragments  
8  
9 139 size was confirmed by sequencing 48 DNA samples harboring different size alleles for  
10  
11 140 both repeats by using the Big Dye Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystem) at  
12  
13 141 University of Las Palmas Sequencing Facility with excellent agreement between both  
14  
15 142 procedures. Genotyping was performed specifically for research purposes based on the  
16  
17 143 hypothesis that the aforementioned polymorphisms may influence VO<sub>2</sub> max, lean mass  
18  
19 144 and muscle strength. The genotype data of the subjects were not previously analyzed for  
20  
21 145 other non-research purposes and as such were not presented a posteriori for the present  
22  
23 146 paper. The researchers in charge of genotyping were totally blinded to the subjects'  
24  
25 147 identities, that is, blood samples were tracked solely with code numbers, and personal  
26  
27 148 identities were only made available to the main study researcher who was not involved  
28  
29 149 in actual genotyping.  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37

### 38 151 **Statistical analysis**

39  
40  
41 152 Descriptive statistics are presented as mean values with standard deviations (SD). The  
42  
43 153 homogeneity of variances was verified using the Levene test. Data normal distribution  
44  
45 154 was checked by the Shapiro-Wilks test. When necessary, the statistical analysis was  
46  
47 155 performed with logarithmically transformed data. Subjects were classified as short CAG  
48  
49 156 (CAG<sub>S</sub>), long CAG (CAG<sub>L</sub>), short GGN (GGN<sub>S</sub>) or long GGN (GGN<sub>L</sub>) using the  
50  
51 157 median length for each polymorphism as a cut off. Therefore, subjects with a CAG ≤ 21  
52  
53 158 were classified as short CAG (CAG<sub>S</sub>) and those with a CAG > 21 were classified as  
54  
55 159 long CAG (CAG<sub>L</sub>). In the case of GGN, subjects carrying a number of repetitions ≤ 23  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 160 were classified as short GGN (GGN<sub>S</sub>), and those showing a number of repetitions > 23  
4  
5 161 were considered as long GGN (GGN<sub>L</sub>). Between-group comparisons were performed  
6  
7 162 with a one-way ANOVA with age, weight, height and sexual maturation as covariates.  
8  
9 163 Statistical analysis was performed with SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA, v 15.0).  
10  
11 164 Significant differences were assumed at P <0.05.  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19

## 166 **Results**

20  
21 167 Information about boys' and girls' body composition, anthropometrics, growth status  
22  
23 168 and fitness is shown in Table 1. In boys, there was a normal distribution of 16 different  
24  
25 169 CAG alleles, ranging from 13 to 33 repeats, and 12 GGN alleles ranging from 14 to 30  
26  
27 170 repeats. In girls, 11 different CAG alleles were found, ranging from 14 to 25 repeats,  
28  
29 171 whereas the number of GGN alleles was 9, ranging from 13 to 24 repeats.  
30  
31  
32

### 172 *CAG repeat polymorphism*

33  
34  
35 173 Boys' and girls' body composition, anthropometrics, growth status and fitness in the  
36  
37 174 CAG<sub>S</sub> and CAG<sub>L</sub> groups are reported in Table 2. No significant differences in age,  
38  
39 175 height, body mass, segmental lean mass and fat mass were observed between CAG<sub>S</sub> and  
40  
41 176 CAG<sub>L</sub> groups. The aerobic capacity (VO<sub>2</sub>max), mean speed in the 30 m running test, as  
42  
43 177 well as SJ and CMJ jumping height were similar in both groups. However, in boys, the  
44  
45 178 CAG<sub>S</sub> group completed the 300m running test 5.5% faster than the CAG<sub>L</sub> group  
46  
47 179 (P<0.05, Table 2). This difference remained significant even after accounting for age,  
48  
49 180 height, body mass and sexual maturation.  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 183 *GGN repeat polymorphism*  
4  
5

6 184 Boys' and girls' body composition, anthropometrics, growth status and fitness in the  
7  
8 185 GGN<sub>S</sub> and GGN<sub>L</sub> groups are reported in Table 3. No significant differences in age,  
9  
10 186 height, body mass, segmental lean mass and fat mass were observed between GGN<sub>S</sub> and  
11  
12 187 GGN<sub>L</sub> groups. Mean speed in the 30 m and 300m running test, as well as SJ and CMJ  
13  
14 188 jumping height were similar in both groups and sexes. However, in girls, the GGN<sub>L</sub>  
15  
16 189 group showed higher VO<sub>2</sub>max values compared to the GGN<sub>S</sub> group (48.6 ± 6.0 vs 45.4  
17  
18 190 ± 4.4 respectively P<0.05, table 3). This difference remained significant even after  
19  
20 191 accounting for age, height, body mass and sexual maturation.  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 193 **Discussion**  
4  
5

6 194 This study shows that prepubertal boys carrying a CAG<sub>s</sub> allele have a 5.5% better  
7  
8 195 performance in the 300m running, indicating that s CAG<sub>s</sub> genotype may be associated  
9  
10 196 with increased anaerobic capacity. In addition, we have also shown that a long GGN  
11  
12 197 genotype is associated with enhanced VO<sub>2</sub>max in girls. This is in contrast with the  
13  
14 198 observation of no association between CAG and GGN repeat lengths and either body  
15  
16 199 composition or performance in 282 young men <sup>11</sup>, and muscle mass in 677 men <sup>27</sup>.  
17  
18  
19

20 200 It has been shown that a shorter repetition number of CAG and GGN AR  
21  
22 201 polymorphisms is associated with a higher androgen activity <sup>7-9</sup>. This could facilitate  
23  
24 202 greater muscular mass acquisition during growth in humans. During growth, the  
25  
26 203 hypothalamic-pituitary-gonadal axis is relatively silent and the gonads only produce  
27  
28 204 minor amount of androgens. In this environment of low androgen bioavailability, those  
29  
30 205 individuals carrying either CAG or GGN short repetition polymorphisms could benefit  
31  
32 206 from a more efficient androgenic signaling, stimulating greater muscle mass acquisition  
33  
34 207 compared to their longer allele carrying counterparts. In agreement, the present  
35  
36 208 investigation shows that boys carrying a CAG<sub>s</sub>≤21 showed a 5.5% higher velocity in the  
37  
38 209 running speed test (300m) than those carrying a CAG<sub>s</sub>>21. Performance in the 300 m  
39  
40 210 test depends on the muscle mass, VO<sub>2</sub>max and on the anaerobic capacity <sup>22</sup>. Since we  
41  
42 211 did not find differences in either muscle mass or VO<sub>2</sub>max between the short and long  
43  
44 212 CAG groups, the most likely explanation for the differences in performance is a greater  
45  
46 213 anaerobic capacity associated with the CAG<sub>s</sub> phenotype. This agrees well with the  
47  
48 214 greater anaerobic capacity of men compared to women, in part due to their higher  
49  
50 215 muscular glycolytic capacity <sup>28-30</sup>. This may be in part due to increased expression of  
51  
52 216 type II muscle fibers with increased androgen sensitivity. In fact, some studies suggest  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 217 that men possess greater proportion of type II fibers in the musculus vastus lateralis than  
4  
5 218 women<sup>31, 32</sup>.

6  
7  
8 219 Voorhoeve et al. investigated the relationship between the AR CAG repeat  
9  
10 220 polymorphism and longitudinal growth from prepuberty until young adult age<sup>33</sup>. In this  
11  
12 221 study, it was found that height-standard deviation scores were inversely associated with  
13  
14 222 AR CAG repeat length in boys at young, prepubertal and early pubertal age. This  
15  
16  
17 223 association diminishes in the following years and completely disappears after the age of  
18  
19 224 16 years. In agreement, we did not see any differences in the length of our CAG<sub>S</sub> and  
20  
21 225 CAG<sub>L</sub> in our older children. Moreover, no associations were found by Voorhoeve et al.<sup>33</sup>  
22  
23  
24 226 between CAG length and body composition variables. However, fitness was not  
25  
26 227 assessed (or reported) in this investigation<sup>33</sup>.

27  
28  
29 228 The influence of AR GGN repeat polymorphisms on body composition or  
30  
31 229 performance have not been studied in children and data on adults is scarce<sup>11, 12, 34</sup>. So  
32  
33 230 far, studies have reported lack of association between GGN repeat length with both  
34  
35 231 performance<sup>11, 12, 34</sup> and body composition<sup>11, 12, 27, 34</sup>. In girls, we have observed a  
36  
37 232 greater aerobic power (VO<sub>2</sub>max) in the GGN<sub>L</sub> group. Since this difference was present  
38  
39 233 after accounting for differences in body composition, it seem reasonable to assume that  
40  
41 234 the GGN repeat polymorphism may influence the oxygen transport system and/or  
42  
43 235 utilization system. During whole body exercise VO<sub>2</sub>max depends mostly on O<sub>2</sub> delivery  
44  
45 236 and to lower extend on O<sub>2</sub> extraction by the muscles<sup>35, 36</sup>. The association between the  
46  
47 237 GGN repeat length and VO<sub>2</sub>max could be due to greater oxygen transport capacity in  
48  
49 238 the GGN<sub>L</sub> group, which could explained by enhanced pumping capacity of the heart or  
50  
51 239 increased arterial O<sub>2</sub> content by either increased hemoglobin concentration or more  
52  
53 240 efficient pulmonary gas exchange. However, hematological parameters have not been  
54  
55  
56 241 associated with AR polymorphisms<sup>37, 38</sup>. The heart expresses both androgen and  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 242 estrogen receptors and is functionally responsive to circulating sex steroids<sup>39</sup>. Although  
4  
5 243 testosterone may facilitate cardiac hypertrophy<sup>40,41</sup> no association has been reported so  
6  
7 244 far between the pumping capacity of the heart and androgens. Moreover, the length of  
8  
9 245 the GGN repeat polymorphism is linearly and inversely associated with AR protein  
10  
11 246 content in cell cultures<sup>9</sup>. Due to the sex steroids interaction in the heart a longer GGN<sub>L</sub>  
12  
13 247 may translate into a more efficient calcium handling, which may favor a greater  
14  
15 248 pumping capacity of the heart<sup>39</sup>. However, the latter would require specific testing,  
16  
17 249 which is not possible in children, due to the necessity of using catheter to obtain  
18  
19 250 accurate peak cardiac output values during exercise. Finally another mechanism by  
20  
21 251 which a longer GGN polymorphism could influence VO<sub>2</sub>max is by favoring a greater  
22  
23 252 expression of type I fibers. A greater androgenic action is associated with greater  
24  
25 253 expression of type IIa fibers, as shown by the higher cross sectional area proportion of  
26  
27 254 type IIa fibers in men than women<sup>42</sup>. Predominantly type I fiber muscles have higher  
28  
29 255 oxidative capacity compared to type IIa and IIx predominant muscles<sup>43,44</sup> and such a  
30  
31 256 phenotype would favor a greater O<sub>2</sub> extraction and, hence, VO<sub>2</sub>max<sup>45</sup>. In agreement  
32  
33 257 with this explanation, necropsy-based studies have shown in boys a progressive increase  
34  
35 258 in the proportion of type II fibers with maturation<sup>46</sup>, i.e., with the increase of  
36  
37 259 testosterone levels.

38  
39  
40  
41  
42  
43 260 In summary, androgen CAG and GGN repeat polymorphism are associated with  
44  
45 261 exercise capacity in children. In boys, a shorter CAG genotype is associated with  
46  
47 262 increased performance in prolonged sprint, likely mediated by an enhanced anaerobic  
48  
49 263 capacity. In girls, a longer GGN repeat polymorphisms is associated with increased  
50  
51 264 VO<sub>2</sub>max, after accounting for body size. Further studies with a mechanistic approach  
52  
53 265 are required to determine the mechanisms by which a longer GGN repeat polymorphism  
54  
55 266 may favor a greater VO<sub>2</sub>max in girls.  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 267 **Acknowledgments**  
4  
5

6 268 The authors thank José Navarro de Tuero for his excellent technical assistance. This  
7  
8 269 study was supported by Ministerio de Educación y Ciencia (DEP2006-56076-C06-  
9  
10 270 04/ACTI) and FEDER, Gobierno de Canarias (PI2005/177), Proyecto Interreg IIIB  
11  
12 271 BIOPOLIS, Fundación del Instituto Canario de Investigación del Cáncer (FICIC),  
13  
14 272 Cabildo de Gran Canaria, Cabildo de Tenerife and La Caja de Canarias, and Proyecto  
15  
16 273 Estructurante “Integración de los grupos de investigación en Ciencias de la Salud”,  
17  
18 274 ULPGC, Gobierno de Canarias. None of the authors has conflicts of interest. All  
19  
20  
21 275 financial sources have been reported.  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

276

277 **References**

- 278 1. Roy AK, Lavrovsky Y, Song CS *et al.* Regulation of androgen action. *Vitam*  
279 *Horm* 1999; **55**: 309-52.
- 280  
281 2. Lubahn DB, Joseph DR, Sullivan PM *et al.* Cloning of human androgen receptor  
282 complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science* 1988;  
283 **240**(4850): 327-30.
- 284  
285 3. Faber PW, Kuiper GG, van Rooij HC *et al.* The N-terminal domain of the  
286 human androgen receptor is encoded by one, large exon. *Mol Cell Endocrinol*  
287 1989; **61**(2): 257-62.
- 288  
289 4. Bhasin S, Woodhouse L, Storer TW. Proof of the effect of testosterone on  
290 skeletal muscle. *J Endocrinol* 2001; **170**(1): 27-38.
- 291  
292 5. Sheffield-Moore M. Androgens and the control of skeletal muscle protein  
293 synthesis. *Ann Med* 2000; **32**(3): 181-6.
- 294  
295 6. Bamman MM, Shipp JR, Jiang J *et al.* Mechanical load increases muscle IGF-I  
296 and androgen receptor mRNA concentrations in humans. *Am J Physiol*  
297 *Endocrinol Metab* 2001; **280**(3): E383-90.
- 298  
299 7. Chamberlain NL, Driver ED, Miesfeld RL. The length and location of CAG  
300 trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect  
301 transactivation function. *Nucleic Acids Res* 1994; **22**(15): 3181-6.
- 302  
303 8. Kazemi-Esfarjani P, Trifiro MA, Pinsky L. Evidence for a repressive function of  
304 the long polyglutamine tract in the human androgen receptor: possible  
305 pathogenetic relevance for the (CAG)n-expanded neuropathies. *Hum Mol*  
306 *Genet* 1995; **4**(4): 523-7.
- 307  
308 9. Ding D, Xu L, Menon M *et al.* Effect of GGC (glycine) repeat length  
309 polymorphism in the human androgen receptor on androgen action. *Prostate*  
310 2005; **62**(2): 133-9.
- 311  
312 10. Walsh S, Zmuda JM, Cauley JA *et al.* Androgen receptor CAG repeat  
313 polymorphism is associated with fat-free mass in men. *J Appl Physiol* 2005;  
314 **98**(1): 132-7.
- 315  
316 11. Guadalupe-Grau A, Rodriguez-Gonzalez FG, Dorado C *et al.* Androgen receptor  
317 gene polymorphisms lean mass and performance in young men. *Br J Sports Med*  
318 2011; **45**(2): 95-100.

- 1  
2  
3 319  
4 320 12. Guadalupe-Grau A, Rodriguez-Gonzalez FG, Ponce-Gonzalez JG *et al.* Bone  
5 321 mass and the CAG and GGN androgen receptor polymorphisms in young men.  
6 322 *PLoS One* 2010; **5**(7): e11529.
- 8 323  
9 324 13. Tsolakis C, Xekouki P, Kaloupsis S *et al.* The influence of exercise on growth  
10 325 hormone and testosterone in prepubertal and early-pubertal boys. *Hormones*  
11 326 (*Athens*) 2003; **2**(2): 103-12.
- 13 327  
14 328 14. Rogol AD, Roemmich JN, Clark PA. Growth at puberty. *J Adolesc Health* 2002;  
15 329 **31**(6 Suppl): 192-200.
- 17 330  
18 331 15. Belgorosky A, Rivarola MA. Progressive increase in nonsex hormone-binding  
19 332 globulin-bound testosterone and estradiol from infancy to late prepuberty in  
20 333 girls. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; **67**(2): 234-7.
- 22 334  
23 335 16. Wilson CM, McPhaul MJ. A and B forms of the androgen receptor are  
24 336 expressed in a variety of human tissues. *Mol Cell Endocrinol* 1996; **120**(1): 51-  
25 337 7.
- 27 338  
28 339 17. Mikkonen L, Pihlajamaa P, Sahu B *et al.* Androgen receptor and androgen-  
29 340 dependent gene expression in lung. *Mol Cell Endocrinol* 2010; **317**(1-2): 14-24.
- 31 341  
32 342 18. Hamilton P, Andrew GM. Influence of growth and athletic training on heart and  
33 343 lung functions. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1976; **36**(1): 27-38.
- 35 344  
36 345 19. Tanner JM. Growth at adolescence. Londres: Oxford Blackell. In:  
37 346 , 1962.
- 39 347  
40 348 20. Duke PM, Litt IF, Gross RT. Adolescents' self-assessment of sexual maturation.  
41 349 *Pediatrics* 1980; **66**(6): 918-20.
- 43 350  
44 351 21. Morris NMaJRU. Validation of a self-administered instrument to asses stage of  
45 352 adolescent development. *J Youth Adolesc* 1980; **9**: 271-280.
- 47 353  
48 354 22. Perez-Gomez J, Rodriguez GV, Ara I *et al.* Role of muscle mass on sprint  
49 355 performance: gender differences? *Eur J Appl Physiol* 2008; **102**(6): 685-94.
- 51 356  
52 357 23. Calbet JA, Moysi JS, Dorado C *et al.* Bone mineral content and density in  
53 358 professional tennis players. *Calcif Tissue Int* 1998; **62**(6): 491-6.
- 55 359  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3 360 24. Medbo JJ, Tabata I. Anaerobic energy release in working muscle during 30 s to  
4 361 3 min of exhausting bicycling. *J Appl Physiol (1985)* 1993; **75**(4): 1654-60.  
5  
6 362  
7 363 25. Ara I, Vicente-Rodriguez G, Jimenez-Ramirez J *et al.* Regular participation in  
8 364 sports is associated with enhanced physical fitness and lower fat mass in  
9 365 prepubertal boys. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; **28**(12): 1585-93.  
10  
11 366  
12 367 26. Rodriguez G, Bilbao C, Ramirez R *et al.* Alleles with short CAG and GGN  
13 368 repeats in the androgen receptor gene are associated with benign endometrial  
14 369 cancer. *Int J Cancer* 2006; **118**(6): 1420-5.  
15  
16 370  
17 371 27. De Naeyer H, Bogaert V, De Spaey A *et al.* Genetic variations in the androgen  
18 372 receptor are associated with steroid concentrations and anthropometrics but not  
19 373 with muscle mass in healthy young men. *PLoS One* 2014; **9**(1): e86235.  
20  
21 374  
22 375 28. Green HJ, Fraser IG, Ranney DA. Male and female differences in enzyme  
23 376 activities of energy metabolism in vastus lateralis muscle. *J Neurol Sci* 1984;  
24 377 **65**(3): 323-31.  
25  
26 378  
27 379 29. Jaworowski A, Porter MM, Holmback AM *et al.* Enzyme activities in the tibialis  
28 380 anterior muscle of young moderately active men and women: relationship with  
29 381 body composition, muscle cross-sectional area and fibre type composition. *Acta*  
30 382 *Physiol Scand* 2002; **176**(3): 215-25.  
31  
32 383  
33 384 30. Komi PV, Karlsson J. Skeletal muscle fibre types, enzyme activities and  
34 385 physical performance in young males and females. *Acta Physiol Scand* 1978;  
35 386 **103**(2): 210-8.  
36  
37 387  
38 388 31. Guadalupe-Grau A, Perez-Gomez J, Olmedillas H *et al.* Strength training  
39 389 combined with plyometric jumps in adults: sex differences in fat-bone axis  
40 390 adaptations. *J Appl Physiol (1985)* 2009; **106**(4): 1100-11.  
41  
42 391  
43 392 32. Steffensen CH, Roepstorff C, Madsen M *et al.* Myocellular triacylglycerol  
44 393 breakdown in females but not in males during exercise. *Am J Physiol Endocrinol*  
45 394 *Metab* 2002; **282**(3): E634-42.  
46  
47 395  
48 396 33. Voorhoeve PG, van Mechelen W, Uitterlinden AG *et al.* Androgen receptor  
49 397 gene CAG repeat polymorphism in longitudinal height and body composition in  
50 398 children and adolescents. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2011; **74**(6): 732-5.  
51  
52 399  
53 400 34. Ponce-Gonzalez JG, Guadalupe-Grau A, Rodriguez-Gonzalez FG *et al.*  
54 401 Androgen receptor gene polymorphisms and the fat-bone axis in young men and  
55 402 women. *J Androl* 2012; **33**(4): 644-50.  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3 403  
4 404 35. Saltin B, Strange S. Maximal oxygen uptake: "old" and "new" arguments for a  
5 405 cardiovascular limitation. *Med Sci Sports Exerc* 1992; **24**(1): 30-7.  
6  
7 406  
8 407 36. Saltin B, Calbet JA. Point: in health and in a normoxic environment, VO<sub>2</sub> max  
9 408 is limited primarily by cardiac output and locomotor muscle blood flow. *J Appl*  
10 409 *Physiol (1985)* 2006; **100**(2): 744-5.  
11  
12 410  
13 411 37. Li J, Glessner JT, Zhang H *et al.* GWAS of blood cell traits identifies novel  
14 412 associated loci and epistatic interactions in Caucasian and African-American  
15 413 children. *Hum Mol Genet* 2013; **22**(7): 1457-64.  
16  
17 414  
18 415 38. van der Harst P, Zhang W, Mateo Leach I *et al.* Seventy-five genetic loci  
19 416 influencing the human red blood cell. *Nature* 2012; **492**(7429): 369-75.  
20  
21 417  
22 418 39. Bell JR, Bernasochi GB, Varma U *et al.* Sex and sex hormones in cardiac stress-  
23 419 -mechanistic insights. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2013; **137**: 124-35.  
24  
25 420  
26 421 40. Marsh JD, Lehmann MH, Ritchie RH *et al.* Androgen receptors mediate  
27 422 hypertrophy in cardiac myocytes. *Circulation* 1998; **98**(3): 256-61.  
28  
29 423  
30 424 41. Basualto-Alarcon C, Jorquera G, Altamirano F *et al.* Testosterone signals  
31 425 through mTOR and androgen receptor to induce muscle hypertrophy. *Med Sci*  
32 426 *Sports Exerc* 2013; **45**(9): 1712-20.  
33  
34 427  
35 428 42. Staron RS, Hagerman FC, Hikida RS *et al.* Fiber type composition of the vastus  
36 429 lateralis muscle of young men and women. *J Histochem Cytochem* 2000; **48**(5):  
37 430 623-9.  
38  
39 431  
40 432 43. Jiang LQ, Garcia-Roves PM, de Castro Barbosa T *et al.* Constitutively active  
41 433 calcineurin in skeletal muscle increases endurance performance and  
42 434 mitochondrial respiratory capacity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;  
43 435 **298**(1): E8-E16.  
44  
45 436  
46 437 44. Shortreed KE, Krause MP, Huang JH *et al.* Muscle-specific adaptations,  
47 438 impaired oxidative capacity and maintenance of contractile function characterize  
48 439 diet-induced obese mouse skeletal muscle. *PLoS One* 2009; **4**(10): e7293.  
49  
50 440  
51 441 45. Calbet JA, Holmberg HC, Rosdahl H *et al.* Why do arms extract less oxygen  
52 442 than legs during exercise? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;  
53 443 **289**(5): R1448-58.  
54  
55 444  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

445 46. Lexell J, Sjostrom M, Nordlund AS *et al.* Growth and development of human  
446 muscle: a quantitative morphological study of whole vastus lateralis from  
447 childhood to adult age. *Muscle Nerve* 1992; **15**(3): 404-9.  
448  
449  
450

Confidential: For Review Only

451 **Table legends**

452

453 **Table 1.** Body composition, anthropometrics, physical activity and fitness in boys and  
454 girls (mean  $\pm$  standard deviation). Ht: height; SJJH: jumping height in squat jumps;  
455 SJWmax: maximal power in squat jumps; CMJJH: jumping height in countermovement  
456 jumps; CMJWmax: maximal power in countermovement jump; T30m and T300m  
457 running time in the 30 and 300 m running sprint, respectively.

458 **Table 2.** Body composition, anthropometrics, physical activity and fitness in boys and  
459 girls with CAGs and CAG<sub>L</sub> androgen receptor polymorphisms (mean  $\pm$  standard  
460 deviation). Ht: height; SJJH: jumping height in squat jumps; SJWmax: maximal power  
461 in squat jumps; CMJJH: jumping height in countermovement jumps; CMJWmax:  
462 maximal power in countermovement jump; T30m and T300m running time in the 30  
463 and 300 m running sprint, respectively. Subjects were grouped as CAG short (CAG<sub>s</sub>) if  
464 harboring repeat lengths of  $\leq 21$  and CAG long (CAG<sub>L</sub>) if harboring repeat lengths of  
465  $> 21$ . \*P<0.05 vs CAG<sub>L</sub>.

466 **Table 3.** Body composition, anthropometrics, physical activity and fitness in boys and  
467 girls with GGN<sub>s</sub> and GGN<sub>L</sub> androgen receptor polymorphisms (mean  $\pm$  standard  
468 deviation). Ht: height; SJJH: jumping height in squat jumps; SJWmax: maximal power  
469 in squat jumps; CMJJH: jumping height in countermovement jumps; CMJWmax:  
470 maximal power in countermovement jump; T30m and T300m running time in the 30  
471 and 300 m running sprint, respectively. Subjects were grouped as GGN short (GGN<sub>s</sub>) if  
472 harboring repeat lengths of  $\leq 23$  and CAG long (GGN<sub>L</sub>) if harboring repeat lengths of  
473  $> 23$ . \*P<0.05 vs GGN<sub>L</sub>.

**Table 1.** Body composition, anthropometrics, physical activity and fitness in boys and girls (mean  $\pm$  standard deviation).

	boys	n	girls	n
Age	11.5 $\pm$ 2.6	152	10.1 $\pm$ 3.2	116
Height (cm)	147.9 $\pm$ 14.8	152	138.4 $\pm$ 15.9	116
Body mass (kg)	41.7 $\pm$ 13.1	152	36.4 $\pm$ 12.6	116
Percentage of body fat (%)	21.1 $\pm$ 8.7	152	27.2 $\pm$ 8.5	116
Lean body mass (kg)	30.6 $\pm$ 9.9	152	24.4 $\pm$ 7.8	116
Lean mass arms (kg)	2.9 $\pm$ 1.1	152	2.1 $\pm$ 0.7	116
Lean mass legs (kg)	10.1 $\pm$ 3.8	152	7.5 $\pm$ 2.8	116
Lean mass extremities (kg)	13.0 $\pm$ 4.9	152	9.6 $\pm$ 3.5	116
Lean mass arms/Ht <sup>2</sup> (kg.m <sup>-2</sup> )	1.3 $\pm$ 0.2	152	1.1 $\pm$ 0.2	116
Lean mass legs/Ht <sup>2</sup> (kg.m <sup>-2</sup> )	4.5 $\pm$ 0.8	152	3.8 $\pm$ 0.6	116
Lean mass extremities/Ht <sup>2</sup> (kg.m <sup>-2</sup> )	5.7 $\pm$ 1.0	152	4.8 $\pm$ 0.8	116
Tanner G	2.5 $\pm$ 1.2	152	2.0 $\pm$ 1.2	116
Tanner H	2.6 $\pm$ 1.2	152	2.2 $\pm$ 1.4	116
<b>Jumping tests</b>				
SJH (m)	0.19 $\pm$ 0.06	134	0.16 $\pm$ 0.06	79
CMJH (m)	0.23 $\pm$ 0.08	133	0.17 $\pm$ 0.06	77
SJWmax(W)	1429.7 $\pm$ 657.9	133	1308.6 $\pm$ 559.4	44
CMJWmax(W)	1539.8 $\pm$ 690.5	132	1473.1 $\pm$ 586.2	43
<b>Running tests</b>				
T30m (s)	5.5 $\pm$ 0.5	133	6.4 $\pm$ 1.1	103
T300m (s)	72.0 $\pm$ 12.6	114	85.2 $\pm$ 17.8	99
<b>Maximal aerobic power</b>				
VO <sub>2</sub> max (ml.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	47.7 $\pm$ 4.7	130	47.2 $\pm$ 5.6	102

Ht: height; SJH: jumping height in squat jumps; SJWmax: maximal power in squat jumps; CMJH: jumping height in countermovement jumps; CMJWmax: maximal power in countermovement jump; T<sub>30m</sub> and T<sub>300m</sub> running time in the 30 and 300 m running sprint, respectively.

474

475

476

477

478

479



**Table 2.** Body composition, anthropometrics, physical activity and fitness in boys and girls with CAGs and CAGL androgen receptor polymorphisms (mean  $\pm$  standard deviation).

	CAGs boys		CAGL boys		CAGs girls		CAGL girls	
	mean	n	mean	n	mean	n	mean	n
Age	11.3	90	11.7	62	10.1	51	10.2	65
Height (cm)	146.1	90	150.5	62	138.2	51	138.6	65
Body mass (kg)	39.9	90	44.2	62	36.3	51	36.5	65
Percentage of body fat (%)	20.9	90	21.3	62	27.0	51	27.3	65
Lean body mass (kg)	29.5	90	32.3	62	24.3	51	24.4	65
Lean mass arms (kg)	2.8	90	3.1	62	2.1	51	2.1	65
Lean mass legs (kg)	9.6	90	10.8	62	7.5	51	7.5	65
Lean mass extremities (kg)	12.5	90	13.9	62	9.6	51	9.6	65
Lean mass arms/Ht <sup>2</sup> (kg.m <sup>-2</sup> )	1.3	90	1.3	62	1.1	51	1.1	65
Lean mass legs/Ht <sup>2</sup> (kg.m <sup>-2</sup> )	4.4	90	4.6	62	3.8	51	3.8	65
Lean mass extremities/Ht <sup>2</sup> (kg.m <sup>-2</sup> )	5.6	90	5.9	62	4.9	51	4.8	65
Tanner G	2.5	90	2.5	62	2.0	51	2.0	65
Tanner H	2.6	90	2.6	62	2.2	51	2.2	65
<b>Jumping tests</b>								
SJH (m)	0.19	77	0.19	57	0.16	28	0.16	51
SJWmax (w)	1376.0	77	1503.5	56	1326.2	19	1295.2	25
CMJH (m)	0.23	76	0.22	57	0.19	28	0.16	49
CMJWmax (w)	1473.4	76	1629.8	56	1515.3	19	1439.8	24
<b>Running tests</b>								
T30m (s)	5.6	82	5.5	51	6.4	44	6.4	59
T300m (s)	70.3*	68	74.4	46	84.6	41	85.7	58
<b>Maximal aerobic power</b>								
VO <sub>2</sub> max (ml.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	47.6	78	47.8	52	47.2	43	47.1	59

Ht: height; SJH: jumping height in squat jumps; SJWmax: maximal power in squat jumps; CMJH: jumping height in countermovement jumps; CMJWmax: maximal power in countermovement jumps; T<sub>30m</sub> and T<sub>300m</sub> running time in the 30 and 300 m running sprint, respectively. \* P<0.05 vs CAGL.

480  
481  
482

483

Table 3. Body composition, anthropometrics, physical activity and fitness in boys and girls with GGNs and GGNL androgen receptor polymorphisms (mean  $\pm$  standard deviation).

	GGNs boys		GGNL boys		GGNs girls		GGNL girls		n
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	
Age	11.3	± 2.4	11.8	± 2.8	10.7	± 3.3	9.7	± 3.0	66
Height (cm)	147.6	± 14.9	148.4	± 14.7	142.1	± 16.6	135.7	± 14.9	66
Body mass (kg)	41.1	± 12.5	42.6	± 14.2	39.5	± 13.7	34.0	± 11.3	66
Percentage of body fat (%)	21.0	± 8.6	21.1	± 8.9	28.1	± 8.8	26.5	± 8.4	66
Lean body mass (kg)	30.2	± 9.3	31.3	± 10.7	26.2	± 8.4	23.0	± 7.0	66
Lean mass arms (kg)	2.9	± 1.0	3.0	± 1.2	2.2	± 0.8	2.0	± 0.6	66
Lean mass legs (kg)	9.9	± 3.6	10.4	± 4.1	8.2	± 3.0	7.0	± 2.5	66
Lean mass extremities (kg)	12.8	± 4.6	13.4	± 5.2	10.4	± 3.8	9.0	± 3.2	66
Lean mass arms/Ht <sup>2</sup> (kg.m <sup>-2</sup> )	1.3	± 0.2	1.3	± 0.3	1.1	± 0.2	1.1	± 0.2	66
Lean mass legs/Ht <sup>2</sup> (kg.m <sup>-2</sup> )	4.4	± 0.7	4.5	± 0.9	3.9	± 0.7	3.7	± 0.6	66
Lean mass extremities/Ht <sup>2</sup> (kg.m <sup>-2</sup> )	5.7	± 0.9	5.9	± 1.1	5.0	± 0.8	4.7	± 0.7	66
Tanner G	2.5	± 1.2	2.6	± 1.2	2.3	± 1.3	1.8	± 1.2	66
Tanner H	2.5	± 1.2	2.7	± 1.2	2.5	± 1.4	1.9	± 1.3	66
<b>Jumping tests</b>									
SJJH (m)	0.19	± 0.06	0.20	± 0.07	0.16	± 0.06	0.16	± 0.05	35
SJWmax (w)	1380.4	± 602.8	1511.5	± 739.6	1361.0	± 599.7	1232.8	± 502.5	18
CMJJH (m)	0.23	± 0.09	0.23	± 0.07	0.17	± 0.06	0.17	± 0.06	35
CMJWmax (w)	1488.3	± 628.8	1624.2	± 780.6	1468.8	± 591.2	1479.2	± 596.4	18
<b>Running tests</b>									
T30m (s)	5.6	± 0.5	5.5	± 0.6	6.3	± 1.1	6.4	± 1.2	56
T300m (s)	72.1	± 12.8	71.8	± 12.4	84.9	± 18.3	85.6	± 17.5	54
<b>Maximal aerobic power</b>									
VO <sub>2</sub> max (ml.kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	47.6	± 4.5	47.9	± 5.0	45.4*	± 4.4	48.6	± 6.0	56

## **ESTUDIO II**

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of Adolescent Health  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Androgen receptor CAG and GGN repeat polymorphisms and bone mass in boys and girls.

Article Type: Original Article

Keywords: Bone mass; gene; androgen receptor polymorphisms; prepubertal growth.

Corresponding Author: Dr. Amelia Guadalupe Grau, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: University of Las Palmas de Gran Canaria

First Author: Lorena Rodriguez-García

Order of Authors: Lorena Rodriguez-García; Jesús G. Ponce-González, PhD; Juan G. Gonzalez-Henriquez, PhD; Francisco G. Rodriguez-Gonzalez, PhD; Bonifacio Nicolás Díaz-Chico, Department of Biochemistry and Physiology, Univers; Jose A.L. Calbet, Prof; Jose A. Serrano-Sánchez, PhD; Cecilia Dorado, Prof; Amelia Guadalupe Grau, Ph.D.

Manuscript Region of Origin: SPAIN

**Abstract:** Purpose. The human androgen receptor (AR) gene possesses two trinucleotide polymorphic repeats, (CAG and GGN) that affects the amount of AR protein translated. In this study, we genotyped these polymorphic tracts in a representative sample of Caucasian children (Tanner  $\leq$  5), 152 boys (11.5  $\pm$  2.6 yrs) and 116 girls (10.1  $\pm$  3.2 yrs) from Spain and investigated their association with bone mass. Methods. The length of CAG and GGN repeats was determined by PCR and fragment analysis. Body composition was assessed by dual energy x-ray absorptiometry (DXA). Individuals were grouped as CAG short (CAGS) if harboring repeat lengths of  $\leq$ 21 and CAG long (CAGL) if CAG  $>$ 21. Moreover, subjects were grouped as GGN short (GGNS) if harboring repeat lengths of  $\leq$ 23 and GGN long (GGNL) if GGN  $>$ 23. Results. In boys, significant differences in height, body mass, whole body bone mineral density (BMD) and content (BMC), upper extremities BMC, lower extremities BMC, femoral neck BMD, Ward's triangle BMC and BMD and lumbar spine BMD were observed between CAGS and CAGL groups ( $P < 0.05$ ). Thus, upper extremities BMD differed between GGNS and GGNL groups. After adjusting for confounding variables, only upper extremities BMD between GGNS and GGNL groups remained significant ( $P < 0.05$ ). No differences were observed in girls in any measured site in relation to either CAG or GGN polymorphisms length. Conclusions. Our results support the hypothesis that longer alleles of the AR CAG and GGN polymorphisms are associated with increased bone mass in prepubertal boys.

Suggested Reviewers: German Vicente Rodriguez PhD

University of Zaragoza

gervicen@unizar.es

German has developed substantial scientific research regarding bone mass acquisition during growth

Nuria Garatachea PhD

University of Zaragoza

nuria.garatachea@unizar.es

Nuria profoundly knows polymorphisms related to bone mass and exercise performance.

PG Voorhoeve MD

Canisius-Wilhelmina Hospital, Nijmegen, the Netherlands

p.voorhoeve@cwz.nl

His paper:

Androgen receptor gene CAG repeat polymorphism in longitudinal height and body composition in children and adolescents. Clin Endocrinol (Oxf) 2011;74:732-735.

Opposed Reviewers:

## **Androgen receptor CAG and GGN repeat polymorphisms and bone mass in boys and girls.**

Lorena Rodríguez-García<sup>1-2</sup>, Jesus G. Ponce-Gonzalez<sup>1-2</sup>, Juan J González-Henriquez<sup>2-3</sup>, Francisco G. Rodríguez-Gonzalez<sup>4-5</sup>, Bonifacio N Díaz-Chico<sup>4-5</sup>, Jose A L Calbet<sup>1-2</sup>, José A Serrano-Sanchez<sup>1-2</sup>, Cecilia Dorado<sup>1-2</sup>, Amelia Guadalupe-Grau<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Department of Physical Education, University of Las Palmas de Gran Canaria, Campus Universitario de Tafira s/n, Las Palmas de Gran Canaria, 35017, Spain

<sup>2</sup> Research Institute of Biomedical and Health Sciences, University of Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, Spain

<sup>3</sup> Department of Mathematics, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Spain

<sup>4</sup> Department of Biochemistry and Physiology, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Spain

<sup>5</sup> Canary Islands Cancer Research Institute (ICIC), Las Palmas de Gran Canaria, Canary Islands, Spain

**Running title:** “Androgen receptor and bone mass in children”

**Conflicts of interest:** None.

**Keywords:** AR CAG polymorphisms, AR GGN polymorphisms, children, bone mass.

Correspondence to:

Amelia Guadalupe-Grau, PhD.

Department of Physical Education,

Faculty of Sport Sciences, University of Las Palmas de Gran Canaria, Spain.

Address: Campus Universitario de Tafira s/n, Las Palmas de Gran Canaria, 35017, Spain

Phone: 0034--911349218

e-mail: [amelia.guadalupe@gmail.com](mailto:amelia.guadalupe@gmail.com)

## **Acknowledgments**

The authors thank José Navarro de Turo for his excellent technical assistance. This study was supported by Ministerio de Educación y Ciencia (DEP2006-56076-C06-04/ACTI) and FEDER, Gobierno de Canarias (PI2005/177), Proyecto Interreg IIB BIOPOLIS, Fundación del Instituto Canario de Investigación del Cáncer (FICIC), Cabildo de Gran Canaria, Cabildo de Tenerife and La Caja de Canarias, and Proyecto Estructurante “Integración de los grupos de investigación en Ciencias de la Salud”, ULPGC, Gobierno de Canarias. None of the authors has conflicts of interest. All financial sources have been reported.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Abstract

**Purpose.** The human androgen receptor (AR) gene possesses two trinucleotide polymorphic repeats, (CAG and GGN) that affects the amount of AR protein translated. In this study, we genotyped these polymorphic tracts in a representative sample of Caucasian children (Tanner  $\leq 5$ ), 152 boys ( $11.5 \pm 2.6$  yrs) and 116 girls ( $10.1 \pm 3.2$  yrs) from Spain and investigated their association with bone mass. **Methods.** The length of CAG and GGN repeats was determined by PCR and fragment analysis. Body composition was assessed by dual energy x-ray absorptiometry (DXA). Individuals were grouped as CAG short (CAG<sub>S</sub>) if harboring repeat lengths of  $\leq 21$  and CAG long (CAG<sub>L</sub>) if CAG  $> 21$ . Moreover, subjects were grouped as GGN short (GGN<sub>S</sub>) if harboring repeat lengths of  $\leq 23$  and GGN long (GGN<sub>L</sub>) if GGN  $> 23$ . **Results.** In boys, significant differences in height, body mass, whole body bone mineral density (BMD) and content (BMC), upper extremities BMC, lower extremities BMC, femoral neck BMD, Ward's triangle BMC and BMD and lumbar spine BMD were observed between CAG<sub>S</sub> and CAG<sub>L</sub> groups ( $P < 0.05$ ). Thus, upper extremities BMD differed between GGN<sub>S</sub> and GGN<sub>L</sub> groups. After adjusting for confounding variables, only upper extremities BMD between GGN<sub>S</sub> and GGN<sub>L</sub> groups remained significant ( $P < 0.05$ ). No differences were observed in girls in any measured site in relation to either CAG or GGN polymorphisms length. **Conclusions.** Our results support the hypothesis that longer alleles of the AR CAG and GGN polymorphisms are associated with increased bone mass in prepubertal boys.

**Keywords:** Bone mass, gene, androgen receptor polymorphisms, prepubertal growth.



## Introduction

About 60-80% of peak bone mass variability is determined by hereditary factors; although there are other important elements like diet and hormonal status that could also affect on the optimal bone mass acquisition during childhood and adolescence (1). Bone strain elicited by physical activity promotes bone mineralization and facilitates bone mass accrual during growth (2). The osteogenic effect of physical activity is particularly effective when exercise is started before puberty in both girls and boys (3-5). Longitudinal studies evaluating changes in bone mass during growth, have shown that the greatest increases in bone mass occurs at ages of 12-15 years in girls compared to 14-17 years in boys (6), i.e., during the transition from adolescence to adulthood. Bone mass acquisition before or at the first stages of the pubertal phase likely depends on the ability to transcribe anabolic hormonal signals into discrete bone formation, particularly because systemic anabolic hormones (i.e. free and total testosterone or estradiol) are almost inexistent (7, 8). Although estradiol is required for the attainment of maximal peak bone mass in both sexes, testosterone has an additional action through the stimulation periosteal apposition promoting periosteal expansion (7). Therefore, those children able to generate a greater androgenic response would, in theory, benefit from a greater bone formation.

Androgenic activity in bone is mediated by the androgen receptors (ARs), a type of nuclear receptor present in osteoblasts and activated by transmembrane binding to androgenic hormones such as testosterone or dihydrotestosterone (9). The AR gene has two polymorphic motives due to polyglutamine (CAG, encoded), polyglycine (GGN) tracts, whose repetition length is negatively associated to its transcriptional activity (10, 11). Consequently, a greater androgenic effect is expected for AR with lower CAG and GGN repeat number. In agreement, a lower number of CAG repetitions have been linked to greater fat-free mass in healthy elders (12) as well as benign prostatic hypertrophy, prostate cancer, male infertility (13-15) and higher systemic concentrations of total and free testosterone (16). The effect of ARs polymorphisms on bone mass has also been studied by our laboratory in a group of 282 healthy men, where we found a higher femoral neck BMD in those subjects carrying a CAG<sub>S</sub> + GGN<sub>S</sub> haplotypes (17).

1  
2  
3  
4 Much less investigated is the effect of harboring a short or long CAG or GGN  
5 repeat polymorphism on bone mass formation during growth. In this line, Voorhoeve et al.  
6 have shown that height-standard deviation scores were inversely associated with AR CAG  
7 repeat length in boys at young prepubertal and early pubertal age (18).  
8  
9

10  
11  
12 Therefore, the aim of this study was to determine whether the CAG and GGN  
13 androgen receptor repeat polymorphisms are associated with bone mass in prepubertal boys  
14 and girls. Our hypothesis is that a short CAG or GGN repeat polymorphisms of the gene  
15 encoding the androgen receptor is associated with greater bone mass in children.  
16  
17  
18

## 19 **Methods**

20  
21  
22  
23 Caucasians physically active boys (152) and girls (116), aged between 7 and 13 years  
24 (Tanner stage <5), were recruited from sports clubs in Gran Canaria (Spain). Children  
25 having any chronic illness or taking medications were excluded. The study was performed  
26 in accordance with the 1975 Helsinki Declaration and was approved by the Ethical  
27 Committee of the University of Las Palmas de Gran Canaria. Parents and children provided  
28 written consent after receiving a full explanation on the benefits and risk before the start of  
29 the studies. Tanner pubertal stage (19) was self-assessed by the children (20), a procedure  
30 of recognized reproducibility ( $r = 0.97$ ) (21).  
31  
32  
33

## 34 **Body composition**

35  
36  
37  
38 Whole body composition was determined by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA;  
39 QDR-1500, Hologic Corp., Software version 7.10, Waltham, Massachusetts, USA) as  
40 reported in Perez-Gomez et al. [(22)]. Calculations related to upper and lower limb lean  
41 mass was conducted by regional analysis of the whole body scan (23, 24).  
42  
43  
44

## 45 **CAG and GGN repeat polymorphisms**

46  
47  
48  
49 DNA was extracted from saliva samples (200  $\mu$ l) using High Pure PCR Template  
50 Preparation Kits (Roche Applied Science). To determine the length of the CAG and GGN  
51 repeats the corresponding regions located on the exon 1 of the AR gene (Genbank  
52 accession no. M27423) were amplified using two pairs of primers whose sequences have  
53 been previously reported (25). One primer from each pair was marked with fluorescent dye  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4 (FAM or VIC). Amplification was performed in a 25 µl reaction volume, containing 50 ng  
5 of genomic DNA, 200 µM of each deoxynucleotide triphosphate, 1x Fast Start Taq DNA  
6 polymerase Buffer (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), 1x GC-rich solution  
7 buffer (Roche Applied Science) and 1U of Fast Start Taq DNA polymerase (Roche Applied  
8 Science). The concentration of each pair of primers was 1.2 and 1.5 µM for the  
9 amplification of the CAG and GGN repeats, respectively. PCR conditions were: 30 cycles  
10 of 95°C for 45 sec, 56°C for 30 sec and 72°C for 30 sec for CAG amplification; 30 cycles of  
11 95°C for 1 min, 55°C for 2 min and 72°C for 2 min for GGN amplification. Each PCR was  
12 initiated with a denaturation step at 95°C for 5 min and terminated with an extension step at  
13 72°C for 5 min. The PCR product was diluted 1:100 in distilled water and 1 µl of the  
14 dilution was mixed with 10µl of formamide and 0.3 µl of GeneScan 500 LIZ Size Standard  
15 (Applied Biosystems, Warrington, UK), denatured at 98°C for 5 min and cooled on ice.  
16 Fragment separation was performed by automated capillary electrophoresis, using an ABI  
17 Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) and the length was determined with  
18 Gene Scan Analysis Software (version 3.7) (Applied Biosystems). Internal standards  
19 supplied by the manufacturer were used for quality control. We blindly repeated the  
20 genotype analysis in 54 of the samples, and the results were completely coincident. The  
21 fragments size was confirmed by sequencing 48 DNA samples harboring different size  
22 alleles for both repeats by using the Big Dye Terminator Sequencing Kit (Applied  
23 Biosystem) at University of Las Palmas Sequencing Facility with excellent agreement  
24 between both procedures. Genotyping was performed specifically for research purposes  
25 based on the hypothesis that the aforementioned polymorphisms may influence VO<sub>2</sub> max,  
26 lean mass and muscle strength. The researchers in charge of genotyping were totally  
27 blinded to the subjects' identities, that is, blood samples were tracked solely with code  
28 numbers, and personal identities were only made available to the main study researcher  
29 who was not involved in actual genotyping.  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51

## 52 **Statistical analysis**

53  
54  
55 Descriptive statistics are presented as the mean values and standard deviation (SD). The  
56 homogeneity of variances was established by the Levene test. A logarithmic transformation  
57 was performed for variables that were not normally distributed. Since both CAG and GGN  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4 repeats were not normally distributed, the Spearman correlation coefficient ( $\rho$ ) was used  
5  
6 to test the strength of the association between the number of these repeats and diverse  
7  
8 continuous variables. Differences between data subsets were analyzed using either analysis  
9  
10 of variance or analysis of covariance, both with the Bonferroni post hoc test.

11  
12 The influence of the length polymorphism repeats  $CAG_n$  and  $GGN_n$  on body  
13  
14 composition and fitness variables was determined by taking the polymorphisms as  
15  
16 continuous variables or dichotomous by allelic limits. The mean value showed the best  
17  
18 balance between groups of children was used as the cutoff, therefore, subjects who had a  
19  
20 number of repetitions  $\leq 21$  were classified as short CAG ( $CAG_S$ ) and those subjects who  
21  
22 showed a number of repeats  $> 21$  were classified as long CAG ( $CAG_L$ ). In the case of  
23  
24 GGN, subjects carrying a number of repetitions  $\leq 23$  were classified as short GGN ( $GGN_S$ ),  
25  
26 and those showing a number of repetitions  $> 23$  were considered as long GGN ( $GGN_L$ ).  
27  
28 Statistical analysis was performed with SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Significant  
29  
30 differences were assumed at  $P < 0.05$ .

## 31 **Results**

32  
33  
34 There were 16 different CAG alleles (ranging from 13 to 33 repeats) and 12 GGN alleles,  
35  
36 ranging from 14 to 30 repeats in boys. In the girls there were 11 different CAG alleles  
37  
38 (ranging from 14 to 25) and 9 GGN alleles, ranging from 13 to 24 repeats. Boys and girls  
39  
40 body composition, anthropometrics, total and regional bone mass are reported in table 1. In  
41  
42 general, boys were taller, heavier and had higher whole body BMD and BMC than girls  
43  
44 ( $P < 0.05$ , table 1).

### 45 *CAG repeat polymorphism*

46  
47  
48 Anthropometrics, maturational stage, total and regional bone mass in the  $CAG_S$  and  $CAG_L$   
49  
50 groups are reported in table 2 for boys and girls respectively.  $CAG_L$  boys showed greater  
51  
52 height, body mass, whole body bone mineral density (BMD) and content (BMC), upper  
53  
54 extremities BMC, lower extremities BMC, femoral neck BMD, Ward's triangle BMC,  
55  
56 Ward's triangle BMD and lumbar spine BMD than  $CAG_S$  boys ( $P < 0.05$ , table 2). No  
57  
58 intergroup ( $CAG_S$  vs  $CAG_L$ ) differences were observed in girls (Table 2). After adjusting  
59  
60 for confounding variables (age, height, weight, fat percentage, Tanner H, Tanner G), no  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4 differences were observed in any measured site in relation to CAG<sub>S</sub> and CAG<sub>L</sub>  
5 classification.  
6

### 7 8 *GGN repeat polymorphism* 9

10 Anthropometrics, total and regional bone mass in the GGN<sub>S</sub> and GGN<sub>L</sub> groups are reported  
11 in table 3 for boys and girls respectively. The boys with the polymorphism GGN<sub>L</sub> had  
12 higher BMD in the upper extremities than those with a GGNS (P<0.05, table 3). This  
13 difference remained significant after adjusting for confounding variables (age, height,  
14 weight, fat percentage, Tanner H, Tanner G) (P<0.05). Girls classified in either GGN<sub>S</sub> or  
15 GGN<sub>L</sub> groups did not show any difference in any of the measured sites.  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22

### 23 **Correlations** 24

25 Adjusted Spearman correlations showed a positive association between CAG repeat  
26 number and lower extremities BMD and Ward's triangle BMC in boys (r=0.16 and 0.14  
27 respectively, P<0.05), and a negative association between Ward's triangle BMC, BMD and  
28 GGN repeat length in boys ( r=-0.18 and 0.17 respectively, P<0.05).  
29  
30  
31  
32  
33

### 34 **Discussion** 35

36 In contrast to our hypothesis, the main result of this study shows that boys classified as  
37 GGN long, after adjusting for potential confounders as height, weight and pubertal status,  
38 show higher bone mass in the upper extremities than those harboring the shorter GGN  
39 polymorphism. Moreover, neither CAG nor GGN polymorphism length seem to have an  
40 influence on bone mass and density in prepubertal girls.  
41  
42  
43  
44  
45  
46

47 Long CAG length has been associated with increased BMC and BMD (3, 8, 26). In  
48 this study, children with long CAG have, on average, higher values in the following  
49 variables: size, weight, bone mineral content of whole body, upper and lower extremities  
50 (and respectively) and Ward's triangle, as well as bone mineral density of total body, lower  
51 extremities, femoral neck, Ward's triangle and lumbar spine. In agreement, Lappalainen  
52 and collaborators reported a positive correlation between BMI and the number of CAG  
53 repeats (27), whereas another study performed in adolescent boys did not confirm such an  
54 association between body composition and CAG repeats (18). Previous work from our  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4 laboratory has shown that there is no relationship between physical fitness, muscle mass,  
5 levels of free testosterone, osteocalcin and the length of the CAG repeat number in a group  
6 of 282 healthy young men (17, 26). However, another study that investigated the  
7 relationship between the AR CAG repeat polymorphism and longitudinal growth from  
8 prepuberty until young adult age found that height-standard deviation scores were inversely  
9 associated with AR CAG repeat length in boys at young, prepubertal and early pubertal  
10 age. This association diminishes in the following years and completely disappears after the  
11 age of 16 years (18). In agreement, we did not find differences in height between CAG<sub>S</sub> and  
12 CAG<sub>L</sub> in our older children. Other studies indicate that age, physical activity, body  
13 composition, sex steroid levels and anthropometrics are determinants of muscle mass and  
14 function in young men, and although the number of CAG repeats of the AR are related to  
15 sex steroid levels and anthropometrics, there is no evidence that these variations in  
16 the AR gene also affect muscle mass or function (28).  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27

28  
29 The differences observed in the present investigation with previously published data  
30 could be explained by the children's degree of physical activity. Our participants were  
31 practicing physical activity at least three times a week for two or more years at schools or  
32 after-school sport clubs. Therefore, the potential added effect of harboring a short CAG  
33 polymorphism on bone mass may not be large enough to be detected because of the well-  
34 known effects of physical activity and sports participation on bone mass acquisition during  
35 growth (29). Additional studies are required to determine whether the CAG repeat  
36 polymorphism is associated with bone mass in sedentary children and how this  
37 polymorphism may modulate physical activity osteogenic effects.  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45

46 Alternatively it may be argued that in a normally functioning adult hypothalamic-  
47 pituitary-gonadal axis, a diminished testosterone feedback, in case of a long AR CAG  
48 repeat, is compensated for by increased androgen production, because of increased LH  
49 stimulation (12, 16, 30). It was suggested that several phenotypic effects are probably more  
50 attributable to oestrogen action than to androgen action, because of the increased effective  
51 bioactive oestrogen/androgen ratio in increasing AR CAG length (31). In prepubertal boys,  
52 the hypothalamic-pituitary-gonadal axis is not responding as in adulthood, because the  
53 axis is relatively silent and the gonads only produce minor amounts of androgens.  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4 Moreover, a very small amount of androgens is produced by the adrenals, which are not  
5 under control of the hypothalamic– pituitary–gonadal axis. One could argue that in these  
6 boys, the compensatory mechanism of increasing androgen production in increasing AR  
7 CAG repeat length is absent. Therefore, prepubertal boys with long AR CAG repeats are  
8 relatively androgen deficient in prepubertal compared with boys with short AR CAG  
9 repeat, leading to subtle differences in prepubertal growth as shown in our study.  
10  
11  
12  
13  
14

15  
16 Although the influence of AR GGN repeat polymorphisms on bone mass has not  
17 been studied in children, we have found a positive correlation between AR GGN repeat  
18 length, BMD at different skeletal regions and the bone formation marker osteocalcin in  
19 young men (26), and women (32). These studies support the abovementioned opportunity  
20 window for a prolonged bone grow span in those children with a relatively lower  
21 androgenic activity. However, more studies are needed in order to confirm this affirmation,  
22 especially in physically active and inactive children.  
23  
24  
25  
26  
27  
28

29  
30 In conclusion, our results support the hypothesis that the longer alleles of the AR  
31 CAG and GGN polymorphisms are associated with increased bone mass in prepubertal  
32 boys, whereas no apparent association is found in prepubertal girls.  
33  
34  
35

### 36 **Implications and Contribution**

37

38  
39 Our results support the hypothesis that longer alleles of the androgen receptor CAG and  
40 GGN polymorphisms are associated with increased bone mass in prepubertal boys, whereas  
41 no apparent association is found in prepubertal girls. The present investigation adds to the  
42 current knowledge about the genetic influence of bone mass development during growth.  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## References

- [1] Bachrach LK. Acquisition of optimal bone mass in childhood and adolescence. *Trends Endocrinol Metab* 2001;12:22-28.
- [2] Vicente-Rodriguez G. How does exercise affect bone development during growth? *Sports Med* 2006;36:561-569.
- [3] Kannus P, Haapasalo H, Sankelo M, et al. Effect of starting age of physical activity on bone mass in the dominant arm of tennis and squash players. *Ann Intern Med* 1995;123:27-31.
- [4] Sanchis-Moysi J, Dorado C, Olmedillas H, et al. Bone mass in prepubertal tennis players. *Int J Sports Med* 2010;31:416-420.
- [5] Vicente-Rodriguez G, Ara I, Perez-Gomez J, et al. High femoral bone mineral density accretion in prepubertal soccer players. *Med Sci Sports Exerc* 2004;36:1789-1795.
- [6] Davies JH, Evans BA, Gregory JW. Bone mass acquisition in healthy children. *Arch Dis Child* 2005;90:373-378.
- [7] Riggs BL, Khosla S, Melton LJ, 3rd. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev* 2002;23:279-302.
- [8] Simm PJ, Bajpai A, Russo VC, et al. Estrogens and growth. *Pediatr Endocrinol Rev* 2008;6:32-41.
- [9] Roy AK, Lavrovsky Y, Song CS, et al. Regulation of androgen action. *Vitamins and hormones* 1999;55:309-352.
- [10] Chamberlain NL, Driver ED, Miesfeld RL. The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic Acids Res* 1994;22:3181-3186.
- [11] Kazemi-Esfarjani P, Trifiro MA, Pinsky L. Evidence for a repressive function of the long polyglutamine tract in the human androgen receptor: possible pathogenetic relevance for the (CAG)<sub>n</sub>-expanded neuronopathies. *Human molecular genetics* 1995;4:523-527.
- [12] Walsh S, Zmuda JM, Cauley JA, et al. Androgen receptor CAG repeat polymorphism is associated with fat-free mass in men. *J Appl Physiol* 2005;98:132-137.
- [13] Giovannucci E, Stampfer MJ, Krithivas K, et al. The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:3320-3323.
- [14] Kukuvtitis A, Georgiou I, Bouba I, et al. Association of oestrogen receptor alpha polymorphisms and androgen receptor CAG trinucleotide repeats with male infertility: a study in 109 Greek infertile men. *Int J Androl* 2002;25:149-152.
- [15] Rodriguez-Gonzalez G, Cabrera S, Ramirez-Moreno R, et al. Short alleles of both GGN and CAG repeats at the exon-1 of the androgen receptor gene are associated to increased PSA staining and a higher Gleason score in human prostatic cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009;113:85-91.
- [16] Crabbe P, Bogaert V, De Bacquer D, et al. Part of the interindividual variation in serum testosterone levels in healthy men reflects differences in androgen sensitivity and feedback set point: contribution of the androgen receptor polyglutamine tract polymorphism. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:3604-3610.
- [17] Guadalupe-Grau A, Rodriguez-Gonzalez FG, Dorado C, et al. Androgen receptor gene polymorphisms lean mass and performance in young men. *Br J Sports Med* 2011;45:95-100.
- [18] Voorhoeve PG, van Mechelen W, Uitterlinden AG, et al. Androgen receptor gene CAG repeat polymorphism in longitudinal height and body composition in children and adolescents. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2011;74:732-735.
- [19] Tanner JM. *Growth at adolescence*. Londres: Oxford Blackell. , 1962.



- 1  
2  
3  
4 [20] Duke PM, Litt IF, Gross RT. Adolescents' self-assessment of sexual maturation. *Pediatrics*  
5 1980;66:918-920.  
6 [21] Morris NMajRU. Validation of a self-administered instrument to asses stage of adolescent  
7 development. *J Youth Adolesc* 1980;9:271-280.  
8 [22] Perez-Gomez J, Rodriguez GV, Ara I, et al. Role of muscle mass on sprint performance: gender  
9 differences? *Eur J Appl Physiol* 2008;102:685-694.  
10 [23] Heemers HV, Tindall DJ. Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions  
11 converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocr Rev* 2007;28:778-808.  
12 [24] Pandini G, Mineo R, Frasca F, et al. Androgens up-regulate the insulin-like growth factor-I  
13 receptor in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2005;65:1849-1857.  
14 [25] Rodriguez G, Bilbao C, Ramirez R, et al. Alleles with short CAG and GGN repeats in the  
15 androgen receptor gene are associated with benign endometrial cancer. *Int J Cancer*  
16 2006;118:1420-1425.  
17 [26] Guadalupe-Grau A, Rodriguez-Gonzalez FG, Ponce-Gonzalez JG, et al. Bone mass and the CAG  
18 and GGN androgen receptor polymorphisms in young men. *PLoS ONE* 2010;5:e11529.  
19 [27] Lappalainen S, Utriainen P, Kuulasmaa T, et al. Androgen receptor gene CAG repeat  
20 polymorphism and X-chromosome inactivation in children with premature adrenarche. *J Clin*  
21 *Endocrinol Metab* 2008;93:1304-1309.  
22 [28] De Naeyer H, Bogaert V, De Spaey A, et al. Genetic variations in the androgen receptor are  
23 associated with steroid concentrations and anthropometrics but not with muscle mass in healthy  
24 young men. *PLoS One* 2014;9:e86235.  
25 [29] Vicente-Rodriguez G, Ara I, Perez-Gomez J, et al. Muscular development and physical activity  
26 as major determinants of femoral bone mass acquisition during growth. *Br J Sports Med*  
27 2005;39:611-616.  
28 [30] Krithivas K, Yurgalevitch SM, Mohr BA, et al. Evidence that the CAG repeat in the androgen  
29 receptor gene is associated with the age-related decline in serum androgen levels in men. *J*  
30 *Endocrinol* 1999;162:137-142.  
31 [31] Huhtaniemi IT, Pye SR, Limer KL, et al. Increased estrogen rather than decreased androgen  
32 action is associated with longer androgen receptor CAG repeats. *J Clin Endocrinol Metab*  
33 2009;94:277-284.  
34 [32] Ponce-Gonzalez JG, Guadalupe-Grau A, Rodriguez-Gonzalez FG, et al. Androgen receptor gene  
35 polymorphisms and the fat-bone axis in young men and women. *J Androl* 2012;33:644-650.  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**Table legends**

**Table 1.** Body composition, anthropometrics, maturational stage, total and regional bone mass in boys and girls (mean ± standard deviation). BMC: bone mineral content; BMD: bone mineral density; Ls: mean lumbar spine (from L2, L3 and L4). \*P<0.05 vs boys.

**Table 2.** Body composition, anthropometrics, maturational stage, total and regional bone mass in boys and girls with CAG<sub>s</sub> and CAG<sub>L</sub> androgen receptor polymorphisms (mean ± standard deviation). BMC: bone mineral content; BMD: bone mineral density; Ls: mean lumbar spine (from L2, L3 and L4). Subjects were grouped as CAG short (CAG<sub>Ss</sub>) if harboring repeat lengths of ≤21 and CAG long (CAG<sub>L</sub>) if harboring repeat lengths of >21. \*P<0.05 vs CAG<sub>L</sub>.

**Table 3.** Body composition, anthropometrics, maturational stage, total and regional bone mass in boys and girls with GGN<sub>s</sub> and GGN<sub>L</sub> androgen receptor polymorphisms (mean ± standard deviation). BMC: bone mineral content; BMD: bone mineral density; Ls: mean lumbar spine (from L2, L3 and L4). Subjects were grouped as GGN short (GGN<sub>s</sub>) if harboring repeat lengths of ≤23 and CAG long (GGN<sub>L</sub>) if harboring repeat lengths of >23. \*P<0.05 vs GGN<sub>L</sub>.

**Table 1.** Body composition, anthropometrics, maturational stage, total and regional bone mass in boys and girls (mean  $\pm$  standard deviation).

	boys		n	girls		n
Age	11.5	$\pm$ 2.6	152	10.1	$\pm$ 3.2	116
Height (cm)	147.9	$\pm$ 14.8	152	138.4	$\pm$ 15.9	116
Body mass (kg)	41.7	$\pm$ 13.1	152	36.4	$\pm$ 12.6	116
Percentage of body fat (%)	21.1	$\pm$ 8.7	152	27.2	$\pm$ 8.5	116
Tanner G	2.5	$\pm$ 1.2	152	2.0	$\pm$ 1.2	116
Tanner H	2.6	$\pm$ 1.2	152	2.2	$\pm$ 1.4	116
<b>Body composition</b>						
Whole body BMC (g)	1395.9	$\pm$ 516.4	152	1150.4	$\pm$ 514.0	116
Whole body BMD (g/cm <sup>2</sup> )	2.8	$\pm$ 0.6	140	2.6	$\pm$ 0.9	115
Upper extremities BMC (g)	71.8	$\pm$ 35.1	152	59.2	$\pm$ 33.1	116
Upper extremities BMD (g/cm <sup>2</sup> )	0.6	$\pm$ 0.1	152	0.6	$\pm$ 0.1	116
Lower extremities BMC (g)	281.2	$\pm$ 127.9	152	217.5	$\pm$ 114.2	116
Lower extremities BMD (g/cm <sup>2</sup> )	1.0	$\pm$ 0.2	152	0.9	$\pm$ 0.2	116
Femoral neck BMC (g)	3.3	$\pm$ 1.2	150	2.9	$\pm$ 0.9	116
Femoral neck BMD (g/cm <sup>2</sup> )	0.8	$\pm$ 0.1	150	0.7	$\pm$ 0.1	116
Ward's triangle BMC (g)	0.9	$\pm$ 0.2	150	0.8	$\pm$ 0.2	116
Ward's triangle BMD (g/cm <sup>2</sup> )	0.8	$\pm$ 0.1	150	0.7	$\pm$ 0.2	116
Ls BMC (g)	18.6	$\pm$ 7.8	151	17.0	$\pm$ 9.2	115
Ls BMD (g/cm <sup>2</sup> )	1.7	$\pm$ 0.3	151	1.7	$\pm$ 0.4	115

**Table 2.** Body composition, anthropometrics, maturational stage, total and regional bone mass in boys and girls with CAGs and CAG<sub>L</sub> androgen receptor polymorphisms (mean  $\pm$  standard deviation).

	CAGs boys		CAG <sub>L</sub> boys		CAGs girls		CAG <sub>L</sub> girls	
	mean	n	mean	n	mean	n	mean	n
Age	11.3 $\pm$ 2.4	90	11.7 $\pm$ 2.8	62	10.1 $\pm$ 3.4	51	10.2 $\pm$ 3.0	65
Height (cm)	146.1 $\pm$ 14.0	90	150.5 $\pm$ 15.6*	62	138.2 $\pm$ 15.8	51	138.6 $\pm$ 16.0	65
Body mass (kg)	39.9 $\pm$ 12.0	90	44.2 $\pm$ 14.4*	62	36.3 $\pm$ 13.3	51	36.5 $\pm$ 12.2	65
Percentage of body fat (%)	20.9 $\pm$ 8.1	90	21.3 $\pm$ 9.5	62	27.0 $\pm$ 8.7	51	27.3 $\pm$ 8.4	65
Tanner G	2.5 $\pm$ 1.1	90	2.5 $\pm$ 1.2	62	2.0 $\pm$ 1.2	51	2.0 $\pm$ 1.3	65
Tanner H	2.6 $\pm$ 1.2	90	2.6 $\pm$ 1.2	62	2.2 $\pm$ 1.3	51	2.2 $\pm$ 1.4	65
<b>Body composition</b>								
Whole body BMC (g)	1340.9 $\pm$ 505.9	90	1475.8 $\pm$ 525.0*	62	1140.1 $\pm$ 520.6	51	1158.5 $\pm$ 512.7	65
Whole body BMD (g/cm <sup>2</sup> )	2.7 $\pm$ 0.6	90	2.8 $\pm$ 0.6*	62	2.7 $\pm$ 0.9	51	2.6 $\pm$ 1.0	65
Upper extremities BMC (g)	68.3 $\pm$ 34.2	90	76.8 $\pm$ 36.1*	62	57.9 $\pm$ 33.1	51	60.3 $\pm$ 33.4	65
Upper extremities BMD (g/cm <sup>2</sup> )	0.6 $\pm$ 0.1	90	0.6 $\pm$ 0.1	62	0.6 $\pm$ 0.1	51	0.6 $\pm$ 0.1	65
Lower extremities BMC (g)	266.9 $\pm$ 123.9	90	302.0 $\pm$ 131.8*	62	217.1 $\pm$ 117.6	51	217.8 $\pm$ 112.4	65
Lower extremities BMD (g/cm <sup>2</sup> )	1.0 $\pm$ 0.2	90	1.0 $\pm$ 0.2	62	0.9 $\pm$ 0.2	51	0.9 $\pm$ 0.2	65
Femoral neck BMC (g)	3.2 $\pm$ 1.2	90	3.3 $\pm$ 1.1	60	2.8 $\pm$ 0.9	51	2.9 $\pm$ 0.9	65
Femoral neck BMD (g/cm <sup>2</sup> )	0.8 $\pm$ 0.1	90	0.8 $\pm$ 0.1	60	0.7 $\pm$ 0.1	51	0.7 $\pm$ 0.1	65
Ward's triangle BMC (g)	0.9 $\pm$ 0.2	90	0.9 $\pm$ 0.2	60	0.9 $\pm$ 1.1	51	0.8 $\pm$ 0.2	65
Ward's triangle BMD (g/cm <sup>2</sup> )	0.8 $\pm$ 0.1	90	0.8 $\pm$ 0.1	60	0.7 $\pm$ 0.2	51	0.7 $\pm$ 0.2	65
Ls BMC (g)	17.9 $\pm$ 7.8	90	19.5 $\pm$ 7.7	61	16.6 $\pm$ 9.0	51	17.3 $\pm$ 9.4	64
Ls BMD (g/cm <sup>2</sup> )	1.6 $\pm$ 0.3	90	1.7 $\pm$ 0.3*	61	1.7 $\pm$ 0.4	51	1.7 $\pm$ 0.4	64

**Table 3.** Body composition, anthropometrics, maturational stage, total and regional bone mass in boys and girls with GGNs and GGNL androgen receptor polymorphisms (mean  $\pm$  standard deviation).

	GGNs boys		GGNL boys		GGNs girls		GGNL girls	
	mean	n	mean	n	mean	n	mean	n
Age	11.3 $\pm$ 2.4	93	11.8 $\pm$ 2.8	59	10.7 $\pm$ 3.3	50	9.7 $\pm$ 3.0	66
Height (cm)	147.6 $\pm$ 14.9	93	148.4 $\pm$ 14.7	59	142.1 $\pm$ 16.6	50	135.7 $\pm$ 14.9	66
Body mass (kg)	41.1 $\pm$ 12.5	93	42.6 $\pm$ 14.2	59	39.5 $\pm$ 13.7	50	34.0 $\pm$ 11.3	66
Percentage of body fat (%)	21.0 $\pm$ 8.6	93	21.1 $\pm$ 8.9	59	28.1 $\pm$ 8.8	50	26.5 $\pm$ 8.4	66
Tanner G	2.5 $\pm$ 1.2	93	2.6 $\pm$ 1.2	59	2.3 $\pm$ 1.3	50	1.8 $\pm$ 1.2	66
Tanner H	2.5 $\pm$ 1.2	93	2.7 $\pm$ 1.2	59	2.5 $\pm$ 1.4	50	1.9 $\pm$ 1.3	66
<b>Body composition</b>								
Whole body BMC (g)	1376.3 $\pm$ 499.6	93	1426.8 $\pm$ 544.7	59	1268.1 $\pm$ 547.8	50	1061.2 $\pm$ 471.8	66
Whole body BMD (g/cm <sup>2</sup> )	0.9 $\pm$ 0.1	93	0.9 $\pm$ 0.1	59	0.9 $\pm$ 0.1	50	0.8 $\pm$ 0.1	66
Upper extremities BMC (g)	69.3 $\pm$ 33.3	93	75.7 $\pm$ 37.8	59	67.0 $\pm$ 35.8	50	53.3 $\pm$ 29.9	66
Upper extremities BMD (g/cm <sup>2</sup> )	0.6 $\pm$ 0.1	93	0.6 $\pm$ 0.1*	59	0.6 $\pm$ 0.1	50	0.6 $\pm$ 0.1	66
Lower extremities BMC (g)	277.6 $\pm$ 125.9	93	287.0 $\pm$ 131.9	59	244.0 $\pm$ 121.8	50	197.4 $\pm$ 104.6	66
Lower extremities BMD (g/cm <sup>2</sup> )	1.0 $\pm$ 0.2	93	1.0 $\pm$ 0.2	59	0.9 $\pm$ 0.2	50	0.9 $\pm$ 0.2	66
Femoral neck BMC (g)	3.3 $\pm$ 1.2	92	3.3 $\pm$ 1.1	58	3.0 $\pm$ 0.8	50	2.8 $\pm$ 0.9	66
Femoral neck BMD (g/cm <sup>2</sup> )	0.8 $\pm$ 0.1	92	0.8 $\pm$ 0.1	58	0.7 $\pm$ 0.1	50	0.7 $\pm$ 0.1	66
Ward's triangle BMC (g)	0.9 $\pm$ 0.2	92	0.9 $\pm$ 0.1	58	0.8 $\pm$ 0.2	50	0.7 $\pm$ 0.2	66
Ward's triangle BMD (g/cm <sup>2</sup> )	0.8 $\pm$ 0.1	92	0.8 $\pm$ 0.1	58	0.7 $\pm$ 0.2	50	0.6 $\pm$ 0.2	66
Lumbar BMC (g)	18.4 $\pm$ 7.5	93	18.8 $\pm$ 8.3	58	19.0 $\pm$ 9.9	49	15.5 $\pm$ 8.3	66
Lumbar BMD (g/cm <sup>2</sup> )	1.7 $\pm$ 0.3	93	1.7 $\pm$ 0.3	58	1.8 $\pm$ 0.4	49	1.6 $\pm$ 0.4	66

## **ESTUDIO III**

**Androgen receptor gene CAG and GGN repeat polymorphism influence fat accumulation: a longitudinal study from adolescence to adult age**

Jesús Gustavo Ponce González<sup>1-2</sup>, Lorena Rodríguez-García<sup>1-2</sup>, José Losa-Reyna<sup>1-2</sup>, Amelia Guadalupe-Grau<sup>1-2</sup>, Francisco G. Rodríguez-González<sup>3-4</sup>, Bonifacio N Díaz-Chico<sup>3-4</sup>, Cecilia Dorado<sup>1-2</sup>, Jose A Serrano-Sanchez<sup>1-2</sup>, Jose A L Calbet<sup>1-2</sup>.

<sup>1</sup> Department of Physical Education, University of Las Palmas de Gran Canaria, Campus Universitario de Tafira s/n, Las Palmas de Gran Canaria, 35017, Spain.

<sup>2</sup> Research Institute of Biomedical and Health Sciences, University of Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, Spain.

<sup>3</sup> Department of Biochemistry and Physiology, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Spain.

<sup>4</sup> Canary Islands Cancer Research Institute (ICIC), Las Palmas de Gran Canaria, Canary Islands, Spain.

**Running title:** “AR polymorphism and fat mass accumulation during growth”

**Conflicts of interest:** None.

**Keywords:** AR CAG polymorphisms, AR GGN polymorphisms, adolescent, fat mass.

Correspondence to:

Jose A L Calbet

Departamento de Educación Física, Campus Universitario de Tafira, 35017 Las Palmas de Gran Canaria, Canary Islands, Spain

Tel: 0034 928 458 896

Fax: 0034 928 458 867

email: [lopezcalbet@gmail.com](mailto:lopezcalbet@gmail.com)

1 **Abstract**

2 To determine the influence of androgen receptor CAG and GGN repeat polymorphisms  
3 on fat mass and maximal fat oxidation (MFO), CAG and GGN repeats length was  
4 measured in 129 young boys, from which longitudinal data were obtained in 45 subjects  
5 [mean  $\pm$  SD: 12.8 $\pm$ 3.6 years old at recruitment, and 27.0 $\pm$ 4.8 years old at adult age].  
6 Subjects were grouped as CAG short (CAG<sub>S</sub>) if harbouring repeat lengths  $\leq$ 21, the rest  
7 as CAG long (CAG<sub>L</sub>); and GGN short (GGN<sub>S</sub>) if GGN repeat lengths  $\leq$ 23, or long if  
8  $>$ 23 (GGN<sub>L</sub>). Boys with CAG<sub>S</sub> showed lower BMI, percentage of body fat, whole body  
9 fat mass, fat mass in the trunk region, and total lean body mass than CAG<sub>L</sub> (P $<$ 0.05).  
10 The percentage of body fat, whole body and trunk fat mass was lower in GGN<sub>S</sub> than  
11 GGN<sub>L</sub> (P $<$ 0.05). At adult age, CAG<sub>S</sub>-men showed lower accumulation of whole body  
12 mass, BMI, total body and trunk fat mass, total lean body mass. CAG<sub>S</sub> had lower resting  
13 metabolic rate (RMR) and MFO per kg of total lean mass compared to CAG<sub>L</sub> (P $<$ 0.05).  
14 GGN<sub>S</sub> showed at adult age lower percentage of body fat, whole body and trunk fat mass  
15 than GGN<sub>L</sub> group after accounting for VO<sub>2</sub>max and MFO per kg of total lean mass  
16 (P $<$ 0.05). The logarithm of CAG repeats at adolescent and adult period was associated  
17 with the logarithm of BMI (r=0.364, P=0.014 and r=0.542, P $<$ 0.001; respectively),  
18 percentage of body fat (r=0.385, P=0.009 and r=0.296, P=0.057), fat mass in the trunk  
19 region (r=0.395, P=0.007 and r=0.412, P=0.007; respectively), of body fat (r=0.388,  
20 P=0.008 and r=0.383, P=0.012; respectively), and with the changes in total lean body  
21 mass (r=0.369, P=0.016). In summary, androgen receptor CAG and GGN repeat  
22 polymorphisms determine fat mass and its regional distribution in healthy male  
23 adolescents and influences fat accumulation from adolescence to adult age.



24 **Introduction**

25 The androgen receptor (AR) gene contains a polyglutamine tract encoded by CAG  
26 repeats and a polyglycine tract (GGN) encoded by (GGT)3GGG(GGT)2(GGC)n.  
27 Androgen receptor CAG and GGN repeat length polymorphisms are associated with fat  
28 and lean mass in adult humans <sup>1-5</sup>. However, little is known about the influence of AR  
29 CAG polymorphism on body composition changes during growth in children and  
30 adolescents, while the potential influence of AR GGN polymorphism remains unknown.

31 Cross-sectional studies have reported an inverse relationship between the AR  
32 CAG repeat length and height in prepubertal boys. This association, however,  
33 disappeared during puberty in two comparable cohorts of 226 (age 12.9-36 years) and  
34 244 subjects (age 8-14 years), respectively <sup>6</sup>. Moreover, no associations were found  
35 between AR CAG repeat length and body composition in this study <sup>6</sup>. This contrast with  
36 a positive association between CAG length and skinfold thickness between 10 and 12  
37 years of age was observed in a cohort of 78 healthy Danish boys (age 6.2-12.4 years) <sup>7</sup>.

38 Therefore, the main aim of this study was to determine whether AR CAG and  
39 GGN repeat polymorphisms may be associated with the changes in body composition  
40 from adolescence to adult age. Another aim was to investigate whether AR  
41 polymorphisms are associated to the maximal fat oxidation capacity in men and how  
42 this could influence the accumulation of fat mass during growth.

43 We hypothesized that androgen sensitivity, indicated by the length of CAG and  
44 GGN repeats in the X-chromosomal androgen receptor (AR) gene determines the level  
45 of fat and lean mass at young age, and the longitudinal changes from puberty to the  
46 adult age.

47

48 **Methods**

49 *Subjects*

50 Initially, this cohort included 129 young boys from Gran Canaria (Spain), from which  
51 longitudinal data were obtained in 45 subjects. The recruitment started in February 1998  
52 while the second assessment was obtained in January 2013. All subjects underwent a  
53 medical examination. Inclusion criteria were: age ranging from 8 to <17 years at  
54 recruitment. Subjects smoking, taking any kind of medications or having any chronic  
55 disease, hypertension or orthopaedic limitations were excluded. The study was  
56 performed in accordance with the Helsinki Declaration of 1975 as regards the conduct  
57 of clinical research, being approved by the Ethical Committee of the University of Las  
58 Palmas de Gran Canaria. After receiving written and verbal information on the potential  
59 risk and benefits of the study all subjects and parents signed a consent form to  
60 participate in this study.

61

62 *Tests*

63 Boys reported to the laboratory between 07:30 and 08:30 a.m., under fasting overnight  
64 conditions. After saliva collection, the International Physical Activity Questionnaire  
65 (IPAQ) was applied and a Tanner stage self-assessed as previously reported<sup>8-9</sup>. Then,  
66 their body composition was measured by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA).  
67 This was followed by the assessment of physical fitness (VO<sub>2</sub>max) as previously  
68 reported<sup>10</sup>.

69         Approximately 14 years later, subjects reported to the laboratory after an  
70 overnight fast for assessment of their body composition (same DXA analyzer) followed  
71 by measurement of their resting metabolic rate (RMR), maximal fat oxidation (MFO)

72 capacity and  $VO_2$ max with indirect calorimetry. Subjects were requested to refrain from  
73 non-habitual exercise, caffeine or alcohol drinks, for at least 24h prior to the test.

74

#### 75 *Body composition*

76 Whole body composition was assessed by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA)  
77 (QDR-1500, Hologic Corp., Software version 7.10, Waltham, MA) <sup>11</sup>. Upper and lower  
78 limb lean mass (kg) was calculated from the regional analysis of the whole body scan,  
79 which gives a valid and reliable estimate of muscle mass in the extremities <sup>12</sup>.

80

#### 81 *Indirect calorimetry*

82 After overnight fast, RMR was measured during 30 minutes while subjects lied supine  
83 on a bed using a metabolic cart (Vmax N29; Sensormedics, California, USA). This was  
84 followed by an incremental exercise test to determine the maximal fat oxidation (MFO),  
85 and the intensity at which MFO occurred (FatMax) during leg cycling <sup>13</sup>. The test  
86 started at 30 W for 5 min, followed by 30 W increments every 3 min. When subjects  
87 reached an RER>1.0 the exercise was stopped at the end of the corresponding 3 min  
88 period load. After 5 minutes of recovery, an incremental test (30 W/min) beginning in  
89 the last load of the MFO test was performed to determine the  $VO_2$ max. Subjects were  
90 instructed to maintain a pedaling rate of 80 rpm. Fat and carbohydrate oxidation was  
91 calculated from  $VO_2$  and  $VCO_2$  values during the last 60 s of each exercise step in the  
92 graded exercise tests, using standard indirect calorimetry equations <sup>14</sup>. It was assumed  
93 that protein oxidation was similar and small during the incremental exercise tests.

94

95 *CAG and GGN repeat polymorphisms*

96 CAG and GGN repeat polymorphisms were determined as previously reported <sup>5</sup>.  
97 Briefly, DNA was extracted from saliva samples (200 µl) using High Pure PCR  
98 Template Preparation Kits (Roche Applied Science). To determine the length of the  
99 CAG and GGN repeats the corresponding regions located on the exon 1 of the AR gene  
100 (Genbank accession no. M27423) were amplified using two pairs of primers whose  
101 sequences have been previously reported <sup>5</sup>. Fragment separation was performed by  
102 automated capillary electrophoresis, using an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer  
103 (Applied Biosystems) and the length was determined with Gene Scan Analysis Software  
104 (version 3.7) (Applied Biosystems). Internal standards supplied by the manufacturer  
105 were used for quality control.

106 *Statistical analysis*

107 All variables were checked for normal distribution using the test of Shapiro-Wilk. When  
108 necessary, the analysis was done on logarithmically transformed data. The influence of  
109 CAG and GGN repeat lengths on body composition, RMR, MFO, and VO<sub>2</sub>max was  
110 determined taking CAG and GGN repeat lengths as either continuous or as dichotomous  
111 variables with allele cut-off thresholds. The relationship between CAG and GGN as  
112 continuous variables with body composition, and physical fitness variables was  
113 examined using linear regression analysis. The median value that resulted in the most  
114 balanced grouping was used as a cutoff threshold <sup>15-16</sup>. The CAG and GGN number  
115 distributions were: CAG<sub>S</sub> (short ≤ 21 repeats; n=24), CAG<sub>L</sub> (long > 21 repeats; n=21),  
116 GGN<sub>S</sub> (short ≤ 23 repeats; n=30), and GGN<sub>L</sub> (long ≥ 24 repeats; n=15). Comparisons  
117 between short and long groups were carried out with ANOVA after accounting for age,  
118 height, total lean body mass, Tanner, and VO<sub>2</sub>max as covariates. When it was

119 necessary, lean mass was corrected for differences in height by dividing muscle mass by  
120 height<sup>2</sup> 17.

121

## 122 **Results**

123 Subjects' characteristics, body composition and physical fitness at young and adult age  
124 for the CAG and GGN groups are reported in Tables 1 and 2, respectively. Longitudinal  
125 data, daily energy expenditure, basal fat oxidation, RMR and MFO are reported in  
126 Table 3. The distribution of AR allele frequencies for CAG and GGN repeat numbers  
127 are illustrated in Figure 1. The median CAG repeat length was 21 (range: 15 -26), while  
128 the GGN median length was 23 (range: 14 - 27). The median CAG values for short and  
129 long groups were 19 and 24, respectively. The corresponding mean values for the GGN  
130 groups were 22 and 24, for the GGN<sub>S</sub> and GGN<sub>L</sub>, respectively.

131

### 132 *CAG, body composition and VO<sub>2</sub>max at recruitment*

133 No statistically significant differences in age, body mass, height, lean body mass and  
134 cardiorespiratory fitness (VO<sub>2</sub>max) were observed between CAG<sub>S</sub> and CAG<sub>L</sub> groups  
135 (Table 1). However, the BMI, percentage of body fat, whole body and trunk fat mass  
136 were lower in the CAG<sub>S</sub> compared to the CAG<sub>L</sub> group (P=0.04, P=0.03, P=0.03, and  
137 P=0.05, respectively) (Figure 2 A), even after accounting for pubertal status (P=0.002,  
138 P=0.05, P=0.01, P=0.02; respectively), age (P=0.003, P=0.07, P=0.01, and P=0.03,  
139 respectively), or both as covariates (P=0.002, P=0.05, P=0.01, P=0.02; respectively)  
140 (Table 1). These differences remained statically different after accounting for VO<sub>2</sub>max  
141 (ml/kg of body mass/min), age and Tanner stage (P=0.004, P=0.08, P=0.02, and P=0.04,  
142 respectively).

143 Compared to the CAG<sub>S</sub>, the CAG<sub>L</sub> group had greater total lean body mass, and  
144 lean mass in the lower and upper extremities after accounting for Tanner stage (all  
145 P<0.05), age (all P<0.05), Tanner stage and age (all P=0.01), or VO<sub>2</sub>max (ml/kg of  
146 body weight/min) (P<0.05). Only absolute values of VO<sub>2</sub>max (L/min) showed a trend  
147 to be higher in CAG<sub>L</sub> compared to CAG<sub>S</sub> after accounting for Tanner stage (P=0.07),  
148 age (P=0.13), or both as covariates (P=0.08).

149

150 *GGN, body composition and VO<sub>2</sub>max at recruitment*

151 No differences between GGN<sub>S</sub> and GGN<sub>L</sub> groups were observed in age, body mass,  
152 height, body composition and VO<sub>2</sub>max (Table 2). However, the percentage of body fat,  
153 and whole body and trunk fat mass were lower in GGN<sub>S</sub> compared to GGN<sub>L</sub> after  
154 accounting for Tanner stage and VO<sub>2</sub>max (ml/kg of body mass/min) (all P<0.05)  
155 (Figure 2 A).

156 No significant differences were observed in lean mass between GGN groups  
157 even after accounting for Tanner stage, age or VO<sub>2</sub>max. Neither was there a difference  
158 in VO<sub>2</sub>max between GGN groups, even after accounting for Tanner stage, age, total  
159 lean body mass or lower extremities lean mass.

160

161 *CAG at adult age and longitudinal changes in body composition.*

162 No significant differences in age, height (Table 1), daily energy expenditure, and time  
163 elapsed between the two measurements (Table 3) were observed between CAG<sub>S</sub> and  
164 CAG<sub>L</sub> groups. However, CAG<sub>L</sub> group accumulated 11.4 ± 2.0 kg more total body mass  
165 and 2.3 ± 3.4 kg more total body fat than the CAG<sub>S</sub> group during 13.7 ± 0.6 years of  
166 follow up (P=0.04 and P=0.03, respectively) (Figure 2 B). Moreover, CAG<sub>L</sub> showed a  
167 greater body mass, BMI, whole body and trunk fat mass (Figure 2 A) compared to

168 CAG<sub>S</sub> (P=0.001, P=0.001, P=0.05, and P=0.04, respectively), even after accounting for  
169 age (P=0.001, P=0.001, P=0.04, and P=0.06, respectively), for total energy expenditure  
170 (P=0.002, P=0.001, P=0.04, and P=0.03, respectively), VO<sub>2</sub>max (ml/kg of body  
171 mass/min) (all P<0.001), MFO per kg of total lean mass (P=0.003, P=0.002, P=0.06,  
172 and P=0.04, respectively) or for all covariates conjointly (all P<0.01) (Table 1). There  
173 was no difference in percentage of body fat between groups (P=0.25), even after  
174 accounting for age (P=0.29), for total energy expenditure (P=0.20), or for MFO per kg  
175 of total lean mass (P=0.27). However, after adjusting for VO<sub>2</sub>max (ml/kg of body  
176 mass/min) the percentage of body fat was 27% higher in CAG<sub>L</sub> compared to CAG<sub>S</sub>  
177 (P=0.03).

178 Moreover, CAG<sub>L</sub> also showed greater lean mass in the lower (15%) and upper  
179 (22%) extremities, as well as greater total lean body mass (16%) compared to CAG<sub>S</sub> (all  
180 P<0.01), even after accounting for age (all P<0.01), for total energy expenditure (all  
181 P<0.01), VO<sub>2</sub>max (ml/kg of body mass/min) (all P<0.01), or for all covariates  
182 conjointly (all P<0.01). In turn, CAG<sub>L</sub> accumulated 5.8 g of total lean body mass per  
183 day compared to 4.1 g/day in CAG<sub>S</sub> during the time of follow up (P=0.02).

184 CAG<sub>L</sub> group showed a 9% higher VO<sub>2</sub>max per kg of lower extremity lean mass  
185 than CAG<sub>S</sub> (P=0.048), but this difference was lost after accounting for age (P=0.06).

186 The MFO (absolute values), MFO per kg of lower extremity lean mass, and  
187 MFO per kg of total lean mass were greater in the CAG<sub>L</sub> than in the CAG<sub>S</sub> group  
188 (P=0.01, P=0.09, and P=0.12, respectively) (Figure 2 C), even after accounting for age  
189 (P=0.01, P=0.09, and P=0.12, respectively), for VO<sub>2</sub>max (P=0.02, P=0.12, and P=0.16,  
190 respectively), or both covariates conjointly (P=0.01, P=0.12, and P=0.16, respectively).  
191 The RMR was 15% higher in the CAG<sub>L</sub> than CAG<sub>S</sub> group (P=0.03). This difference,

192 however, disappeared after accounting for age ( $P=0.06$ ), total lean mass ( $P=0.30$ ), or for  
193 both conjointly ( $P=0.98$ ).

194

#### 195 *GGN at adult age and longitudinal changes in body composition*

196 No significant differences in age, height (Table 2), daily energy expenditure, and time  
197 elapsed between the two measurements were observed between  $GGN_S$  and  $GGN_L$   
198 groups (Table 3). Both GGN groups had similar body composition, even after  
199 accounting for age, total energy expenditure,  $VO_2\max$  ( $\text{ml.kg of body mass}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ), or  
200 MFO per kg of total lean mass. However,  $GGN_L$  had a higher percentage of whole body  
201 and trunk fat mass than  $GGN_S$  group after accounting for  $VO_2\max$  ( $\text{ml.kg of body mass}^{-1}.$   
202  $\text{min}^{-1}$ ) and MFO per kg of total lean mass jointly (all  $P<0.05$ ) (Figure 2 A). The  $GGN_S$   
203 and  $GGN_L$  subjects accumulated  $6.4 \pm 8.3$  and  $7.6 \pm 10.8$  kg of whole body fat over  
204  $13.7 \pm 0.6$  years of follow up (Figure 2 B). This difference in fat mass accumulation was  
205 not statistically significant ( $P=0.67$ ) even after accounting for initial age, change in  
206  $VO_2\max$ , body height, initial body fat mass, basal fat oxidation and MFO as covariates.

207

#### 208 *Correlations*

209 There was an association between the logarithm of CAG repeats polymorphism and the  
210 changes of body mass ( $r=0.34$ ,  $P=0.03$ ). At adolescent and adult age, the logarithm of  
211 CAG repeats polymorphism was associated with logarithm of BMI ( $r=0.36$ ,  $P=0.01$  and  
212  $r=0.54$ ,  $P<0.001$ ; respectively), logarithm of percentage of body fat ( $r=0.39$ ,  $P=0.009$   
213 and  $r=0.3$ , and  $P=0.057$ , respectively), logarithm of fat mass in the trunk region ( $r=0.4$ ,  
214  $P=0.007$  and  $r=0.41$ , and  $P=0.007$ , respectively), and logarithm of body fat ( $r=0.39$ ,  
215  $P=0.008$  and  $r=0.38$ , and  $P=0.012$ , respectively) (Figure 3). Moreover, there was an  
216 association between the logarithm of CAG repeats polymorphism and the changes in



217 total lean body mass ( $r=0.37$ ,  $P=0.016$ ) and the total lean body mass accumulated per  
218 day during the time elapsed between the two measurements ( $r=0.35$ ,  $P=0.024$ ).

219 Logarithm of CAG repeats polymorphism was associated to the changes of  $VO_2\max$   
220 (absolute values) ( $r=0.34$ ,  $P=0.03$ ).

221

## 222 **Discussion**

223 This study shows that the CAG repeat polymorphism determines long-term changes in  
224 fat mass in humans. Young subjects with short CAG had lower whole body and trunk  
225 fat mass, and lower whole body lean mass compared to long CAG subjects. These  
226 differences in body composition were maintained until adult age. More importantly, we  
227 have shown that the  $CAG_L$  is associated with increased whole body fat and lean mass  
228 gain with growth than the  $CAG_S$  genotype.

229 In agreement with our results at adolescent age, Mouritsen et al. based on cross-  
230 sectional data from 78 healthy Danish boys reported a greater body fat in  $CAG_L$   
231 compared to  $CAG_S$  group<sup>7</sup>. Our results also agree with cross-sectional data obtained in  
232 adult men reporting that the CAG repeat polymorphism is positively associated with  
233 higher body fat content<sup>2, 18</sup>, and lean mass<sup>4</sup>. These associations could be due to  
234 enhanced androgen sensitivity, since it has been shown that short CAG repeats are  
235 associated to increased AR transactivation activity and stronger transcriptional potential  
236<sup>19</sup>. Thus, subjects with shorter CAG may have increased responsiveness to androgens  
237 and this may result in lower accumulation of fat mass over the years. In agreement  
238 with this interpretation, there is compelling evidence indicating that androgen  
239 administration reduces fat mass, while in men reduced androgen levels are associated  
240 with lower lean mass and greater fat mass<sup>20-22</sup>. The observed increased lean mass in the  
241  $CAG_L$  group is likely due to the higher fat mass, since it has been shown in 24 young

242 lean men ( $21 \pm 2$  yr) that fat free mass increases ( $2.8 \pm 1.5$  kg) with fat mass  
243 accumulation ( $5.3 \pm 1.9$  kg) after 100 days of overfeeding<sup>23</sup>, despite  $0.9 \pm 0.6$  nmol/L  
244 non-significant increase in testosterone levels<sup>24</sup>. In fact, the proportion between fat  
245 mass and lean mass was similar in CAGs and CAGL groups (data not shown).

246 The potential influence of GGN polymorphism on fat mass accumulation during  
247 growth has not been analysed previously. As novelty, we have observed that a short  
248 GGN repeat length is associated with lower percentage of body fat, whole body and  
249 trunk fat mass in adolescents. However, at adult age, only the percentage of body fat  
250 and fat mass in the trunk region showed a trend to be lower in GGN<sub>S</sub> group compared to  
251 GGN<sub>L</sub> group. In agreement, it has been shown that the length of the GGN tract is  
252 linearly and inversely associated with AR protein content in cell cultures<sup>25</sup>, and longer  
253 GGN tracts result in a linearly reduced AR activity per cell<sup>25</sup>. Therefore, this reduced  
254 activity of AR with longer GGN repeats could attenuate the antiobesity effects of  
255 androgens, and effect which may be more notorious at young age, when the level of  
256 androgens are likely lower. Since, this is the first study examining the influences of AR  
257 GGN repeat length on body composition at young age, no comparable data exist at the  
258 moment.

259 In agreement with our results, we have reported recently that GGN repeat  
260 polymorphism was positively associated with adiposity in adult women, but not in men  
261<sup>5</sup>. The lack influence of GGN repeats on adiposity at adult age in men of this study  
262 could be explained by the fact that in present cohort most men had GGN repeat lengths  
263 close to the mean population length. Therefore, future research should examine body  
264 composition and growth changes in subjects with extreme GGN repeat lengths.

265 Ara et al. showed that obese human had an increased fat oxidation capacity  
266 compared to lean<sup>26</sup>. This finding is in concordance with our results, since CAG<sub>L</sub> group

267 at adult age showed higher adiposity and lean mass, which could increase their RMR  
268 and MFO capacity compared to CAG<sub>s</sub> group. Moreover, GGN repeat polymorphism  
269 has been found to be associated positively with MFO at adult age in our study.

270 It has been suggested that age, lean body mass and VO<sub>2</sub>max are determinant  
271 factors of fat oxidation capacity in humans<sup>27-29</sup>. Venables et al. reported in 300 subjects  
272 (143 women and 157 men) that estimated physical activity level, VO<sub>2</sub>max, and gender  
273 were significant predictors of MFO/FFM, together accounting for 12% of the variance.  
274 However, these factors cannot account for our results, since all groups showed similar  
275 age, physical activity, relative VO<sub>2</sub>max, and only men participated in this study.

276 The main limitation of this study is the small number of subjects having short or  
277 long AR repeat polymorphisms that were included in the longitudinal analysis. This was  
278 due to some subjects starting smoking, while others were lost due to residence changes  
279 or refusal to follow up tests. Despite this limitation, our conclusions are solid since they  
280 derive from the assessment of multiple factors influencing fat mass accumulation such  
281 as physical fitness and maximal fat oxidation and are based on a long follow up period.

282

283 In conclusion, androgen receptor CAG and GGN repeat polymorphisms  
284 determine fat mass and its regional distribution in healthy male adolescents. In addition,  
285 the CAG repeat polymorphism also determines the rate of fat accumulation during  
286 growth from the adolescence to the adulthood. The association between AR CAG  
287 polymorphism and lean mass is likely due to the increased body weight, since it was  
288 mostly explained by increased lean mass in the lower extremities.

289

290 **Acknowledgments**

291 The authors thank José Navarro de Tuero for his excellent technical assistance. This  
292 study was supported by Ministerio de Educación y Ciencia (DEP2006-56076-C06-  
293 04/ACTI) and FEDER, Gobierno de Canarias (PI2005/177), Proyecto Interreg IIIB  
294 BIOPOLIS, Fundación del Instituto Canario de Investigación del Cáncer (FICIC),  
295 Cabildo de Gran Canaria, Cabildo de Tenerife and La Caja de Canarias, and Proyecto  
296 Estructurante “Integración de los grupos de investigación en Ciencias de la Salud”,  
297 ULPGC, Gobierno de Canarias. None of the authors has conflicts of interest. All  
298 financial sources have been reported.

299

300     **REFERENCES**

- 301     1.     Gustafson DR, Wen MJ, Koppanati BM. Androgen receptor gene repeats and indices of  
302           obesity in older adults. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; **27**(1): 75-81.  
303
- 304     2.     Nielsen TL, Hagen C, Wraae K, Bathum L, Larsen R, Brixen K *et al.* The impact of the  
305           CAG repeat polymorphism of the androgen receptor gene on muscle and adipose  
306           tissues in 20-29-year-old Danish men: Odense Androgen Study. *Eur J Endocrinol* 2010;  
307           **162**(4): 795-804.  
308
- 309     3.     Stanworth RD, Kapoor D, Channer KS, Jones TH. Androgen receptor CAG repeat  
310           polymorphism is associated with serum testosterone levels, obesity and serum leptin  
311           in men with type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol* 2008; **159**(6): 739-46.  
312
- 313     4.     Walsh S, Zmuda JM, Cauley JA, Shea PR, Metter EJ, Hurley BF *et al.* Androgen receptor  
314           CAG repeat polymorphism is associated with fat-free mass in men. *J Appl Physiol*  
315           (1985) 2005; **98**(1): 132-7.  
316
- 317     5.     Ponce-Gonzalez JG, Guadalupe-Grau A, Rodriguez-Gonzalez FG, Dorado C, Olmedillas  
318           H, Fuentes T *et al.* Androgen receptor gene polymorphisms and the fat-bone axis in  
319           young men and women. *J Androl* 2012; **33**(4): 644-50.  
320
- 321     6.     Voorhoeve PG, van Mechelen W, Uitterlinden AG, Delemarre-van de Waal HA,  
322           Lamberts SW. Androgen receptor gene CAG repeat polymorphism in longitudinal  
323           height and body composition in children and adolescents. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2011;  
324           **74**(6): 732-5.  
325
- 326     7.     Mouritsen A, Hagen CP, Sorensen K, Aksglaede L, Mieritz MG, Main KM *et al.* Androgen  
327           receptor CAG repeat length is associated with body fat and serum SHBG in boys: a  
328           prospective cohort study. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; **98**(3): E605-9.  
329
- 330     8.     Roman-Viñas B, Serra-Majem L, Hagströmer M, Ribas-Barba L, Sjöström M, Segura-  
331           Cardona R. International Physical Activity Questionnaire: Reliability and validity in a  
332           Spanish population. *European Journal of Sport Science* 2010; **10**(5): 297-304.  
333
- 334     9.     Vicente-Rodriguez G, Ara I, Perez-Gomez J, Serrano-Sanchez JA, Dorado C, Calbet JA.  
335           High femoral bone mineral density accretion in prepubertal soccer players. *Med Sci*  
336           *Sports Exerc* 2004; **36**(10): 1789-95.  
337
- 338     10.    Guadalupe-Grau A, Rodriguez-Gonzalez FG, Dorado C, Olmedillas H, Fuentes T, Perez-  
339           Gomez J *et al.* Androgen receptor gene polymorphisms lean mass and performance in  
340           young men. *Br J Sports Med* 2011; **45**(2): 95-100.  
341
- 342     11.    Perez-Gomez J, Olmedillas H, Delgado-Guerra S, Royo IA, Vicente-Rodriguez G, Ortiz RA  
343           *et al.* Effects of weight lifting training combined with plyometric exercises on physical  
344           fitness, body composition, and knee extension velocity during kicking in football.  
345           *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et*  
346           *metabolisme* 2008; **33**(3): 501-510.  
347

- 348 12. Kim J, Wang Z, Heymsfield SB, Baumgartner RN, Gallagher D. Total-body skeletal  
349 muscle mass: estimation by a new dual-energy X-ray absorptiometry method. *Am J Clin*  
350 *Nutr* 2002; **76**(2): 378-83.  
351
- 352 13. Achten J, Gleeson M, Jeukendrup AE. Determination of the exercise intensity that  
353 elicits maximal fat oxidation. *Med Sci Sports Exerc* 2002; **34**(1): 92-7.  
354
- 355 14. Frayn KN. Calculation of substrate oxidation rates in vivo from gaseous exchange. *J*  
356 *Appl Physiol* 1983; **55**(2): 628-34.  
357
- 358 15. Hickey T, Chandy A, Norman RJ. The androgen receptor CAG repeat polymorphism and  
359 X-chromosome inactivation in Australian Caucasian women with infertility related to  
360 polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; **87**(1): 161-5.  
361
- 362 16. Rodriguez-Gonzalez G, Ramirez-Moreno R, Perez P, Bilbao C, Lopez-Rios L, Diaz-Chico  
363 JC *et al.* The GGN and CAG repeat polymorphisms in the exon-1 of the androgen  
364 receptor gene are, respectively, associated with insulin resistance in men and with  
365 dyslipidemia in women. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009; **113**(3-5): 202-8.  
366
- 367 17. Lietzke MH. Relation between weightlifting totals and body weight. *Science* 1956;  
368 **124**(3220): 486-7.  
369
- 370 18. Zitzmann M, Gromoll J, von Eckardstein A, Nieschlag E. The CAG repeat polymorphism  
371 in the androgen receptor gene modulates body fat mass and serum concentrations of  
372 leptin and insulin in men. *Diabetologia* 2003; **46**(1): 31-9.  
373
- 374 19. Lee DK, Chang C. Endocrine mechanisms of disease: Expression and degradation of  
375 androgen receptor: mechanism and clinical implication. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;  
376 **88**(9): 4043-54.  
377
- 378 20. Emmelot-Vonk MH, Verhaar HJ, Nakhai Pour HR, Aleman A, Lock TM, Bosch JL *et al.*  
379 Effect of testosterone supplementation on functional mobility, cognition, and other  
380 parameters in older men: a randomized controlled trial. *JAMA* 2008; **299**(1): 39-52.  
381
- 382 21. Forbes GB, Porta CR, Herr BE, Griggs RC. Sequence of changes in body composition  
383 induced by testosterone and reversal of changes after drug is stopped. *JAMA* 1992;  
384 **267**(3): 397-9.  
385
- 386 22. Mauras N, Hayes V, Welch S, Rini A, Helgeson K, Dokler M *et al.* Testosterone  
387 deficiency in young men: marked alterations in whole body protein kinetics, strength,  
388 and adiposity. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; **83**(6): 1886-92.  
389
- 390 23. Bouchard C, Tremblay A, Despres JP, Nadeau A, Lupien PJ, Theriault G *et al.* The  
391 response to long-term overfeeding in identical twins. *N Engl J Med* 1990; **322**(21):  
392 1477-82.  
393
- 394 24. Pritchard J, Despres JP, Gagnon J, Tchernof A, Nadeau A, Tremblay A *et al.* Plasma  
395 adrenal, gonadal, and conjugated steroids before and after long-term overfeeding in  
396 identical twins. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; **83**(9): 3277-84.  
397

- 398 25. Ding D, Xu L, Menon M, Reddy GP, Barrack ER. Effect of GGC (glycine) repeat length  
399 polymorphism in the human androgen receptor on androgen action. *Prostate* 2005;  
400 **62**(2): 133-9.  
401
- 402 26. Ara I, Larsen S, Stallknecht B, Guerra B, Morales-Alamo D, Andersen JL *et al*. Normal  
403 mitochondrial function and increased fat oxidation capacity in leg and arm muscles in  
404 obese humans. *Int J Obes (Lond)* 2011; **35**(1): 99-108.  
405
- 406 27. Riddell MC, Jamnik VK, Iscoe KE, Timmons BW, Gledhill N. Fat oxidation rate and the  
407 exercise intensity that elicits maximal fat oxidation decreases with pubertal status in  
408 young male subjects. *J Appl Physiol (1985)* 2008; **105**(2): 742-8.  
409
- 410 28. Nordby P, Saltin B, Helge JW. Whole-body fat oxidation determined by graded exercise  
411 and indirect calorimetry: a role for muscle oxidative capacity? *Scand J Med Sci Sports*  
412 2006; **16**(3): 209-14.  
413
- 414 29. Solomon TP, Marchetti CM, Krishnan RK, Gonzalez F, Kirwan JP. Effects of aging on  
415 basal fat oxidation in obese humans. *Metabolism* 2008; **57**(8): 1141-7.  
416  
417  
418  
419

420 **Figure legends**

421 **Figure 1.** Histogram representing the number of subjects with each (A) CAG and (B)  
422 GGN repeat number.

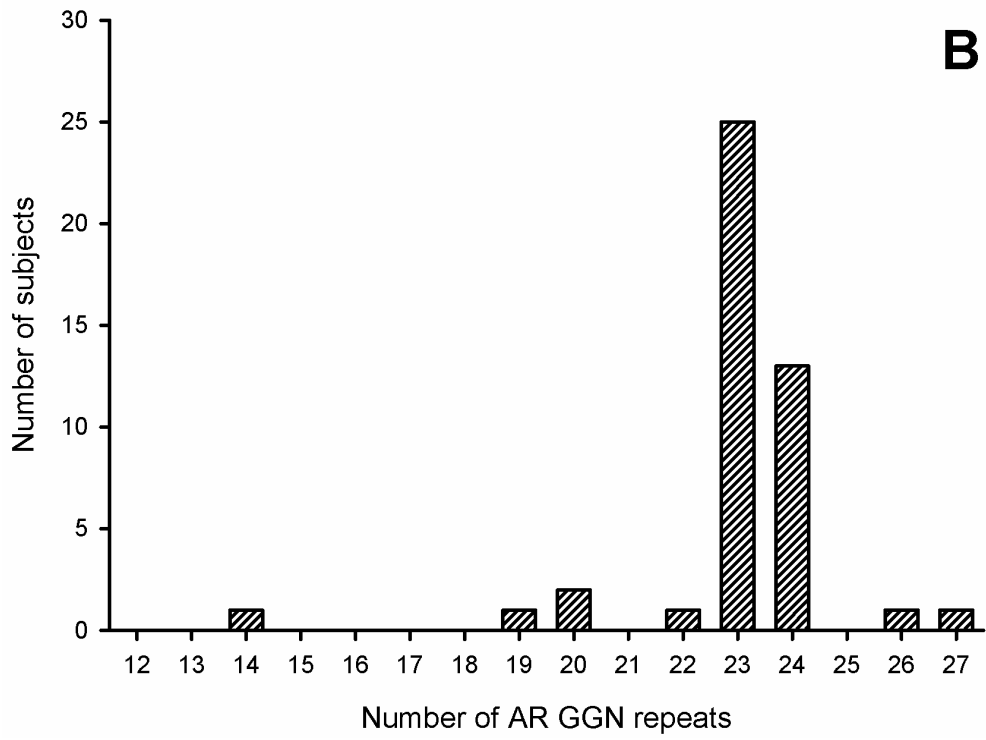
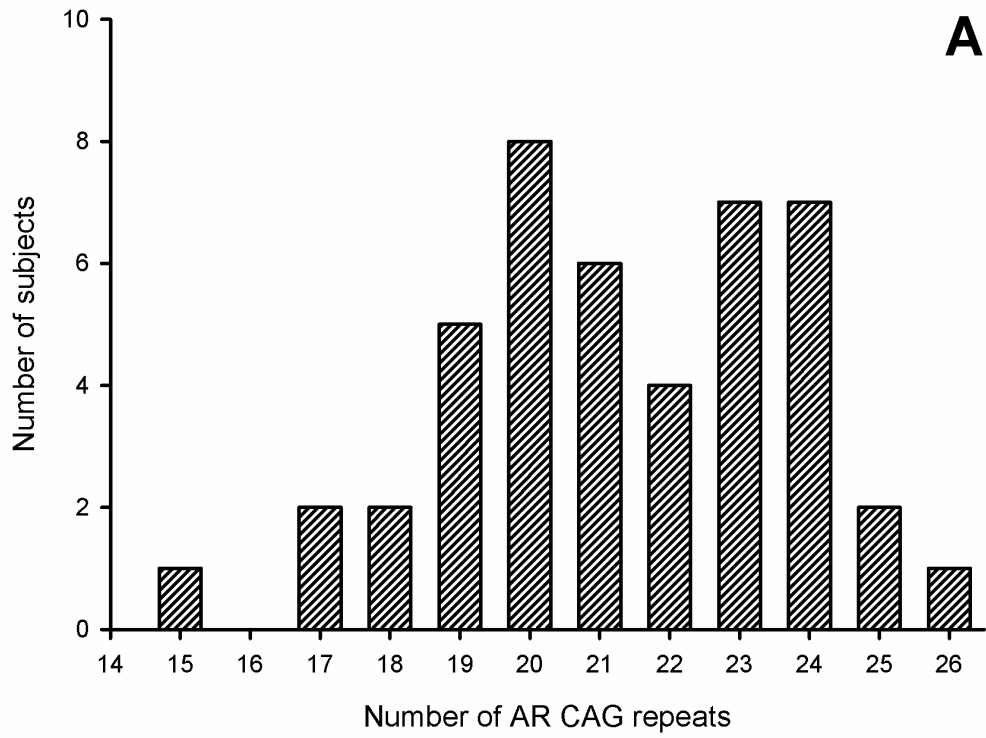
423

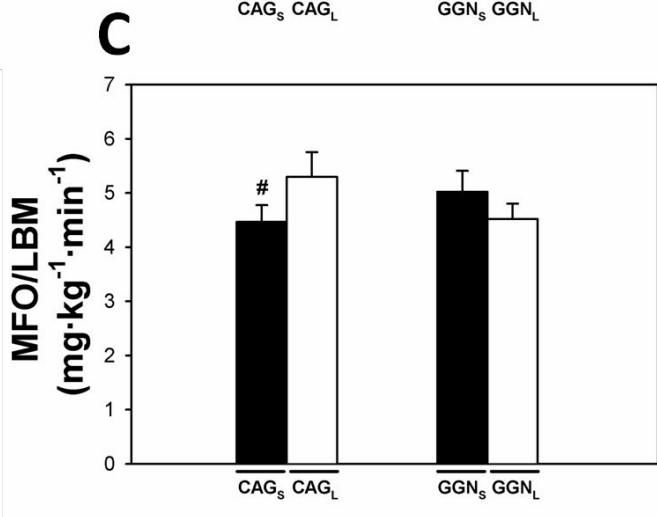
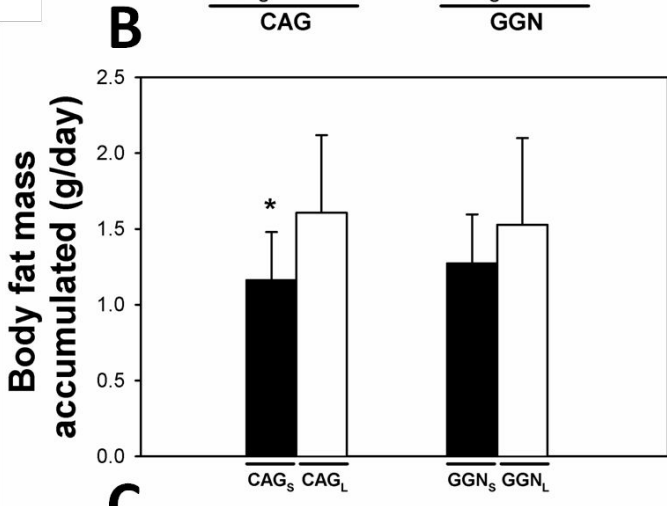
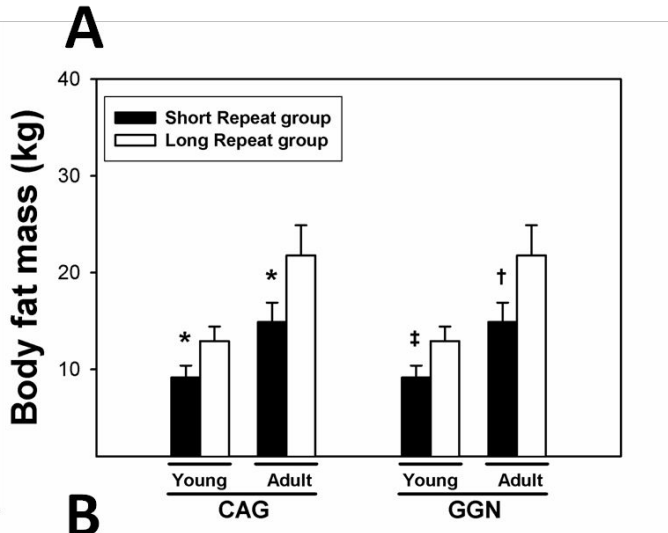
424 **Figure 2.** Levels of (A) total body fat (kg) for CAG and GGN groups at young and  
425 adult age, (B) total body fat accumulation ( $\text{g}\cdot\text{day}^{-1}$ ) for CAG<sub>S</sub> vs CAG<sub>L</sub>, and GGN<sub>S</sub> vs  
426 GGN<sub>L</sub> groups and (C) maximal fat oxidation per kg of lean body mass ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ )  
427 for CAG<sub>S</sub> vs CAG<sub>L</sub>, and GGN<sub>S</sub> vs GGN<sub>L</sub> groups. \* $P<0.05$  between short and long  
428 groups without adjusting for any variable; ‡ $P<0.05$  between short and long groups after  
429 accounting for Tanner stage and  $\text{VO}_2\text{max}$ . † $P<0.05$  between short and long groups after  
430 accounting for MFO per kg of total lean mass and  $\text{VO}_2\text{max}$ . # $P=0.12$  between short and  
431 long groups using raw unadjusted data. Subjects were grouped as CAG short (CAG<sub>S</sub>) if  
432 harboring repeat lengths of  $\leq 21$  and CAG long (CAG<sub>L</sub>) if harboring repeat lengths of  
433  $>21$ . The cutoff point for GGN short (GGN<sub>S</sub>) was GGN repeat polymorphism  $\leq 23$ ,  
434 otherwise subjects were included in the GGN long (GGN<sub>L</sub>) group. Plotted values  
435 correspond to raw unadjusted variables.

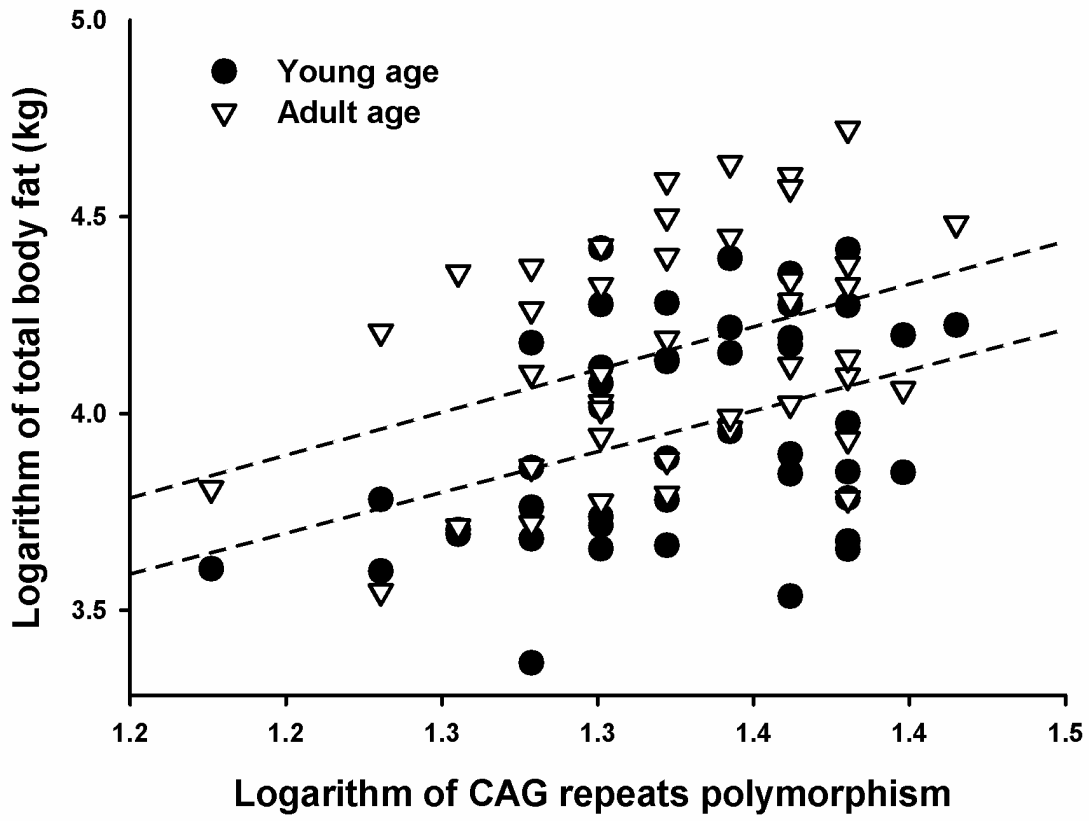
436

437 **Figure 3.** Graphical display of the partial correlation between the logarithm of CAG  
438 repeat number with logarithm of total body fat at young ( $r=0.39$ ,  $P=0.008$ ) and adult age  
439 ( $r=0.38$ ,  $P=0.012$ ). No significant differences were observed between the slopes of the  
440 straight lines.









**Table 1.** Subjects' characteristics, body composition and physical fitness at young and adult age for short and long CAG groups.

	Young age			Adult age		
	CAGs	(n)	CAG <sub>L</sub>	CAGs	(n)	CAG <sub>L</sub>
Age	13.4 ± 3.8	24	12.1 ± 3.4	27.2 ± 4.3	24	26.1 ± 3.7
Height (cm)	156.9 ± 17.8	24	153.1 ± 17.6	178.2 ± 7.1	24	179.8 ± 7.5
Body mass (kg)	48.0 ± 15.1	24	51.3 ± 18.4	73.8 ± 12.4	24	89.9 ± 19.0 *
Body mass index (BMI)	18.9 ± 3.0	24	21.2 ± 4.2 *	23.2 ± 3.6	24	27.8 ± 5.4 *
Percentage of body fat (%)	19.0 ± 9.3	24	25.7 ± 10.9 *	19.2 ± 10.0	23	22.7 ± 9.8 †
Fat mass in the trunk region (kg)	2.8 ± 2.6	24	4.9 ± 3.4 *	6.8 ± 5.7	23	11.0 ± 8.2 *
Body fat mass (kg)	9.2 ± 6.1	24	12.9 ± 6.9 *	14.9 ± 9.6	23	21.8 ± 13.6 *
Lean body mass (kg)	36.3 ± 12.3	24	35.8 ± 14.7 ‡	55.7 ± 6.4	23	64.5 ± 8.7 *
Lean mass arms (kg)	3.5 ± 1.4	24	3.5 ± 1.8 ‡	6.4 ± 1.1	23	7.9 ± 1.5 *
Lean mass legs (kg)	12.3 ± 4.7	24	12.3 ± 5.7 ‡	18.2 ± 2.3	23	20.9 ± 3.3 *
Lean mass extremities (kg)	15.9 ± 6.1	24	15.8 ± 7.5 ‡	24.7 ± 3.1	23	28.8 ± 4.5 *
<b>Maximal aerobic power</b>						
VO <sub>2</sub> max (ml·min <sup>-1</sup> )	2.2 ± 0.8	24	2.3 ± 0.8	3.1 ± 0.6	24	3.8 ± 0.5
VO <sub>2</sub> max/Body mass (ml·kg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	47.9 ± 8.4	24	47.1 ± 6.1	42.6 ± 7.7	24	44.4 ± 9.3
VO <sub>2</sub> max/LBM (ml·kg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	62.7 ± 12.8	24	66.8 ± 9.3	55.4 ± 7.6	23	59.8 ± 8.3
VO <sub>2</sub> max/LML (ml·kg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	187.6 ± 38.8	24	199.8 ± 36.2	169.4 ± 22.2	23	185.2 ± 28.1 *

LBM: lean body mass; LML: lean mass legs. Subjects were grouped as CAG short (CAGs) if harbouring repeat lengths of ≤21 and CAG long (CAG<sub>L</sub>) if harbouring repeat lengths of >21. Body composition statistical analysis was done with logarithmic data \* P < 0.05 without adjusting for any variable. ‡ P < 0.05 after adjusting for Tanner stage. † P < 0.05 after accounting for VO<sub>2</sub>max

**Table 2.** Subjects' characteristics, body composition and physical fitness at young and adult age for short and long GGN groups.

	Young age			Adult age			
	GGNs	(n)	GGNL	(n)	GGNs	GGNL	(n)
Age	12.8 ± 4.0	30	13.0 ± 3.1	15	26.6 ± 4.3	26.8 ± 3.4	15
Height (cm)	153.6 ± 18.4	30	158.2 ± 15.9	15	178.7 ± 7.4	179.5 ± 7.1	15
Body mass (kg)	47.7 ± 16.7	30	53.1 ± 16.3	15	79.6 ± 17.5	84.7 ± 17.9	15
Body mass index (BMI)	19.6 ± 3.6	30	20.8 ± 4.0	15	24.9 ± 4.8	26.3 ± 5.4	15
Percentage of body fat (%)	20.9 ± 10.6	30	24.5 ± 10.4 ‡	15	19.4 ± 9.8	23.2 ± 10.1 †	15
Fat mass in the trunk region (kg)	3.3 ± 2.8	30	4.8 ± 3.6 ‡	15	7.8 ± 6.7	10.3 ± 7.8 †	15
Body fat mass (kg)	9.9 ± 6.4	30	12.9 ± 6.9 ‡	15	16.6 ± 11.3	20.6 ± 13.1 †	15
Lean body mass (kg)	35.4 ± 13.9	30	37.5 ± 12.5	15	59.4 ± 9.0	60.1 ± 8.1	15
Lean mass arms (kg)	3.4 ± 1.6	30	3.7 ± 1.6	15	7.0 ± 1.4	7.2 ± 1.6	15
Lean mass legs (kg)	12.0 ± 5.3	30	12.9 ± 4.8	15	19.5 ± 3.3	19.4 ± 2.8	15
Lean mass extremities (kg)	15.4 ± 6.9	30	16.6 ± 6.2	15	26.6 ± 4.5	26.5 ± 4.0	15
<b>Maximal aerobic power</b>							
VO <sub>2</sub> max (ml·min <sup>-1</sup> )	2.2 ± 0.8	29	2.4 ± 0.7	13	3.4 ± 0.7	3.5 ± 0.6	15
VO <sub>2</sub> max/Body mass (ml·kg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	47.6 ± 7.6	29	47.5 ± 7.3	13	43.5 ± 8.4	43.4 ± 8.9	15
VO <sub>2</sub> max/LBM (ml·kg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	63.6 ± 12.2	29	66.1 ± 9.8	13	56.5 ± 8.7	59.1 ± 7.0	15
VO <sub>2</sub> max/LML (ml·kg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	192.5 ± 40.9	29	193.5 ± 31.0	13	172.4 ± 25.5	184.0 ± 26.0	15

LBM: lean body mass; LML: lean mass legs. Subjects were grouped as GGN short (GGNs) if harbouring repeat lengths of ≤23 and GGN long (GGNL) if harbouring repeat lengths of >23. Body composition statistical analysis was done with logarithmic data \* P < 0.05 without adjusting for any variable. ‡ P < 0.05 after adjusting for Tanner stage and VO<sub>2</sub>max. † P < 0.05 after accounting for VO<sub>2</sub>max and MFO per kg of total lean mass.

**Table 3.** Changes in body composition, resting metabolic rate and maximal fat oxidation and androgen receptor polymorphism.

	CAGs		CAG <sub>L</sub>		GGNs		GGN <sub>L</sub>	
	(n)		(n)		(n)		(n)	
<b>Longitudinal data (changes)</b>								
Time elapsed between the measurements (ys)	13.73 ± 0.57	24	13.93 ± 0.62	21	13.82 ± 0.61	30	13.83 ± 0.58	15
Body fat mass accumulated (g/day)	1.16 ± 1.52	23	1.61 ± 2.23 *	19	1.27 ± 1.68	27	1.53 ± 2.21	15
Trunk fat mass accumulated (g/day)	0.81 ± 0.95	23	1.13 ± 1.31	19	0.88 ± 1.07	27	1.09 ± 1.25	15
Lean body mass accumulated (g/day)	4.05 ± 2.34	23	5.77 ± 2.38 *	19	5.00 ± 2.63	27	4.52 ± 2.26	15
<b>Energy expenditure tests</b>								
Energy expenditure (IPAQ) (Mets-h/week)	72.66 ± 69.53	24	82.34 ± 45.24	21	77.40 ± 68.07	30	76.73 ± 36.64	15
Basal Fat Oxidation (mg/min)	79.55 ± 28.67	24	88.46 ± 32.10	21	87.94 ± 32.74	30	75.25 ± 23.47	15
Basal Fat Oxidation/LBM (mg·kg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	1.49 ± 0.55	23	1.42 ± 0.63	19	1.56 ± 0.62	27	1.29 ± 0.46	15
Basal Fat Oxidation/LML (mg·kg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	4.58 ± 1.74	23	4.41 ± 1.97	19	4.78 ± 1.97	27	4.01 ± 1.48	15
Basal Fat Oxidation/LML·Ht <sup>-2</sup> (mg·kg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	14.58 ± 5.50	23	13.96 ± 6.07	19	15.15 ± 6.24	27	12.77 ± 4.36	15
Resting metabolic rate (Kcal·min <sup>-1</sup> )	1.16 ± 0.26	24	1.36 ± 0.31 *	21	1.29 ± 0.32	30	1.19 ± 0.24	15
Resting metabolic rate/LBM (kcal·kg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	0.021 ± 0.004	23	0.021 ± 0.005	19	0.022 ± 0.005	27	0.020 ± 0.005	15
Maximal Fat Oxidation (mg/min)	242.6 ± 100.6	24	332.8 ± 117.1 *	21	292.4 ± 136.2	30	269.1 ± 62.3	15
Maximal Fat Oxidation/LBM (mg·kg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	4.47 ± 1.48	23	5.30 ± 1.98 ‡	19	5.02 ± 2.02	27	4.52 ± 1.11	15
Maximal Fat Oxidation/LML (mg·kg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	13.62 ± 4.50	23	16.31 ± 5.64 ‡	19	15.25 ± 5.85	27	14.11 ± 3.71	15
Maximal Fat Oxidation/LML·Ht <sup>-2</sup> (mg·kg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	43.62 ± 14.67	23	52.22 ± 18.57	19	48.75 ± 19.43	27	45.28 ± 11.29	15

LBM: lean body mass; LML: lean mass legs; Ht: height. Subjects were grouped as CAG short (CAG<sub>s</sub>) if harbouring repeat lengths of ≤21 and CAG long (CAG<sub>L</sub>) if harbouring repeat lengths of >21. The cutoff point for GGN short (GGN<sub>s</sub>) was GGN repeat polymorphism ≤23, otherwise subjects were included in the GGN long (GGN<sub>L</sub>) group. \* P < 0.05 without adjusting for any variable. ‡ P < 0.12 without adjusting for any variable