



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:
ESTRATEGIAS BIOLÓGICAS EN EL ÁREA FARMACÉUTICA

**“ESTUDIO DE LOS GENES *c-KIT* Y *AR* EN UN GRUPO DE PACIENTES MEXICANOS
CON CRIPTORQUIDIA IDIOPÁTICA”**

COMUNICACIÓN IDÓNEA DE RESULTADOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

PRESENTA

QFB. DANIEL ADRIAN LANDERO HUERTA
2132800225

COMITÉ TUTORIAL

CO-TUTORA: DRA. MARGARITA DOLORES CHÁVEZ SALDAÑA
CO-TUTORA: DRA. MARISOL LÓPEZ LÓPEZ
ASESORA: DRA. MARISA CABEZA SALINAS

JULIO, 2015

**“ESTUDIO DE LOS GENES *c-KIT* Y *AR* EN UN GRUPO DE PACIENTES MEXICANOS
CON CRIPTORQUIDIA IDIOPÁTICA”**

VISTO BUENO DEL COMITÉ TUTORAL

CO-TUTORA: DRA. MARGARITA DOLORES CHÁVEZ SALDAÑA _____

CO-TUTORA: DRA. MARISOL LÓPEZ LÓPEZ _____

ASESORA: DRA. MARISA CABEZA SALINAS _____

**QFB. DANIEL ADRIAN
LANDERO HUERTA
2132800225**

**“ESTUDIO DE LOS GENES *c-KIT* Y *AR* EN UN GRUPO DE PACIENTES MEXICANOS
CON CRIPTORQUIDIA IDIOPÁTICA”**

JURADO:

PRESIDENTE: DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO _____

VOCAL: DRA. ROSA MARÍA VIGUERAS VILLASEÑOR _____

SECRETARIA: DRA. MARISOL LÓPEZ LÓPEZ _____

RESUMEN

A pesar de que la criptorquidia (CO) es considerada una malformación leve, tiene una gran repercusión en la salud del varón, como el riesgo a la infertilidad y al desarrollo de cáncer testicular de células germinales (CTCG). La incidencia tanto de la CO como del CTCG ha incrementado en las últimas décadas. Debido a esto, surge la necesidad de conocer y diagnosticar oportunamente dichas patologías, lo que sería de gran impacto en nuestro país ya que hasta la fecha no se cuenta con los datos epidemiológicos, ni con estudios a nivel molecular que apoyen la relación contundente de la aparición de CO con el riesgo de desarrollar CTCG. Ambas son consideradas enfermedades complejas, en las que intervienen múltiples genes, algunos de estos son *c-KIT* y *AR*. En este trabajo nos propusimos analizar dos variantes alélicas del gen *c-KIT* (D816V y D816H) y 4 del gen *AR* (P390S, A297T, Del L57 y el repetido de Poli Q) asociadas a CTCG en pacientes pediátricos con CO idiopática. La genotipificación de las variantes D816V, D816H, P390S y A297T se realizó mediante discriminación alélica con sondas TaqMan®, mientras que para el caso de las variantes Del L57 y los repetidos de Poli Q se optó por secuenciación automática. Las variantes analizadas no se encontraron en pacientes con CO idiopática. Por otro lado la Del L57 se identificó por primera vez en uno de los pacientes con CO idiopática unilateral. Además se encontró una diferencia significativa en el número de repetidos de Poli Q entre los grupos de estudio, con un promedio de inserciones de 24.40, 25.15 y 22.72 respectivamente. Por último, es importante resaltar que aunque en este estudio se obtuvieron resultados significativos, se deben validar en una n más amplia, para poder encontrar una correlación más clara, además de proponer metodologías más finas para poder encontrar vías de señalización o genes de importancia en ambas patologías que permitan proponer mecanismos que relacionen a los padecimientos.

Palabras clave: Pacientes pediátricos; Criptorquidia Idiopática; Cáncer Testicular de células Germinales; *c-KIT*; *AR*.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

La **Maestría en Ciencias Farmacéuticas** de la **Universidad Autónoma Metropolitana de la Unidad Xochimilco** pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del **CONACyT**, por lo que esta tesis contó con el apoyo de la beca No. 537316, para estudios de maestría otorgada al QFB. Daniel Adrian Landero Huerta con matricula 2132800225.

La realización de esta tesis se logró con el apoyo económico del Fondo Federal otorgado por el Instituto Nacional de Pediatría S.S. al proyecto general “Estudio molecular de la criptorquidia idiopática en un grupo de pacientes pediátricos mexicanos: correlación con variantes alélicas y miRNAs asociados al riesgo a seminoma” con número de registro 005/2014 del cual deriva la presente Tesis.

Este trabajo se realizó en el **Laboratorio de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Pediatría S. S.**, en la **Torre de Investigación “Dr. Joaquín Cravioto”** de la **Subdirección de Medicina Experimental**, bajo la dirección de la Dra. Margarita Dolores Chávez Saldaña con el apoyo interinstitucional del **Instituto Nacional de Cancerología S. S.** en colaboración con el Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo, y bajo la cotutoría de la Dra. Marisol López López y la asesoría de la Dra. Marisa Cabeza Salinas pertenecientes al **Departamento de Sistemas Biológicos** de la **Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco**.

Al posgrado en Ciencias Farmacéuticas por las facilidades y el apoyo otorgado durante la realización de este posgrado.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Con cariño, profunda admiración y gratitud a la **Dra. Margarita Dolores Chávez Saldaña**, quien me brindo uno de los regalos más preciados en mi vida personal y mi formación profesional. Gracias por darme la oportunidad de hacer lo que más amo en la vida, agradezco además la libertad que me ofreció y el haber tomado en cuenta mi opinión hasta en el más mínimo detalle.

Con admiración y respeto a la **Dra. Marisa Cabeza Salinas** a quien no tenía el privilegio de conocer y quien con sus clases me demostró la pasión por la investigación y docencia. A la **Dra. Marisol López López** quien me demostró que el trabajo sin compromiso no vale la pena, nunca lo olvidare.

Con cariño a la **Dra. Rosa María Viguera Villaseñor**, al **Dr. Julio Cesar Rojas Castañeda** y al **Dr. Francisco Jiménez Trejo**, por siempre contagiarme del entusiasmo por la investigación y por las observaciones e ideas que compartieron siempre conmigo.

Al **Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo**, por las observaciones realizadas, por permitirme trabajar en su laboratorio para la realización de este trabajo, además de darme la oportunidad de integrarme a su grupo.

Con cariño y gran admiración al técnico **Pedro Medina Granados**, el laboratorio de Biología de la Reproducción no sería lo mismo sin usted, gracias por enseñarme que el compromiso, el talento y la humildad son fundamentales en cualquier labor.

A mis amigos del laboratorio de Biología de la Reproducción Carlos Durand, Lucero Cortes, Iris Gallegos, Paola Montelongo, Edgar Cervantes, Cynthia Lecona, Ximena George, Mishael Patiño, Rocío Hermenegildo, Tania, Fabiola y Marlene, gracias por haberme acompañado en todos los momentos.

Finalmente agradezco a mi nueva familia de la MCF los quiero y admiro a todos especialmente a Cesar Gerardo Chable, Karen Rodríguez, Julia Falcón y Cesar Gasga, gracias por todos los momentos compartidos.

DEDICATORIA

Con admiración, gratitud y sobre todo con mucho compromiso para mi madre **Elisa Huerta**, día con día trato de no defraudarte, al contrario en medida de lo posible hago todo para que te sientas orgullosa. Madre, tu y yo sabemos lo complicada que es la vida, me has dado todo lo que has podido y a tus posibilidades, muchos tiene la fortuna ser ayudados en las tareas que no entienden por sus padres, tú sin embargo, no necesitaste más que saber lo que realmente importa y sin cuestionar me apoyaste en mis estudios, hiciste realidad mi sueño.

Teodoro Domínguez se te quiere mucho en verdad, ya te extrañábamos todos, gracias por ser el padre que siempre necesitamos mi hermano y yo. Me ilusiona mucho verte con mi madre nuevamente.

A mi hermano **Alejandro Landero** y a **Tania Villalpando**, gracias por hacerme el mejor de los regalos en estos días, ya soy tío de **Matías**. Hermano, sabes que cuentas mi apoyo incondicionalmente, mi madre me lo demostró a mí y en su momento eso mismo te lo transmitimos “no hay nada más fuerte que el ejemplo”, ahora te toca enseñárselo a tu hijo; serás un excelente padre.

A la **Dra. Margarita**, estaré eternamente agradecido con usted, gracias por entender que el cariño, el crecimiento personal y la gratitud no van de la mano con el apego, le prometo que seguiremos viéndonos, sé que algún día coincidiremos. Gracias por ser literal como mi segunda madre.

A **Omar Juan Lucas**, porque pese a todas las adversidades con las que nos hemos enfrentado sigues aquí, tú eres de las pocas certezas que tengo en la vida, tu madurez, inteligencia y tu nobleza es lo que me hace admirarte. Te amo.

“Nada en la vida debe ser temido, solamente comprendido.

Ahora es el momento de comprender más, para temer menos” **Marie Curie**.

ÍNDICE DE ABREVIACIONES

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AR: Gen del Receptor de Andrógenos

ARN: Ácido Ribonucleico

CGP: Célula Germinal Primordial

CISt: Carcinoma *in situ* Testicular

c-KIT: Oncogen v-kit Hardy-Zuckerman 4 de sarcoma felino viral

CO: Criptorquidia

CTCG: Cáncer Testicular de Células Germinales

DMSO: Dimetil Sulfóxido

FDA: Food & Drug Administration

HOXA10: Gen del Homodominio A10

INSL3: Péptido 3 Relacionado a la Insulina

LSC: Ligamento Suspensor Craneal

MIM: Herencia Mendeliana en el Hombre

OR: Riesgo Absoluto

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

RCBL: Solución de Lisis de Células Rojas

RR: Riesgo Relativo

RXFP2: Péptido del receptor 2 relacionado a la familia Relaxina/Insulina

SCF: Factor 1 de crecimiento celular

WCBL: Solución de Lisis de Células Blancas

ÍNDICE	PÁGINAS
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	2
3 MARCO TEÓRICO	2
3.1 CRIPTORQUIDIA	2
3.2 CÁNCER TESTICULAR	5
3.3 FACTORES GENÉTICOS ASOCIADOS AL CTCG	6
3.4 RECEPTORES TIROSINA CINASA	9
3.5 GEN <i>c-KIT</i>	10
3.6 RECEPTORES NUCLEARES	12
3.7 GEN <i>AR</i>	14
4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
5 HIPÓTESIS	15
6 OBJETIVOS	16
6.1 OBJETIVO GENERAL	16
6.2 OBJETIVOS PARTICULARES	16
7 MATERIALES Y MÉTODOS	16
7.1 CLASIFICACIÓN DEL ESTUDIO	16
7.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO	17
7.2.1 POBLACIÓN OBJETIVO	17
7.2.2 POBLACIÓN ELEGIBLE	17
7.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN	17
7.3.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN	17
7.3.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	17
7.4 ESTRATEGIA GENERAL	18
7.5 DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO	19
7.5.1 MUESTRAS BIOLÓGICAS	19

7.5.2 EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA	19
7.5.3 PURIFICACIÓN DE ADN	20
7.5.4 EXTRACCIÓN DE ADN DE TEJIDOS INCLUIDOS EN PARAFINA	20
7.5.5 EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL ADN	21
7.5.5.1 CUANTIFICACIÓN DEL ADN EXTRAIDO	21
7.5.5.2 INTEGRIDAD DEL ADN	21
7.5.6 ANÁLISIS POR DISCRIMINACIÓN ALÉLICA DE SNPs	22
7.5.7 ANÁLISIS DEL REPETIDO DE POLI Q EN EL GEN AR MEDIANTE PCR	
PUNTO FINAL	25
7.5.8 ANÁLISIS DE SECUENCIACIÓN	27
7.5.8.1 PURIFICACIÓN DE LOS AMPLIFICADOS DEL EXÓN 1 DEL GEN AR	27
7.5.8.2 REACCION DE SECUENCIACIÓN	28
7.5.9 TAMAÑO DE LA MUESTRA	29
7.5.10 ANÁLISIS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	30
7.6 DEFINICIONES OPERACIONALES	30
7.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	31
7.8 CONSIDERACIONES ÉTICAS	32
8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
9 CONCLUSIONES	45
10 REFERENCIAS	46
11 ANEXOS	49

1 INTRODUCCIÓN

A nivel mundial y en nuestro país, tanto la criptorquidia (CO) como el cáncer testicular de células germinales (CTCG) representan un problema de salud importante. El número de casos de criptorquidia registrados en el Instituto Nacional de Pediatría de la Secretaría de Salud es de 110 niños al año, en tanto que la incidencia de cáncer testicular en los últimos años va en aumento y en nuestro país se documenta que es de 9.6 por cada 100,000 habitantes. Debido a esto, surge la necesidad de conocer y diagnosticar oportunamente dichas patologías lo que sería de gran impacto en nuestro país ya que hasta la fecha no se cuenta con los datos epidemiológicos, ni con estudios a nivel molecular que apoyen la relación contundente de la aparición de criptorquidia con el riesgo de desarrollar cáncer testicular en edad adulta. Este estudio pretende contribuir con las bases del conocimiento científico que relacionen a nivel molecular a la criptorquidia idiopática, siendo ésta el defecto urológico más frecuente al nacimiento en los varones y el desarrollo de cáncer testicular de células germinales en jóvenes adultos, el cual ha tenido un incremento considerable en la incidencia y mortalidad en México. Esperando encontrar una asociación en ambos padecimientos mediante el estudio de variantes alélicas en los genes *c.KIT* y *AR* que ya han sido asociadas por diversos autores con las neoplasias testiculares, lo que permitirá proponer marcadores genéticos con una aplicación en el diagnóstico oportuno.

2 ANTECEDENTES

Actualmente tanto la criptorquidia como el cáncer testicular son problemas importantes de salud en México. El número de casos de criptorquidia registrados en el Instituto Nacional de Pediatría de la Secretaría de Salud es de 110 niños al año¹, en tanto que la incidencia de cáncer testicular en los últimos años va en aumento y en nuestro país se documenta que es de 9.6 por cada 100,000 habitantes². Debido a esto, surge la necesidad de conocer y diagnosticar oportunamente dichas patologías lo que sería de gran impacto en nuestro país ya que hasta la fecha no se cuenta con los datos epidemiológicos, ni con estudios a nivel molecular que apoyen la relación contundente de la aparición de criptorquidia con el riesgo de desarrollar cáncer testicular en edad adulta.

3 MARCO TEÓRICO

3.1 CRIPTORQUIDIA

La criptorquidia o testículo no descendido, (CO; MIM # 219050) es común y de gran trascendencia en la edad pediátrica debido a su frecuencia y a las posibles repercusiones que se derivan de esta enfermedad como la infertilidad y el cáncer testicular. La CO es una falla congénita, con una prevalencia variable entre una población y otra, reportándose una de las incidencias más altas en Dinamarca (9.0%) comparada con Finlandia (2.4%) en donde se ha detectado una de las incidencias más bajas³. En México, hasta la fecha no se cuenta con estudios epidemiológicos, por lo que la incidencia de la CO es desconocida, aunque a nivel mundial se reporta entre 2 y 10%, de acuerdo con estudios retrospectivos en niños a término con un peso normal⁴. Alrededor del 50% de los niños que presentan criptorquidia al nacimiento tienen descenso espontáneo durante los primeros 3 meses de vida, debido al incremento de testosterona endógena, disminuyendo así la incidencia entre el 0.9% y el 2% al año de edad^{4,5}. La CO puede presentarse de forma unilateral o bilateral y con base a la localización del testículo se clasifica en: (1) abdominal por arriba del canal inguinal, (2) inguinal y (3) ectópico, fuera de la vía normal del descenso⁴ como se muestra en la Figura 1.

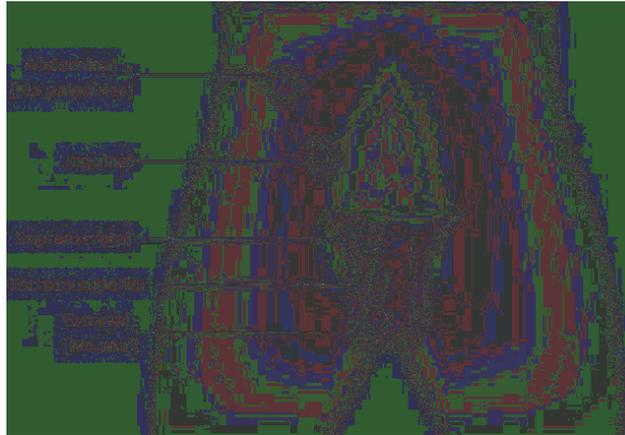


Figura 1. Vía normal del descenso testicular en el varón. (Modificado de Bay y cols, 2011)

En la etapa embrionaria, el testículo se ubica en el abdomen y posteriormente se desplaza hacia el escroto. En posición abdominal está suspendido por dos ligamentos, el que une el riñón a la gónada, llamado ligamento suspensor craneal (LSC) en humanos y el que conecta el testículo y el epidídimo al piso del escroto denominado gubernáculo. Hutson y Donahoe (1986) propusieron que el descenso testicular se presenta en dos fases denominadas transabdominal e inguinoescrotal. Durante la primera fase, el testículo se desplaza del abdomen hacia la zona inguinal, presentándose en el ser humano entre la semana 8 a la 17 de la gestación, la cual se ha propuesto dependiente de diversos genes, entre los que destacan *INSL3* y *RXFP2* provocando una regresión del ligamento suspensor craneal, mientras se abre el canal inguinal y se presenta un sobre crecimiento del gubernáculo por acumulación de agua. En la segunda fase, los testículos se desplazan de la región inguinal al escroto, durante la semana 26 a la 32 de gestación⁶⁻⁹ la cual es dependiente de testosterona provocando la involución del gubernáculo para poder depositar al testículo en la bolsa escrotal. En esta última fase, dicho evento ocurre con la finalidad de proporcionar al testículo una temperatura de 1.5 a 4.0°C menor que la temperatura corporal, lo que permite una espermatogénesis adecuada, así como una óptima función del epidídimo^{5,8-10} como se muestra en la Figura 2.

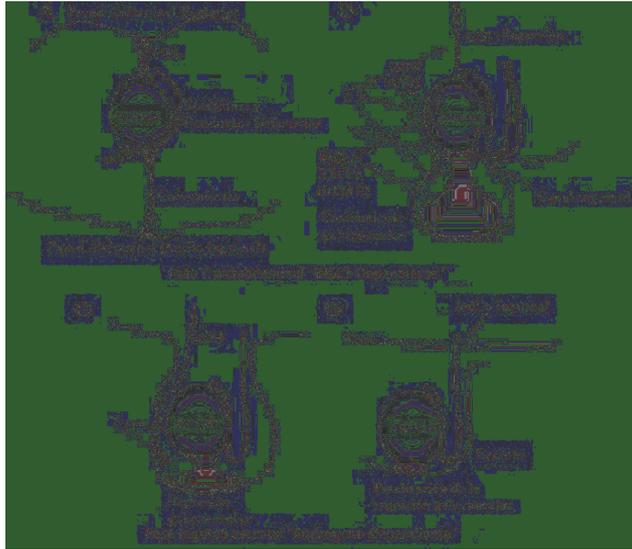


Figura 2. Fases del descenso testicular en el varón. (Modificado de Foresta y cols, 2008).

A pesar del amplio conocimiento de la fisiología testicular, la etiología de la CO se mantiene en gran medida desconocida, sin embargo, se considera una patología multifactorial en la que se han estudiado los mecanismos que regulan el descenso testicular^{10,11}, los cuales podrían verse afectados por distintos factores endócrinos, anatómicos y genéticos asociados al proceso de descenso testicular. Recientemente, se han estudiado profundamente los factores genéticos, desde etapas muy tempranas del desarrollo embrionario para una mejor comprensión de la fisiopatología de la enfermedad¹². Con base en su etiología, la CO puede presentarse como signo de alguno de los más de 250 síndromes ya sea cromosómicos o mendelianos, o como una CO aislada o idiopática^{4,11} (sin causa aparente). Se ha documentado que pacientes con CO presentan un incremento de riesgo de 7 a 10 veces más de desarrollar Cáncer Testicular de Células Germinales (CTCG) que la población general, además se sabe que en el caso de los individuos con CO unilateral, 1 de cada 4 casos de CTCG ocurre en el testículo contra lateral (testículo que descendió normalmente)¹³. La CO puede por tanto, ser el primer síntoma de una alteración futura en donde el CTCG y la infertilidad pueden ser las manifestaciones del mismo defecto¹⁴. Asimismo, se ha demostrado que el testículo con CO intrabdominal tiene mayor riesgo de desarrollar un cáncer y reducción del número de células germinales que el testículo que se aloja en el

canal inguinal.¹⁵⁻¹⁷ De la misma manera, el riesgo se incrementa en testículos bilaterales a diferencia de los unilaterales^{3,18-21}, aunque se ha demostrado en muchos pacientes con CO unilateral, que el testículo contra lateral que desciende normalmente es el que llega a presentar CTCG. Basados en estas observaciones, se infiere que existen factores genéticos compartidos que subyacen en la presencia de CTCG y CO.

3.2 CÁNCER TESTICULAR

El (CTCG; MIM # 273300), el cual se desarrolla en uno o ambos testículos, es una de las neoplasias genitourinarias que comprende una clase heterogénea de tumores malignos, clínicamente silenciosos en sus primeras etapas, en las que su tratamiento es exitoso, aunque se documenta con un índice significativo de morbilidad y mortalidad²².

El CTCG es el tumor sólido más frecuente de aparición temprana, generalmente se presenta en varones jóvenes, entre 15 y 45 años de edad, su incidencia ha ido en aumento en los últimos 30 años^{2,23,24}, aunque es muy variable en las diferentes poblaciones, reportándose altas cifras en países desarrollados^{25,26}, como en Escandinavia, Suiza y Alemania, sin embargo, en Estados Unidos y Gran Bretaña la incidencia es intermedia, en contraste con África y Asia donde el CTCG se ha reportado con una incidencia baja²⁶⁻²⁸. En el 2012 se estimó una incidencia a nivel mundial de 55,226 nuevos casos y se reportaron 10,351 pacientes que fallecieron a causa de esta enfermedad anualmente. En nuestro país, en el año 2012, el CTCG se reportó con una incidencia de 9.6 por cada 100,000 (1,602 casos) varones jóvenes y una tasa de mortalidad de 2.0 por cada 100,000 (347 casos)². Por lo que al hacer un comparativo de las incidencias a nivel mundial, el riesgo de presentar este tipo de neoplasia en hispanos/latinos es similar a países como Estados Unidos y Gran Bretaña²². En general, el riesgo a desarrollar CTCG es mayor en poblaciones caucásicas que en la población africana y asiática. Las razones del incremento en la incidencia y la disparidad racial del CTCG son desconocidas. Se ha postulado que el ambiente juega un papel importante, así

como también la contribución genética, específicamente el fondo genético de cada población a la susceptibilidad del CTCG^{23,24}.

Al igual que otros tipos de cáncer, los antecedentes familiares de CTCG aumentan el riesgo de presentar esta malignidad, por lo que se considera uno de los cánceres con una heredabilidad alta, así la proporción de susceptibilidad de CTCG por efectos genéticos se estima en un 25%. Hermanos de individuos con CTCG tienen de 8 a 12 veces más riesgo de presentar la enfermedad, mientras que el riesgo relativo de padres a hijos es 4 veces más. Este riesgo es mucho más alto que otros tipos de cánceres.^{29,30}

3.3 FACTORES GENÉTICOS ASOCIADOS A CTCG.

En los últimos años, se han realizado estudios en genética, basados en la búsqueda de biomarcadores del CTCG, con la perspectiva de revolucionar el campo del diagnóstico y tratamiento oportuno³¹. Se ha documentado en estudios epidemiológicos recientes una estrecha relación entre CTCG y CO, reportándose un riesgo relativo (RR) entre estos dos padecimientos de 5 a 10 veces, mientras que la población general tiene un riesgo de 2% de desarrollar CTCG, en tanto que en los pacientes con CO se eleva a 4%. Así, se ha visto que pacientes con CO presentan un OR de 4.30 con in IC del 95% (3.62-5.11).^{32,33}

Sin embargo, los mecanismos moleculares relacionados con el desarrollo y progresión del CTCG son aún desconocidos, aunque conocemos que el desarrollo de este cáncer está determinado por una serie de factores genéticos y ambientales que se presentan en diferentes etapas del desarrollo testicular, como la que ocurre durante la gestación y la etapa neonatal. Así se han documentado estudios de análisis de ligamiento y de asociación con genes candidatos, los cuales han identificado regiones genómicas importantes, que pueden conferir un riesgo o susceptibilidad para la presentación de CTCG³⁴. Recientemente, se han realizado estudios de asociación entre el CTCG y ciertos genes en los que han ubicado polimorfismos o SNPs (del inglés; *single nucleotide polymorphism*) que se asocian con el riesgo y susceptibilidad a presentar este tipo de cáncer [*c-KIT* 4q11-12 (D816H y D816V), *DMTR1* 9p24 (rs7040024 y rs755383), *KITLG* 12q21

(rs995030G/A, rs4474514 A/G y rs3782179 A/G) y *AR* Xq11-12 (rs12014709 Polimorfismo de poliQ's en el exón 1)], los cuales son considerados marcadores genéticos relevantes, que podrían ser estudiados en poblaciones de riesgo a CTGC como son los pacientes con CO³³⁻³⁵.

Hasta la fecha se han detectado múltiples factores genéticos involucrados en cada estado de desarrollo de CTGC, 1) en útero, en células germinales primordiales y gonocitos, 2) después del nacimiento, TIN, detectándose mutaciones en genes como: *KIT TP53, KRAS* y *NRAS*, además de alteraciones que afectan la sobre expresión del genes pluripotentes y 3) después de la pubertad, en cáncer testicular ce células germinales del tipo seminoma (sCTCG) y cáncer testicular de células germinales del tipo no seminoma (nsCTCG) como se muestra en la Figura 3.³⁶

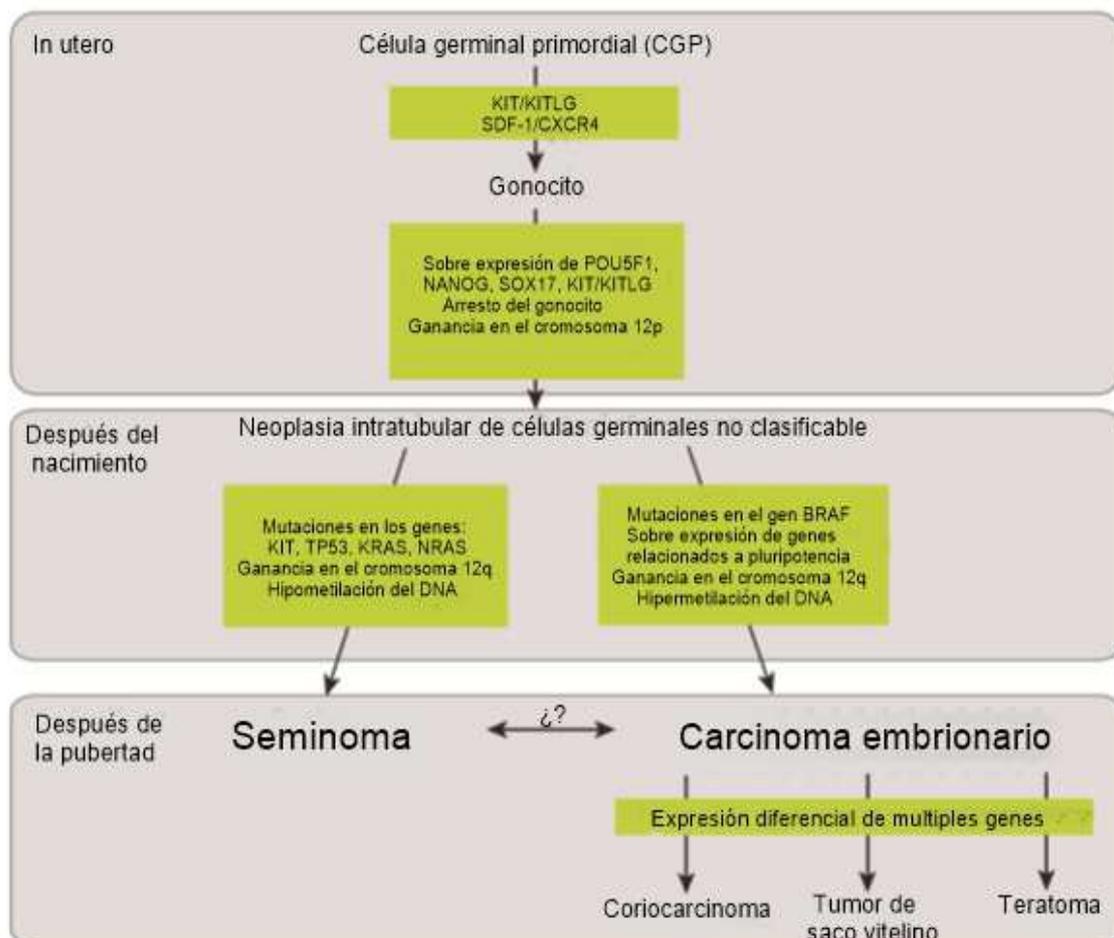


Figura 3. Genes y alteraciones relacionadas al desarrollo de CTGC. (Modificado de Sheikine y cols, 2012).

En este punto, es importante mencionar que a pesar de que ambos tipos de CTCG, tanto sCTCG y nsCTCG, parecieran tener una misma etiología, hay evidencias que las alteraciones a nivel genético, entre ellos son muy específicas. Port y cols en un estudio de expresión, reportó que casi el 90% de los genes fueron regulados de manera discordante entre sCTCG y nsCTCG, mostrando que en sCTCG la expresión de muchos genes es a la alta (muchos son genes que codifican para transductores de señales, relacionados con la síntesis de ADN, proliferación y reparación), en tanto que los nsCTCG han mostrado ser genes que se regulan a la baja³⁷.

La importancia de la correcta regulación de los genes implicados en la espermatogénesis es de suma importancia, ya que estos representan puntos críticos en el proceso de carcinogénesis. El gonocito tiene que regular a la baja la expresión de ciertos marcadores en etapas tempranas, de lo contrario genera células pluripotentes e indiferenciadas capaces de malignizar en testículo como proponen ciertos autores³⁸ (Figura 4). Por lo que la búsqueda de alteraciones a nivel molecular es de suma importancia.

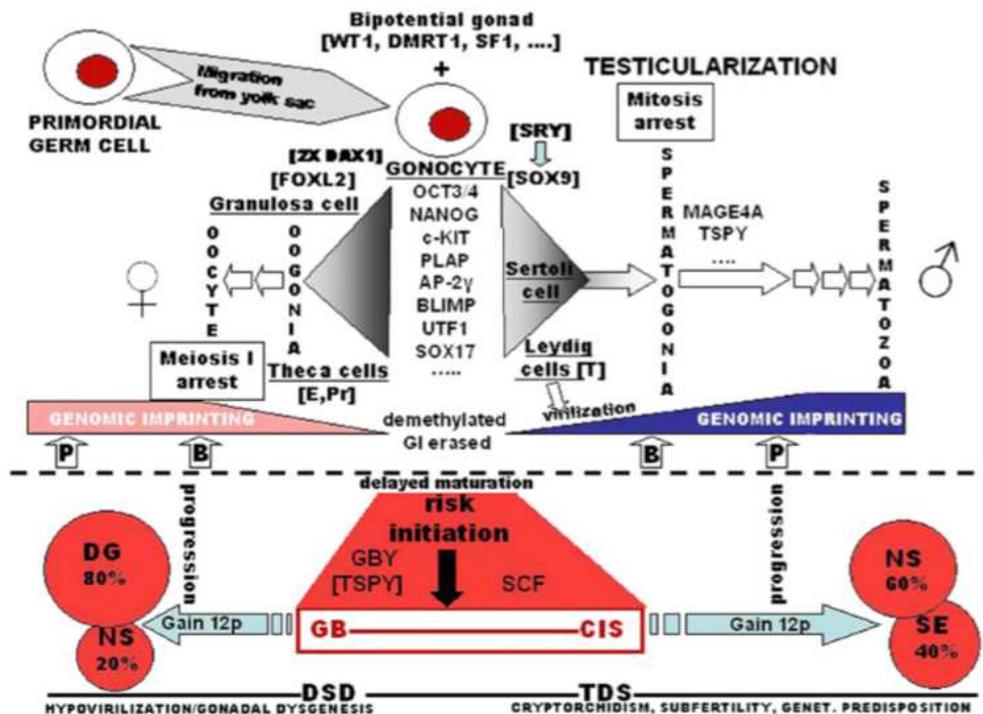


Figura 4: Esquema en el que se muestra los factores que tienen que ser regulados a la baja en la espermatogénesis. (Tomado de Leendert y cols, 2012).

3.4 RECEPTORES TIROSINA CINASA

Los receptores con actividad de tirosina cinasa son una familia de receptores celulares transmembranales. En el humano se han descrito 58 receptores diferentes los cuales se clasifican en 20 subfamilias³⁹ como se muestra en la Figura 5. Los factores de crecimiento se unen a este tipo de receptores para regular procesos celulares importantes como: la diferenciación, proliferación, supervivencia y migración celular, e incluso la apoptosis.

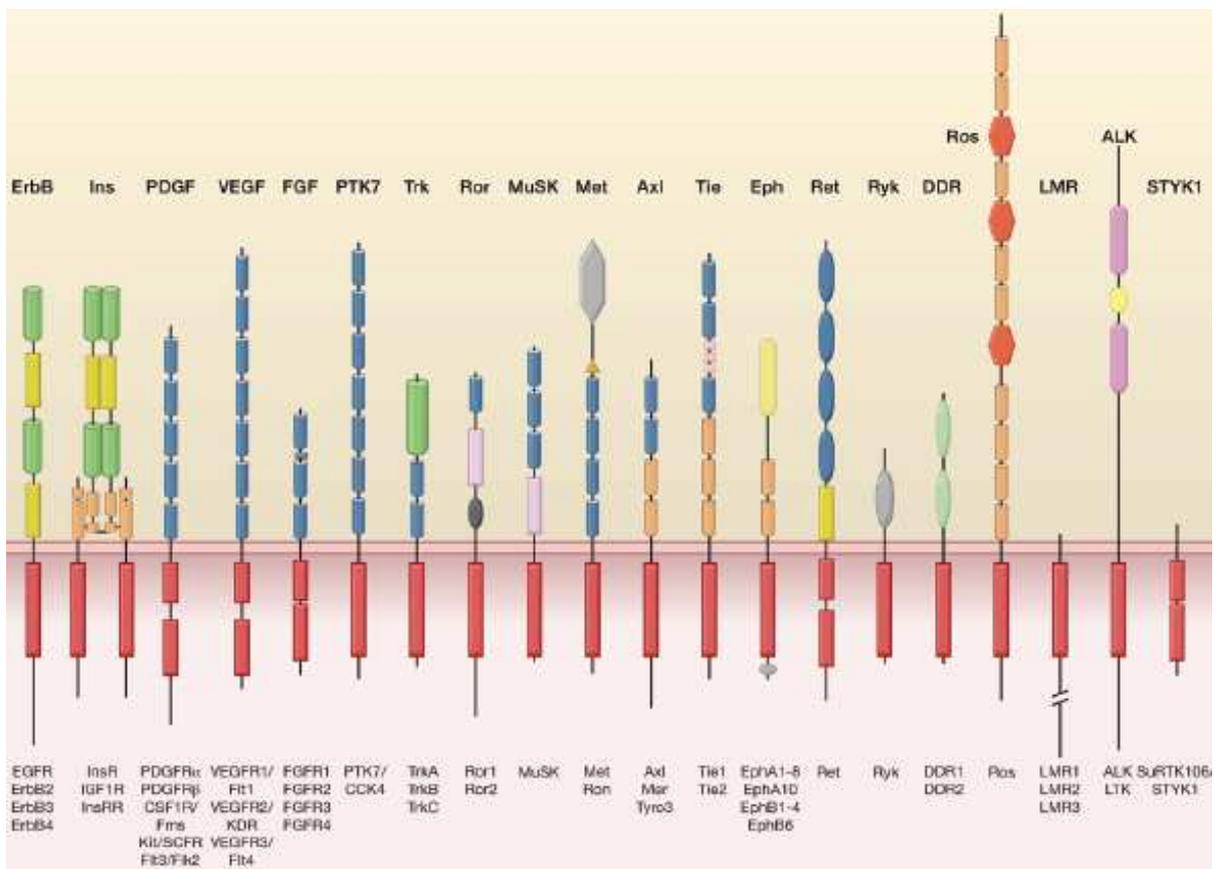


Figura 5. Clasificación de los receptores tirosina cinasa en humano en donde se muestran las 20 subfamilias descubiertas. (Tomada de Lemmon y Schlessinger, 2010).

El gen *c-KIT* codifica para el receptor con actividad de tirosina cinasa de tipo III. Este receptor es una proteína homodimérica constituida por 5 dominios (Figura 6a); se ha demostrado que entre los dominios D2 y D3 de este homodímero se une el factor 1 de crecimiento celular; conocido como *SCF* (por sus siglas en inglés).³⁹ La activación normal de este receptor (*c-KIT*) ocurre cuando dos moléculas de factor de crecimiento 1 se unen a los dos dominios de los receptores. Esta unión desencadena una actividad intrínseca de tirosina cinasa, como se muestra en la Figura 6b.³⁹⁻⁴¹

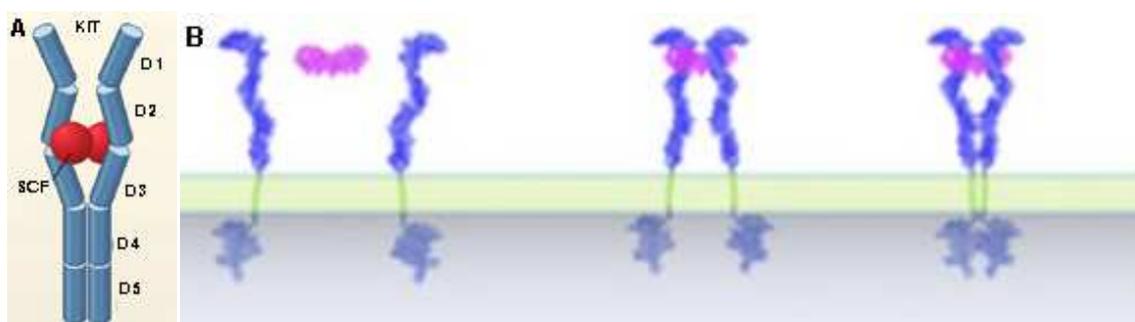


Figura 6. A) Dominios del receptor de tipo III de tirosina cinasa codificado por el gen *c-KIT*. B) interacción de las dos proteínas receptoras debido a la unión con su ligando (*SCF*) dimerizado. (Tomado de Heinrich, 2002).

El receptor de tirosina cinasa activado funciona como un sistema de transducción de señal hacia el interior de la célula lo cual es esencial para la sobrevivencia, migración y diferenciación de células germinales tempranas en el testículo. El gen *c-KIT* se expresa fuertemente en los gonocitos, tanto en las etapas fetales como en las pediátricas (mini pubertad), lo cual permite el establecimiento de una adecuada espermatogénesis en edad adulta.

3.5 GEN *c-KIT*

c-KIT es un proto-oncogen que juega un papel importante en la regulación fisiológica de la proliferación y diferenciación celular del gonocito, por lo que cambios en su conformación o expresión pueden promover transformación hacia la malignidad y la progresión tumoral de células germinales; *c-KIT* es el homólogo celular del oncogen *v-kit* Hardy-Zuckerman 4 sarcoma felino viral. En humanos, el gen *c-KIT* se localiza en 4 q11-q12 y tiene una longitud de 82,787 pb, codifica para

un receptor tirosina cinasa, participando en la espermatogénesis, hematopoyesis y melanogénesis⁴²⁻⁴⁵ (Figura 7).

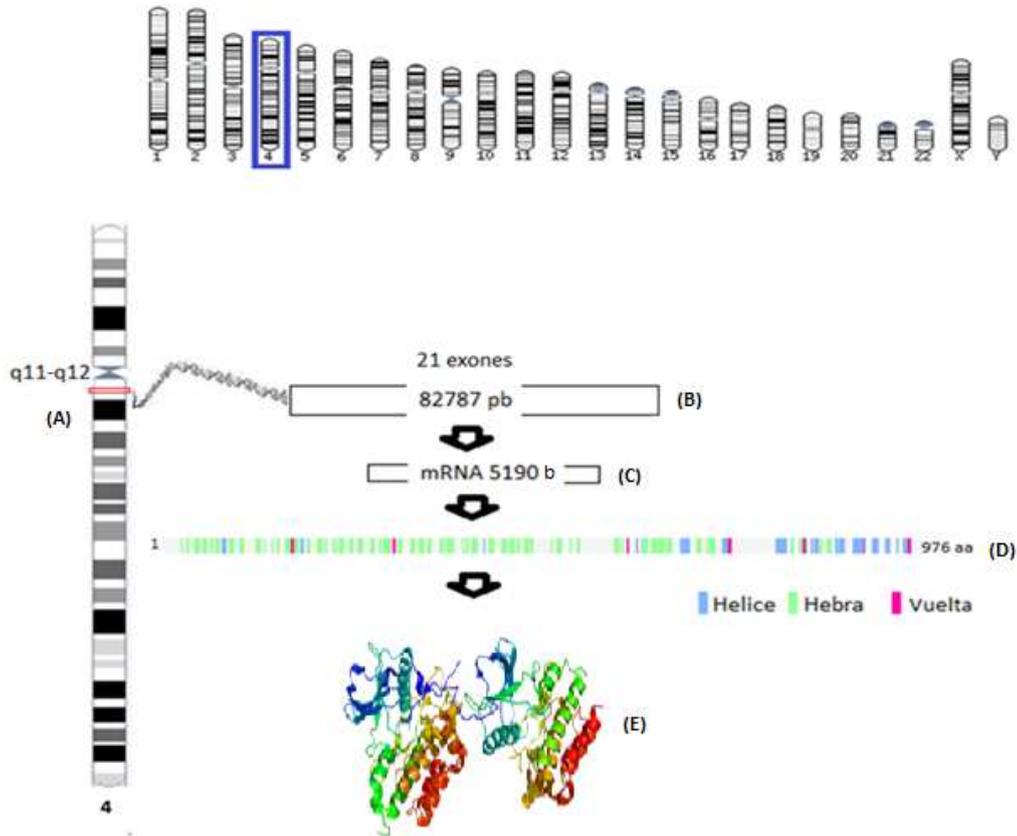


Figura 7. A) Localización del gen *c-KIT* B) Longitud del gen *c-KIT* humano. C) Representación del mRNA. D) Representación de la estructura secundaria del péptido resultante. E) El modelo hipotético 3D de la proteína *c-KIT*. (Modificado de [www. Gene Cards.org](http://www.GeneCards.org), [www. NCBI.nlm.nih.gov](http://www.NCBI.nlm.nih.gov), www.genename.or, www.rcsb.org, www.ensembl.org).

Algunas alteraciones de (*c-KIT*), tienen como consecuencia su activación de manera descontrolada⁴⁶. Hasta la fecha, se han registrado dentro del gen varios puntos susceptibles de presentar mutaciones; por ejemplo las mutaciones en los exones 9, 11, 13 y 17. En el exón 17 se han caracterizado las alteraciones D816V y D816H que han sido asociadas con el riesgo de desarrollar seminomas (CTCG) Diferentes estudios han demostrado la correlación existente entre el genotipo D816V y D816H y el fenotipo bilateral en pacientes con CTG. Estas variantes modifican la función catalítica del receptor con actividad de tirosina cinasa y por tanto, la especificidad por su ligando.⁴⁶⁻⁵¹ Es importante resaltar que este tipo de polimorfismos hasta la fecha no han sido demostrados en pacientes con

diagnóstico de CO idiopática que es un factor de riesgo importante para el desarrollo futuro de CTCG.

3.6 RECEPTORES NUCLEARES

El receptor de andrógenos (AR) forma parte de una súper familia de receptores nucleares activados por ligando (hormonas esteroidales sexuales masculinas) que inducen la estimulación de los factores de transcripción génica. Dichos factores son los responsables del desarrollo fenotípico del hombre durante la embriogénesis, las primeras etapas neonatales y la pubertad⁵¹.

Esta familia se divide en 4 grupos:

1. **Grupo I** de receptores esteroidales homodiméricos simétricos, que presentan un sitio de unión a ADN palindrómico.
2. **Grupo II** receptores heterodiméricos asimétricos (RXR) que presentan sitios de unión a pequeños repetidos de ADN.
3. **Grupo III** de receptores huérfanos diméricos, que están compuestos por dímeros asimétricos con un sitio de unión a pequeños repetidos de ADN.
4. **Grupo IV** de receptores huérfanos monoméricos con un sitio de unión core +5'.⁵² (Figura 8)



Figura 8. Clasificación de los receptores nucleares descritos en humano. (Tomado de Li y cols, 2009).

El AR es una proteína modular presente en el citosol, que se organiza en dominios funcionales; estos consisten en un dominio N-terminal de regulación (NTD), un dominio de unión a ADN (DBD), una pequeña región de bisagra (N) y un dominio de unión a ligando (LBD). La unión de este receptor con los andrógenos induce un

cambio conformacional en el AR lo que permite su translocación hacia el núcleo en forma de dímero (homodímero), incrementando en este momento su fosforilación. El complejo hormona-receptor formado se une al elemento de respuesta a andrógenos (ERA) presente en el ADN, mediante uniones de tipo dedos de zinc. La unión de este complejo con el ADN induce la unión de factores de transcripción que son esenciales para ensamblar la maquinaria transcripcional. Este sutil mecanismo regula la expresión de genes específicos para cada andrógeno unido (testosterona, dihidrotestosterona, androstendiona, androstandiona o androstandiol).^{52, 53} como lo muestra la Figura 9.

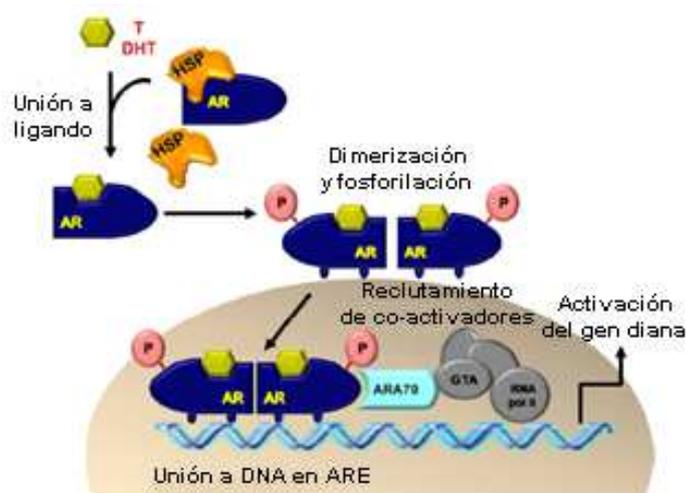


Figura 9. Activación del mecanismo de señalización en el receptor de andrógenos y la transcripción de genes modificadores de función. (Modificado de Gelmann, 2002).

Uno de los factores importantes para el desarrollo de cáncer testicular son los esteroides sexuales, que juegan un papel importante en el riesgo y la progresión del cáncer. La acción genómica clásica de los andrógenos es mediada por el receptor de andrógenos (AR), y la deficiencia de éste conduce al incremento del número de gonocitos durante el periodo fetal. Las células de carcinoma *in situ* testicular (CIS_t) expresan AR a diferencia de las células germinales normales en el varón adulto que no lo expresan. Otro de los postulados propone un proceso de desensibilización a andrógenos al estar alterado AR, lo que propone la presencia de niveles anormales de andrógenos en sangre en este tipo de pacientes.

3.7 GEN AR

El gen que codifica para el AR se localiza en Xq11-12 y se encuentra en una sola copia en los varones. Este gen contiene 8 exones los cuales equivalen a 186,588pb, que se transcriben de forma regulada por AR a un RNAm maduro de 2,759 b y es traducido a una proteína de 919 aminoácidos. El primer exón de AR codifica para el dominio N terminal, o región de regulación transcripcional de la proteína, los exones 2 y 3 codifican para el dominio de unión a ADN, mientras que de los exones 4 a 8 codifican para el dominio de unión al ligando⁵³ (Figura 10). Este gen induce las características fenotípicas propias del hombre.

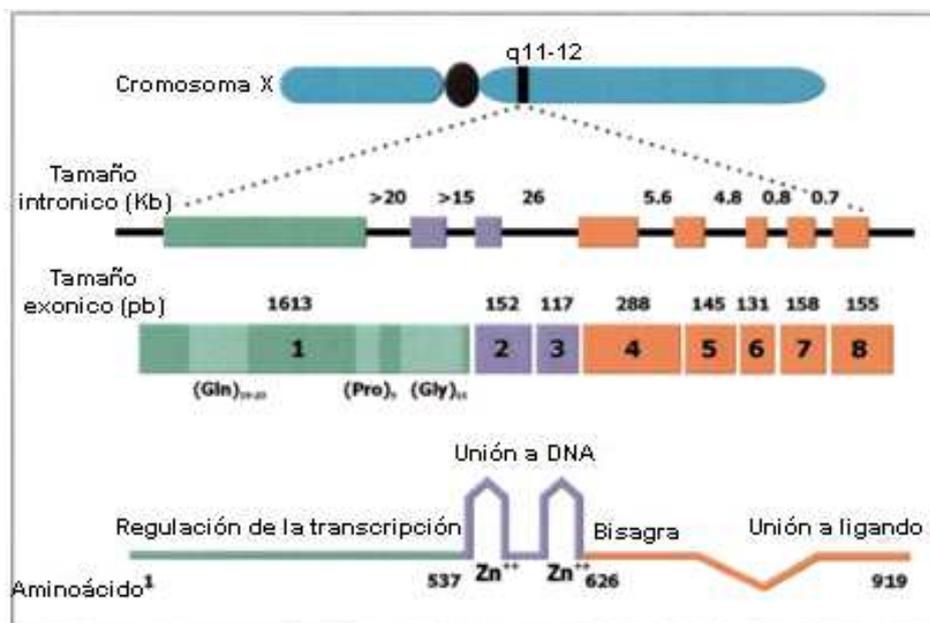


Figura 10. Localización y composición del gen AR y la estructura correspondiente de la proteína AR. (Tomado de Gelmann, 2002).

Una de las regiones más estudiadas del gen AR es el exón 1 debido a que es altamente polimórfico. Dentro de esta región, uno de los polimorfismos que han sido mejor caracterizados en los humanos es el repetido de poliglutamina (Poli Q), localizado en el dominio N terminal o región de regulación transcripcional. La región Poli Q es codificado por una secuencia repetida de bases CAG, la cual se correlaciona inversamente con la transactivación.

Existen individuos que presentan un mayor número de inserciones de CAG en el gen *AR* con la consecuencia de que baja la transactivación del *AR*, en estos individuos el nivel de andrógenos circulantes es alto debido a esta baja transactivación⁵⁴.

Por estas razones, se postula que la presencia de repetidos CAG en el exón 1, puede incrementar el riesgo de presentar CTCG y CO idiopática bilateral. Por otro lado, Västermark y cols. mostraron que la variante rs12014709 se asocia con un incremento en el riesgo de CTCG, a pesar de ser localizado en la región no codificante de este gen^{54,55}. Otros de los polimorfismos presentes en el exón 1 que ha sido relacionados con la presencia de CTCG, es el repetido de poliglicinas (Poli G), las sustituciones en A297T y P390S y la delección de una leucina en el codón 57^{56,57}.

4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La criptorquidia es el defecto congénito genitourinario que se presenta más frecuentemente en varones al nacimiento. Su incidencia varía entre las diferentes poblaciones, a nivel mundial se reporta una incidencia que oscila entre el 2 al 10%¹. En México no existen estudios sobre la epidemiología de la CO, aunque si es considerada como una anomalía urogenital frecuente y como uno de los factores de riesgo mejor documentado para el desarrollo de neoplasia testicular, que conduce al desarrollo de carcinoma *in situ* testicular, ya que incrementa de 7 a 10 veces el riesgo de desarrollar cáncer testicular de células germinales. Actualmente no existe evidencia a nivel molecular que relacione contundentemente a los dos padecimientos, por lo que es necesaria la búsqueda de marcadores genéticos de riesgo al desarrollo de CTCG en pacientes con CO.

5 HIPÓTESIS

Las variantes alélicas de los genes *c-KIT* y *AR* asociadas con el riesgo a cáncer testicular de células germinales estarán presentes en pacientes pediátricos mexicanos con criptorquidia idiopática.

6 OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar si los pacientes pediátricos mexicanos con criptorquidia idiopática presentan las variantes alélicas asociadas con riesgo de cáncer testicular de células germinales en los genes *c-KIT* y *AR*.

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar variantes alélicas de los genes *c-KIT* y *AR* en pacientes mexicanos con diagnóstico de cáncer testicular de células germinales y antecedente de criptorquidia idiopática.
- Determinar las variantes alélicas de los genes *c-KIT* y *AR* asociadas a cáncer testicular de células germinales en pacientes pediátricos mexicanos con criptorquidia idiopática del Instituto Nacional de Pediatría.
- Establecer la frecuencia de cada una de las variantes alélicas de los genes *c-KIT* y *AR* detectadas tanto en pacientes con cáncer testicular de células germinales con antecedentes de criptorquidia idiopática, pacientes pediátricos con criptorquidia idiopática y controles sanos.
- Comparar la frecuencia de las variantes alélicas de los genes *c-KIT* y *AR* detectadas en pacientes con CO idiopática y controles sanos.

7 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 CLASIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Clasificación de acuerdo a los ejes de trabajo

- Finalidad : Comparativa
- Secuencia temporal: Transversal
- Control de asignación de los factores de estudio: Observacional

Direccionalidad: Ambispectivo

7.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO

7.2.1 Población objetivo

Pacientes pediátricos mexicanos con diagnóstico confirmado de criptorquidia idiopática.

7.2.2 Población elegible

Pacientes pediátricos con diagnóstico de criptorquidia idiopática que hayan acudido o que acudan a recibir atención al Instituto Nacional de Pediatría de 2008 al 2015 y pacientes con diagnóstico de cáncer testicular de células germinales que hayan acudido o acudan a recibir atención al Instituto Nacional de Cancerología a partir de 2003 al 2015.

7.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN

7.3.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Pacientes provenientes de la república mexicana con ascendencia mínima de dos generaciones.
- Pacientes con diagnóstico de cáncer testicular de células germinales con antecedentes de CO idiopática.
- Pacientes con diagnóstico de criptorquidia idiopática.

7.3.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Se excluirán temporalmente a los pacientes que hayan sido transfundidos en los últimos tres meses.
- Pacientes con criptorquidia secundaria a procedimientos quirúrgicos previos.
- Pacientes con testículo retráctil o dudosamente criptorquídic.
- Con antecedente de cirugía inguinal.
- Pacientes con cualquier tipo de cáncer testicular secundario.
- Pacientes con cáncer testicular de células no germinales
- Pacientes con alguna otra anomalía genital.

- Pacientes con algún síndrome.
- Pacientes que no cuenten con carta de consentimiento y asentimiento informado

7.4 ESTRATEGIA GENERAL

La población de estudio se dividió en tres grupos: (1) pacientes de entre 15 y 45 años de edad, con diagnóstico confirmado de CTCG y con antecedentes de CO idiopática, provenientes de la consulta externa del servicio de Urología, del Instituto Nacional de Cancerología (INCan), el cual se planteó un número de pacientes por factibilidad, (2) pacientes pediátricos con diagnóstico de criptorquidia idiopática, uni o bilateral, inguinal o abdominal, referidos del Servicio de Urología del Instituto Nacional de Pediatría (INP) y (3) grupo control conformado por varones mexicanos pediátricos sin ningún tipo de cáncer, antecedentes de criptorquidia, alteraciones genéticas y genitourinarias o inguinales, estas muestras se colectaron del servicio de cirugía del INP.

(a) En todos los casos (casos y controles) se proporcionó una carta de consentimiento informado para pacientes menores a 12 años y en caso de varones mayores se entregó carta de consentimiento y de asentimiento informado, posterior a esto se efectuó una historia clínica completa, obteniendo los datos de edad al momento del diagnóstico, talla, peso, estado nutricional y árbol genealógico. (b) El estudio genómico a partir de sangre periférica se realizó en los 3 grupos de estudio y sólo cuando no se contó con la muestra se recurrió al tejido testicular incluido en parafina para el grupo 1. (c) El análisis estadístico se realizó mediante X^2 Pearson o prueba exacta de Fisher o mediante un ANOVA seguido de una prueba de Tukey, según el caso.

Algoritmo metodológico

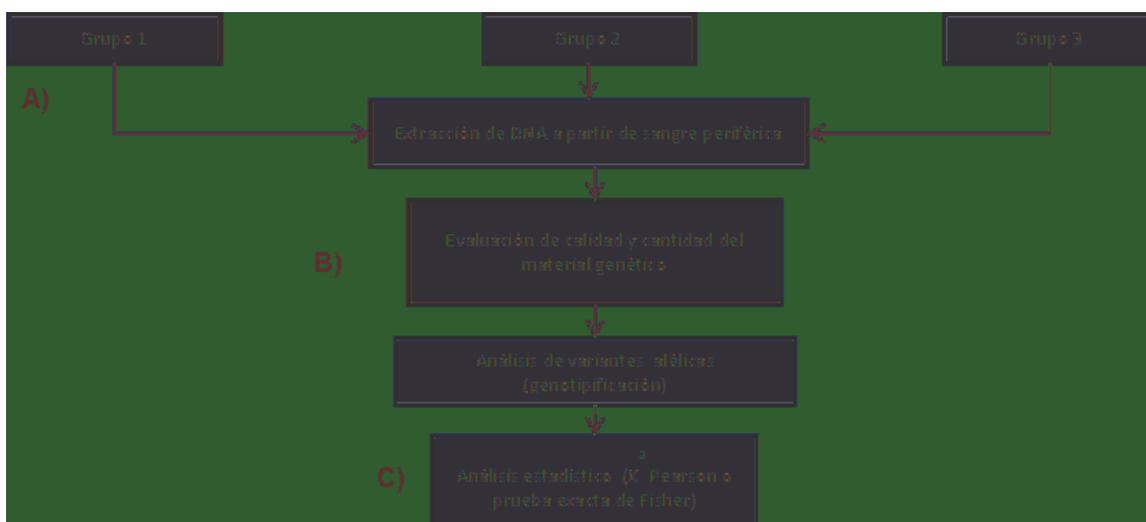


Figura 11. Estrategia general del trabajo.

7.5 DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO

7.5.1 MUESTRAS BIOLÓGICAS

El estudio molecular se realizó a partir de linfocitos de sangre periférica (usando tubos de 7 mL con EDTA como anticoagulante) en todos los grupos, con excepción del grupo 1, si no se contaba con la muestra de sangre periférica del paciente se recurría a la muestra de tejido testicular incluido en parafina.

7.5.2 EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA

La sangre periférica de los pacientes y controles se centrifugó por 30 minutos a 3,500 rpm, se tomó la capa de linfocitos, se colocó en 6 mL de solución para lisis de eritrocitos (RCBL), se desecharon el plasma y los eritrocitos, se agitó suavemente y se centrifugó por 10 minutos a 3000 rpm. El sobrenadante se eliminó y la pastilla se resuspendió en 6 mL de RCBL, se agitó suavemente y centrifugó por 10 minutos a 3000 rpm, este paso se repitió hasta eliminar toda la hemoglobina. Finalmente se resuspendió el botón de linfocitos en 333 μ L de RCBL con 1.5 mL de solución para lisis de linfocitos (WCBL) y se incubó toda la noche a 42°C para tener un lisado de linfocitos.

7.5.3 PURIFICACIÓN DE ADN

Se agregaron 2 mL de fenol al lisado obtenido en el paso anterior, se agitó suavemente por 10 minutos y se centrifugó durante 10 minutos a 3000 rpm, después la fase superior se transfirió a un tubo limpio sin tocar la interfase y se repitió el paso anterior. Posteriormente a la fase superior se le agregó 1 mL de fenol y 1 mL de cloroformo, se agitó suavemente y se centrifugó por 10 minutos a 3000 rpm, nuevamente la fase superior se transfirió a un tubo limpio sin tocar la interfase y se repitió el paso anterior. La fase superior se transfirió a un tubo limpio y se agregó 2 mL de cloroformo/isoamílico (24:1), se agitó suavemente y se centrifugó por 10 minutos a 3000 rpm. En un tubo limpio se agregaron 90 µL de NaCl 1M y 3 mL de EtOH absoluto a -20°C a la fase superior.

Se agitó suavemente hasta que precipitó el ADN, el cual se obtuvo con una pipeta Pasteur sellada, se secó por 10 minutos a temperatura ambiente, después se lavo con EtOH al 70% a -20°C, se dejó secar a temperatura ambiente una vez más y se resuspendió en 200 µL de H₂O destilada estéril. Se almacenó a 4°C hasta su uso.

7.5.4 EXTRACCIÓN DE ADN DE TEJIDOS INCLUIDOS EN PARAFINA

Se realizaron 4 cortes de 20 µm de grosor de tejido incluido en parafina para cada uno de los pacientes y se colocaron en micro tubos.

La extracción de ADN a partir de tejidos incluidos en parafina se realizó mediante el KIT FFPE ARN/ADN Purification Plus Kit de NORGEN BIOTEK CORP® mediante las especificaciones realizadas por el fabricante. Dicha extracción consta de dos pasos: desparafinación y purificación de ADN que incluye. (A) lisis del tejido. (B) unión del ADN a la columna. (C) lavado de la columna. (D) elución del ADN agregando 20 µL de H₂O estéril. Las muestras fueron almacenadas a -20°C para su uso posterior.

7.5.5 EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL ADN

7.5.5.1 CUANTIFICACIÓN DE ADN EXTRAÍDO

Para la cuantificación del ADN se tomó 1 μL de muestra y se registró la concentración a una longitud de onda (λ) de 260 nm, con el programa específico del equipo (nd-1000); la cantidad de ADN resultante se expresó en $\text{ng}/\mu\text{L}$, además de obtener la pureza con base en la relación 230 nm (longitud a la que absorben los alcoholes) y 280 nm (longitud de onda a la que absorben las proteínas) mediante un NanoDrop ND-1000 de Thermo Fisher Scientific®. La pureza del ADN se calculó por medio del cociente obtenido de las lecturas 230/260 y 280/260 nm. Una vez hecha la cuantificación de cada muestra se realizó la dilución de trabajo a una concentración promedio de $200\text{ng}/\mu\text{L}$, creando así un banco de ADN de solución de almacenamiento y solución de trabajo.

7.5.5.2 INTEGRIDAD DEL ADN

Se confirmó la integridad del ADN por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1% el cual fue teñido con bromuro de etidio. Una vez preparado el gel, se realizó una mezcla 2.5 μL de muestra con 1.5 μL de amortiguador de carga (colorante azul de bromofenol-xilencianol (0.05%: 0.05%). El gel se corrió a 100 volts por 30 minutos y finalmente se visualizó en un transiluminador Benchtop UV Transilluminator UVP (Figura 12)

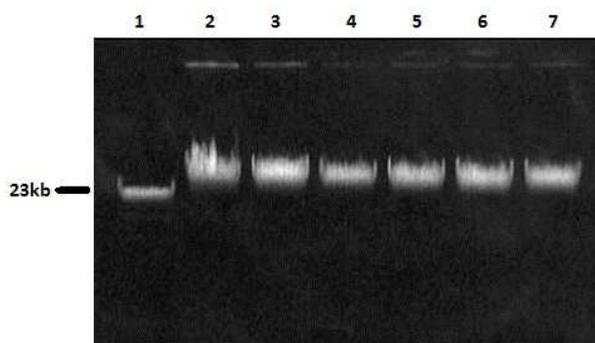


Figura 12. ADN extraído de linfocitos a partir de sangre periférica. Gel de agarosa al 1% muestra la presencia de ADN íntegro. Carril 1: contiene el marcador de peso molecular λ -Hind III; carriles 2-7 muestran la presencia de ADN genómico íntegro.

7.5.6 ANÁLISIS POR DISCRIMINACIÓN ALÉLICA DE SNPs

Se realizó la búsqueda de polimorfismos con cambio de un sólo nucleótido (SNPs): D816V y D816H (del gen *c-KIT*) y P390S y A297T (del gen *AR*), mediante discriminación alélica 5´exonucleasa TaqMan® (Applied Biosystems). Estos SNPs son polimorfismos que fueron seleccionados por estar documentada su asociación con CTCG por diversos autores (Tabla 1);

TABLA 1. LOCI PROPUESTOS PARA *c-KIT* Y *AR*

Gen	Localización	Variantes	Número de pacientes estudiados	Frecuencia (%)	OR de SNP's	Población de estudio
<i>c-KIT</i>	4q11-12	D816H	34	3(1)		Oriental
		D816V	34	5.9(2)		Oriental
<i>AR</i>	Xq11-12	rs12014709	367	9.8(36)	OR 2.07, 95% CI 1.03- 4.15	Suecia

www. Gene Cards.org

De estas variantes se realizó la búsqueda dirigida, previamente verificando en bases de datos especializadas (GEN BANK y Ensembl) para corroborar su presencia en la secuencia nucleotídica de cada gen. En el caso de cada polimorfismo se diseñaron dos sondas específicas, tomando en cuenta la secuencia de la cadena sencilla de cada variante alélica, éstas fueron marcadas en el extremo 5´ con fluorocromos diferentes, VIC para el alelo 1 o normal (sonda 1) y FAM para el alelo 2 o alterado (sonda 2), además ambas sondas tuvieron en el extremo 3´ un *quencher* (TAMRA) el cual mientras la sonda permanece intacta, inhibe la emisión de fluorescencia.

Las sondas se colocaron en una mezcla de reacción a 5µl como se indica en la Tabla 2, utilizando un Termociclador Step One Real-Time PCR System de Applied Biosystems.

Tabla 2. Condiciones de la mezcla para discriminación alélica de las variantes alélicas a analizar.

REACTIVO	VOLUMEN
Universal. PCR MASTER MIX	2.5 μ L
SONDA	0.0625 μ L
H ₂ Odd	0.4375 μ L
ADN	2.0 μ l=200ng/ μ L
Volumen final	5.0 μ L

El reactivo TaqMan® Universal Master Mix de Applied Biosystems, contiene la enzima AmpliTaq Gold® ADN Polimerasa necesaria para la detección de los polimorfismos, ya que esta enzima tiene actividad tanto de ADN polimerasa como de exonucleasa 5´-3´, lo que la hace capaz tanto de ir agregando bases para la síntesis de la cadena correspondiente como de digerir la sonda marcada que ha sido hibridada con su cadena molde durante la amplificación y de esa manera liberar el fluorocromo de la acción inhibitoria de fluorescencia que realiza el *quencher* sobre la sonda. (Figura 13).

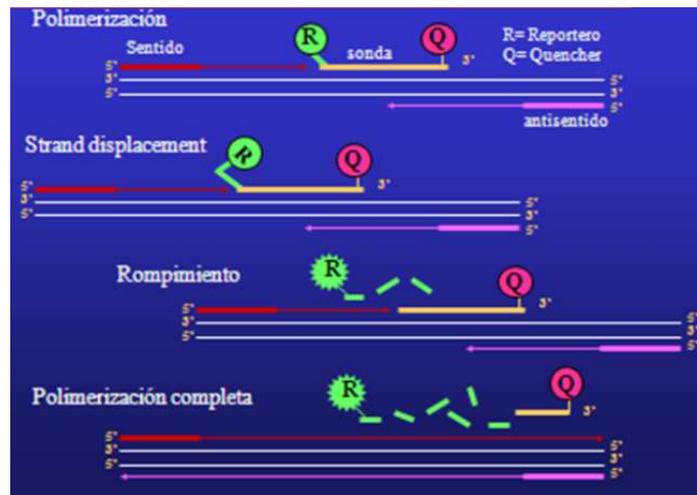


Figura 13. Método de fluorescencia de 5' exonucleasa (TaqMan®) para determinación de polimorfismos por discriminación alélica. (Tomada del manual de Applied Biosystems).

De tal manera que dadas las condiciones de exigencia utilizadas durante la reacción, sólo la sonda específica para el polimorfismo presente será capaz de hibridar. Por lo tanto es posible diferenciar un alelo del otro con base al tipo de fluorescencia emitida y al mismo tiempo identificar pacientes con sus dos alelos normales, alterados e inclusive aquellos individuos que presentan fluorescencia para ambos fluorocromos (heterocigoto) (Figura 14).

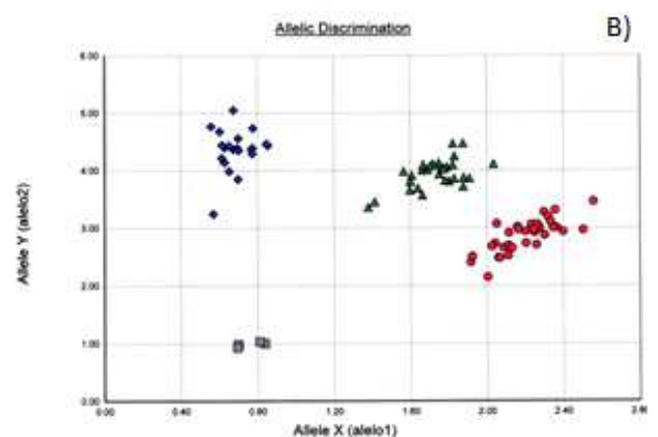
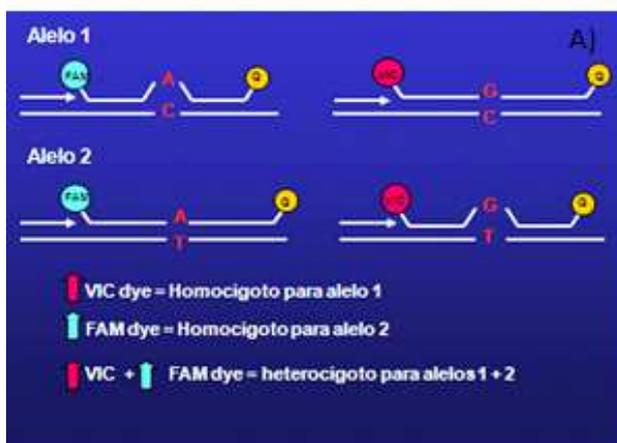


Figura 14. A) Hibridación de la sonda y liberación de fluorocromo debido a la acción de la enzima AmpliTaq Gold DNA polimerasa. B) Detección de las emisiones de las fluorescencias de los alelos de cada una de las muestras. (Tomada del manual de Applied Biosystems).

7.5.7 ANALISIS DEL REPETIDO DE POLI Q EN EL GEN AR MEDIANTE PCR PUNTO FINAL

Se sintetizaron un par de oligonucleótidos para la amplificación de un segmento del exón 1, en el cual se localiza una serie de inserciones o tracto de poliQ; estos fueron diseñados de acuerdo a las secuencias del gen *AR*.⁵⁷ Para llevar a cabo la reacción fue necesario: los cebadores (oligonucleótidos), el ADN molde (correspondiente a cada muestra), enzima polimerasa (Taq Gold ADN polimerasa), cloruro de magnesio ($MgCl^{+2}$) que actúa como un cofactor de la polimerasa y su concentración ayuda a dar especificidad a la reacción, deoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), un amortiguador de reacción específico para que la enzima realice adecuadamente su función y DMSO debido a la alta concentración de CG en la secuencia a amplificar ya que interfiere en la formación de enlaces hidrógeno entre ambas cadenas. El proceso de amplificación se llevó a cabo con un volumen final de mezcla de reacción de 25 μ L como se indica en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de la reacción de PCR punto final para el exón 1 del gen *AR*.

REACTIVO	VOLUMEN
Amortiguador	2.5 μ L
MgCl ₂	2.5 μ L
dNTPs (Nucleótidos)	1.0 μ L
Oligonucleótido Sentido	1.0 μ L
Oligonucleótido anti sentido	1.0 μ L
Taq polimerasa	0.5 μ L
DMSO	1.5 μ L
H ₂ O	15.0 μ L
Volumen final	25.0 μ L

La reacción de PCR punto final se basa en la replicación rápida de material genético que nos permite amplificar selectivamente un segmento específico de ADN. En su forma más simple se realiza mediante tres pasos o etapas sucesivas llevadas a cabo a distintas temperaturas; cada una de estas tres etapas se repite cíclicamente 40 veces (Figura 15). La primera etapa, denominada desnaturalización, donde se eleva la temperatura a 95°C, la segunda etapa se disminuye la temperatura a 60°C para permitir la “hibridación” o “alineación” de los cebadores, por último se eleva la temperatura a 72°C para que la enzima ADN polimerasa (Taq polimerasa) sintetice la cadena de *ново*.

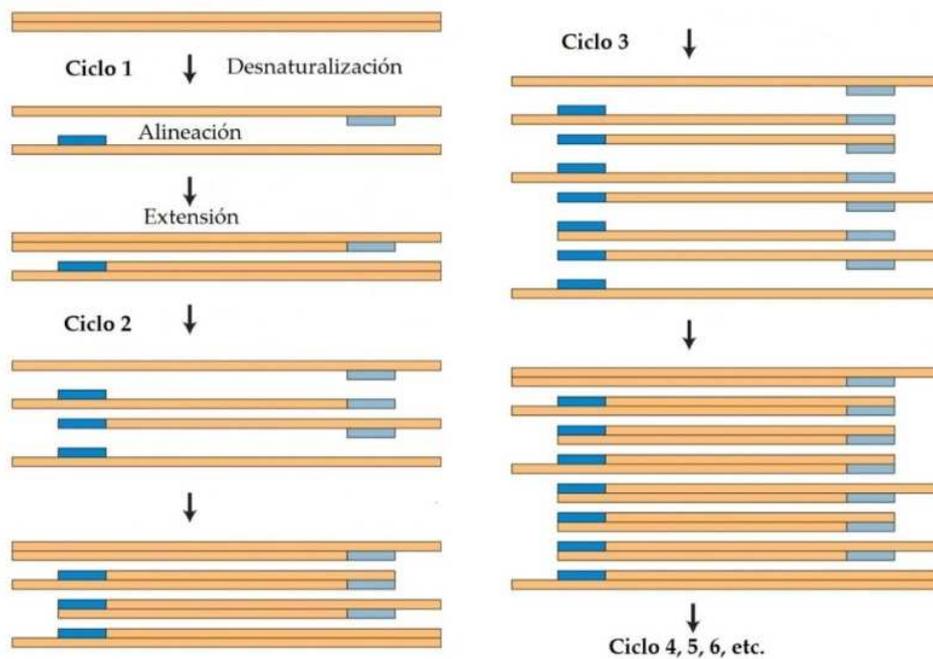


Figura 15. Esquema del PCR punto final en el cual se pueden observar las tres etapas o pasos del primer ciclo y en seguida se muestra la manera en la que exponencialmente van aumentando los amplificadas., (Modificado de Lodish y cols., 2005).

La amplificación del exón 1 se realizó bajo el siguiente protocolo (Figura 16), utilizando un termociclador GeneAmp® PCR System 2700 de Applied Biosystems.

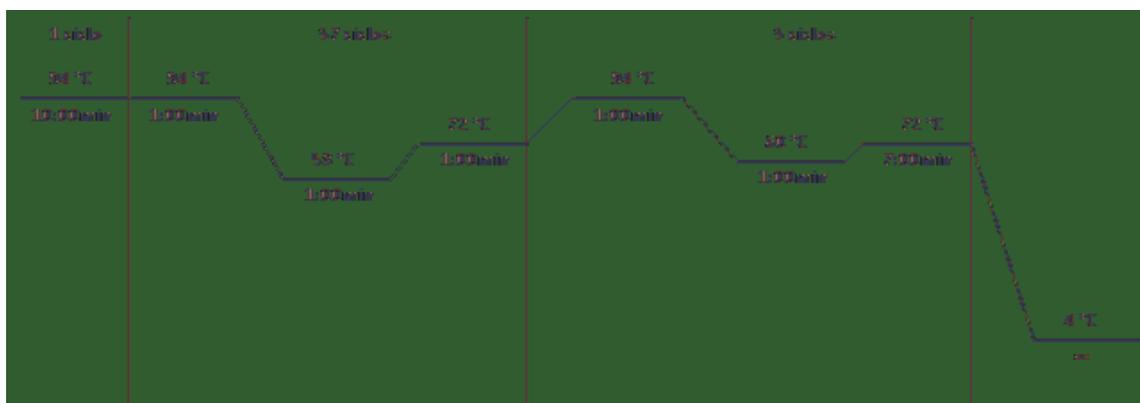


Figura 16. Diagrama del programa de PCR punto final para la amplificación del exón 1 de AR tomado de Ferlin y cols, 2005.

El tamaño de los amplificados fueron corroborados mediante una electroforesis a 80 volts en un gel de agarosa al 2.5%, teñido con bromuro de etidio y observados en un transiluminador de luz U.V. verificando así los tamaños de los amplificados, de acuerdo a las secuencias del par de oligonucleótidos para el exón 1 se obtuvo un amplificado con un peso de 231pb.

7.5.8 ANÁLISIS DE SECUENCIACIÓN

7.5.8.1 PURIFICACIÓN DE LOS AMPLIFICADOS DEL EXON 1 DEL GEN AR

Las muestras resultantes de la reacción de secuenciación se purificaron tomando 20 μ L del producto de PCR y se colocaron en un micro tubo estéril, donde se realizó una mezcla de reacción con 20 μ L de H₂O libre de ADNAs, 60 μ L de isopropanol grado molecular, se agitó durante 2 segundos y se dejó a temperatura ambiente durante 12 min; posteriormente la mezcla se centrifugó a 13000 rpm por 12 minutos desechando el sobrenadante, se lavó el micro pellet con 200 μ L de etanol al 70%, agitando suavemente y centrifugándolo durante 8 min a 13000 rpm. Se eliminó nuevamente el sobrenadante y se dejó secar en una placa de calentamiento durante 10 min a 42°C. Después de este proceso, se diluyó el micro precipitado en 10 μ L de agua estéril y se corroboró la purificación a través de una electroforesis con un gel de agarosa al 2.5%, en el cual se visualizaron nuevamente los amplificados.

7.5.8.2 REACCIONE DE SECUENCIACIÓN

Las reacción de secuenciación se realizaron en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), se empleó un secuenciador automático Perkin Elmer modelo 310, versión 3.0 ABI-CE1, con el KIT *Big Dye Terminators v3.1 Cycle Sequencing Kit* de Applied Biosystems. La reacción se basa en el método de dideoxynucleótidos, el cual consiste en la síntesis *in vitro* de ADN catalizada por la enzima ADN polimerasa y que puede ser interrumpida controladamente por la adición al azar de un dideoxynucleótido (ddNTP). Los dideoxynucleótidos son deoxynucleótidos que a los que les falta un grupo OH en las posiciones 2' y 3' y por lo cual no pueden unir a otros nucleótidos, por lo tanto no se puede continuar con la extensión de la cadena. Es decir, actúan como terminadores de la cadena (Sanger F. R., 1977). La mezcla de reacción para la secuenciación fue como se indica en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de la reacción para la secuenciación del exón 1 del gen *AR*.

Reactivo	Cantidad
<i>Big Dye Sequencing Buffer</i> (5X)	0.75 μ L
<i>Big Dye Ready Reaction Mix</i> *	0.5 μ L
ADN (producto purificado de PCR)	1 μ L (3-10ng/ μ L)
Oligonucleótido sentido o antisentido)	0.5 μ L
H ₂ O desionizada	7.25 μ L
Volumen Final	10 μ L

El reactivo *Big Dye Ready Reaction Mix** contiene: dNTPs, ddNTPs (ddG, ddT, ddA y ddC), y el *Big Dye Sequencing Buffer* (5X) contiene; AmpliTaq ADN Polimerasa, MgCl₂ y amortiguador Tris-HCl.

El programa que se empleó para la reacción en el termociclador 9600 de Perkin Elmer fue el siguiente (Figura.17):

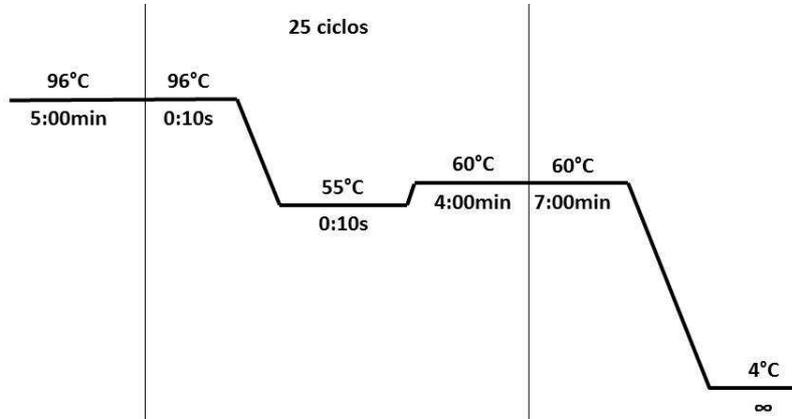


Figura 17. Programa utilizado para el termociclador 9600 de Perkin Elmer.

Nuevamente el producto obtenido de reacción se purificó mediante el protocolo anteriormente establecido y seguido a esto las muestras se resuspendieron en 21 μ l de formamida y se llevaron a 95°C durante 8 minutos, finalmente se preparó la placa y se colocó en el equipo para su secuenciación.

Las secuencias obtenidas de la amplificación fueron comparadas con la secuencia del gen *AR* con los datos de la secuencia del gen *AR* de tipo silvestre registrados en el GenBank para la determinación de polimorfismos o variantes alélicas.

7.5.9 TAMAÑO DE LA MUESTRA

El cálculo del tamaño de la muestra para el grupo I fue por factibilidad, dado que al hacer una revisión exhaustiva de historias clínicas en el Instituto Nacional de Cancerología de 6 años atrás (a partir del 2007) se detectaron 150 casos de pacientes con CTCG de los cuales únicamente 5 de ellos presentaron CTCG y antecedentes de CO, sin embargo, para aumentar el tamaño de muestra de éste grupo se planteó hacer otra búsqueda de tejidos en el Servicio de Patología a partir de expedientes captados de los años 2003 al 2015, lo que permitió ampliar el tamaño de la muestra.

En relación al tamaño de la muestra para el grupo 2 y 3, se tomó en cuenta las frecuencias de las variantes alélicas reportadas en la literatura en diferentes poblaciones estudiadas (Tabla 1). Este cálculo se realizó tomando en cuenta la frecuencia más alta de uno de los estudios citados (ya que todos estos fueron realizados en grupos poblacionales y tamaños de muestra diferentes) para así obtener con base en un concepto teórico de la máxima determinación para el cálculo de sujetos necesarios para la estimación de una proporción (variable cualitativa), con un nivel de precisión de $\pm 4\%$ ($i=0.04$) y un nivel de significancia del 95% con una proporción esperada de 0.05; $Z_{\alpha(2)}= 1.96$, el cual arrojó una $n= 212$ pacientes con criptorquidia y 212 controles⁵⁸.

7.5.10 ANÁLISIS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se realizaron dos bases de datos para las poblaciones de interés (pacientes pediátricos con diagnóstico confirmado de CO idiopática y pacientes con diagnóstico confirmado de CTCG y antecedentes de CO idiopática), recabándose los datos propuestos mediante la revisión de expedientes clínicos en versión electrónica y física en ambos institutos para corroborar los datos obtenidos.

7.6 DEFINICIONES OPERACIONALES

1. **Criptorquidia:** testículo permanentemente por arriba del anillo inguinal externo, no descendible al escroto con maniobras bimanuales, o no palpable (detectado mediante ultrasonido abdominal).
2. **Cáncer Testicular de Células Germinales:** es un tipo de cáncer de testículo que se origina del epitelio germinal de los túbulos seminíferos.
3. **Idiopático** se define como la afección o enfermedad de la cual se desconoce su causa (esto no quiere decir que no la tenga, sino que no ha podido ser identificada).
4. **Grupo control:** sin criptorquidia ni alteración genitourinaria, inguinal, oncológica o con cualquier otra patología referida en los criterios de exclusión.
5. **Variante alélica o polimorfismo:** Cambios genéticos comunes en la población general, ocurriendo en más del 1% de la población y que no son capaces de producir enfermedad.

6. **Paciente mexicano:** Nacido en la República Mexicana con al menos 2 generaciones (padres y abuelos), igualmente nacidos en México, por rama paterna y materna.
7. **Genotipificación:** Caracterización de los genotipos de los genes incluidos en el estudio como se describe en la metodología.

7.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

EL análisis estadístico se realizó con el apoyo del programa SPSS® versión 20.0, en el que se desarrolló la base de datos donde se capturaron los resultados obtenidos; antes del análisis se verificó que no existieran datos erróneos con la ayuda de la búsqueda de valores extremos, los valores perdidos quedaron excluidos del análisis de manera individual. Se presentaron los resultados clínicos y moleculares mediante la realización de estadística descriptiva contemplando:

- Medidas de tendencia central y de dispersión para las variables cuantitativas, así como pruebas de normalidad.
- Proporciones para las variables cualitativas
- Se realizaron tablas, así como gráficas de barras para las variables cualitativas e histogramas para variables cuantitativas.

Para cumplir con los objetivos analíticos se realizó un análisis bivariado donde se compararon las variables numéricas con las variantes alélicas de los genes. La significancia se probó mediante una prueba de U de Mann-Whitney. Por otro lado se construyeron tablas de contingencia de 2x2, tomando como variable predictiva la presencia o ausencia de variantes de riesgo o protección y como desenlace las variables categóricas, probando su significancia mediante la prueba exacta de Fischer. En cualquier caso se consideró significativa una $p \leq 0.05$. Posteriormente se dividió a los pacientes con base en el genotipo de cada una de las variantes alélicas y se realizó la prueba de Mantel y Hansen para estratificados.

7.8 CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente estudio cumplió con lo estipulado en el título segundo del Reglamento de La Ley General de Salud en materia de investigación para la salud, según esta ley vigente en nuestro país el estudio corresponde a la categoría II, es decir, investigación con riesgo mínimo, ya que además de la exploración, se tomó una muestra única de 5-10 mL de sangre periférica por punción venosa, que es un procedimiento común en exámenes de diagnóstico rutinario.

A los pacientes y familiares se les explicó las características y objetivos del estudio especificando las ventajas, desventajas y posibles riesgos para los participantes. La información obtenida de los pacientes durante el estudio se mantuvo con estricta confidencialidad. Se debe destacar que la planeación, el desarrollo, el manejo de resultados y la interacción entre investigadores y pacientes se mantuvo en estricto apego a la Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los derechos humanos promulgada por la UNESCO.

Los individuos control, pacientes adultos con CTCG y los pediátricos mayores de 12 años con CO idiopática firmaron una carta de asentimiento informado, mientras que los padres de los pacientes y controles menores de 12 años firmaron una carta de consentimiento informado. Es importante mencionar que se contó con un banco de ADN de la línea de investigación iniciada en 2008 por la Dra. Margarita Dolores Chávez Saldaña en el laboratorio de Biología de la Reproducción, productos de un proyecto previo (Registro de proyecto INP 63/2008-2012, con registro en CONACyT 87101), el cual se utilizó para realizar este protocolo. En su momento se solicitó la carta de asentimiento y consentimiento informado para que las muestras correspondientes fueran incluidas en este estudio. Además cabe aclarar que la toma de muestra en el grupo 1 se realizó con el asentimiento informado del mismo paciente y en caso de fallecimiento se solicitó el consentimiento de los familiares de primer grado.

8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el estudio se incluyeron 13 pacientes con CTCG y antecedentes de CO (grupo 1), 85 pacientes con diagnóstico confirmado de CO idiopática aislada (grupo 2) y 137 casos controles sanos (grupo 3).

De los pacientes del grupo 1 se observó que la edad promedio al diagnóstico de CTCG fue de 24.3 años de edad y una edad promedio de diagnóstico de CO idiopática fue de 19.7 edad, en la Tabla 5 se muestran los datos descriptivos de este grupo de estudio.

Tabla 5. Datos relevantes de pacientes con cáncer testicular de células germinales y antecedentes de criptorquidia idiopática

Variables	Categorías	
Tipo de Criptorquidia	Bilateral (53.8%)	Unilateral Izquierda (23.1%) Unilateral Derecha (23.1%)
Realización de la orquidopexia	Si (38.5%)	No (61.5%)
Localización del tumor	Bilateral (7.7%)	Unilateral Izquierda (30.7%) Unilateral Derecha (61.6%)
Estadio clínico al diagnóstico	I y II (84.6%)	III y IV (15.4%)
Metástasis	Si (53.8%)	No (46.2%)
Localización de la metástasis	Pulmón (28.5%), Retroperitoneo (57.1%), Pelvis (14.4%)	
Histotipo	nsCTCG (76.9%)	sCTCG (23.01%)

Para el grupo 2 se observó que la edad promedio al diagnóstico fue de 3.6 años de edad, en tanto que el promedio de peso y talla al nacimiento fue de 3,064.6 g y 50.1 cm respectivamente, en la Tabla 6 se muestran otros datos relevantes de este grupo de pacientes.

Tabla 6. Datos relevantes del grupo de pacientes pediátricos con CO

Variables	Categorías	
Tipo de Criptorquidia	Bilateral (48.2%)	Unilateral Izquierda (28.3%) Unilateral Derecha (23.5%)
Realización de la orquidopexia	Antes del año de edad (23.1%)	Después del año de edad (76.9%)
Realización de la orquiectomía	Si (16.7%)	No (83.3%)
Antecedentes familiares de CO	Si (14.3%)	No (85.7%)
Antecedentes familiares de CTCG	Si (2.3%)	No (97.7%)

Es importante resaltar que la proporción de CO idiopática en el grupo 1 y 2 se presento el fenotipo grave (bilateral) en la mitad de todos los casos a diferencia de lo reportado donde se apunta que la mayoría de los casos se presentan con el fenotipo unilateral, por otro lado un dato importante es que en la mayoría de los pacientes la orquidopexia se realizó tardíamente, lo que puede resultar en un factor de riesgo ya que la corrección quirúrgica tardía tiene severas repercusiones en la salud en estos pacientes, como se reporta por diversos autores.^{3,4}

8.4 GENOTIPIFICACIÓN EN EL GEN *c-KIT*

En el grupo 1 se encontró un solo paciente positivo (1/13) para la variante D816V con un genotipo heterocigoto, este hallazgo representa una frecuencia alélica de 3.84%. Los 12 pacientes restantes presentaron un genotipo homocigoto normal al igual que los otros dos grupos de estudio, como se muestra en la Figura 18.

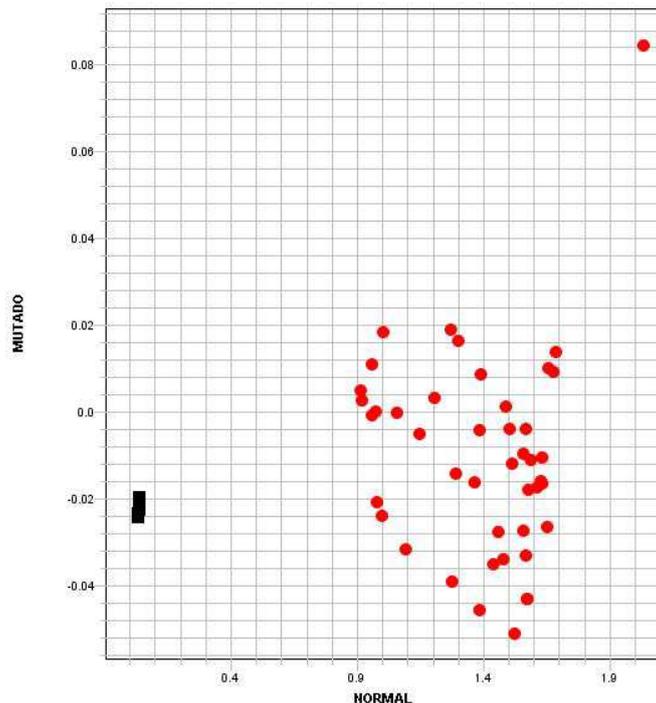


Figura 18. Análisis de discriminación alélica para la variante D816V

Es importante resaltar que esta variante ha sido reportada por el grupo de Looijenga en 2003, como una variante asociada al CTCG, catalogándola como una variante de susceptibilidad para el desarrollo del fenotipo de CTCG bilateral, dado que esta se ha identificado en el 96% de los tumores con fenotipo bilateral, en tanto que en el fenotipo unilateral sólo se detectó con una frecuencia del 1.8% de los pacientes.⁵⁹ En nuestro caso se encontró esta variante en un paciente con nsCTCG con fenotipo de CTCG unilateral derecho y antecedentes de CO idiopática bilateral representando el 7.69%. A diferencia de los estudios citados esta variante no pudo encontrarse en el fenotipo bilateral de CTCG, sin embargo el número de muestras (n=13) es muy pequeño.

Otros estudios, como el de Willmore y cols., reportan a la variante D816V con una frecuencia muy baja en pacientes adultos⁶⁰, estos datos son similares a los informados en nuestro estudio, por otro lado esta misma variante ha sido estudiada por varios autores e incluso por la FDA, por lo que se ha establecido como un marcador de respuesta al tratamiento oncológico con mesilato de Imatinib. La variante D816V se ubica en una región catalítica del receptor con actividad de tirosina cinasa (c-KIT), por lo que esta variante provoca la

autofosforilación desmedida del receptor y por tanto un mayor crecimiento celular. Los pacientes positivos para esta variante alélica son clasificados como resistentes al tratamiento con mesilato de Imatinib. Con base en los resultados obtenidos en este análisis podemos concluir que la población de estudio (grupos 1, 2 y 3) en su caso responderían perfectamente al tratamiento con mesilato de Imatinib ya que muestran un genotipo homocigoto normal con excepción de un solo paciente con CTCG, como ya se mencionó previamente.

En el caso de la variante D816H, en el grupo 1 se observaron 2/13 pacientes con un genotipo homocigoto normal con una frecuencia alélica del 7.69% y 11/13 heterocigotos. Mientras que para los grupos 2 y 3 se observó un comportamiento más homogéneo, al identificar un genotipo heterocigoto en el 100% de los individuos analizados como se muestra en la Figura 19.

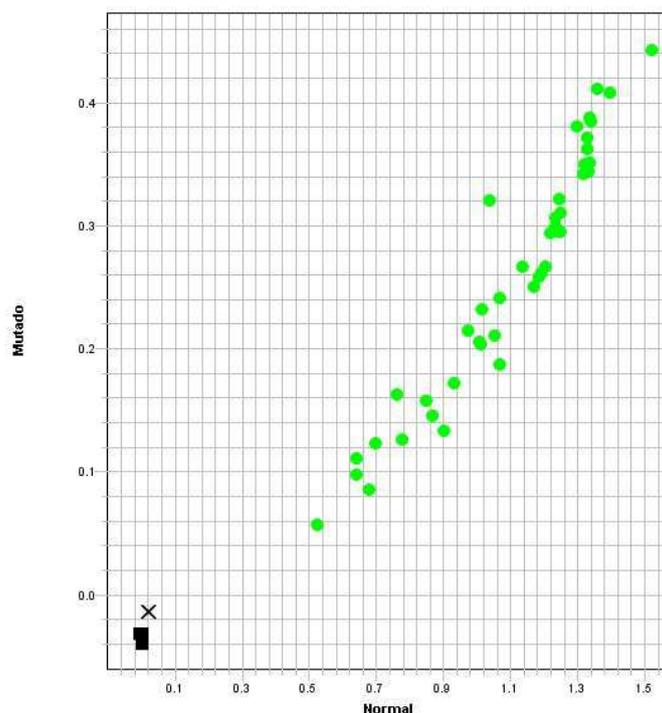


Figura 19. Análisis de discriminación alélica para la sonda D816H.

Esta variante, a diferencia de la D816V, se encontró con menor frecuencia en nuestros pacientes con CTCG. En un estudio realizado por Tian y cols. en 1999, se reportó que el tejido sano de los pacientes, mostraba un genotipo silvestre, sugiriendo que el genotipo alterado se adquirió y seleccionó, y éste originó la transformación del tejido sano a un tumor, específicamente en tejidos testiculares con seminoma o disgerminoma. Se habla de una adquisición de la mutación a nivel somático en el gen *c-KIT* durante la transformación neoplásica en el precursor celular, esta transformación se da en el paso de célula germinal primordial (*CGP*) a carcinoma *in situ* testicular (*CIS_t*) de estas a Seminoma/disgerminoma, permitiendo una pérdida de heterocigosidad de *c-KIT*.⁶¹ En este sentido, aunque la población analizada en este estudio presentó un genotipo heterocigoto para la variante D816H, no podemos aseverar que esta población es susceptible a desarrollar una neoplasia en edades posteriores a este estudio, ya que se requiere un segundo evento mutacional somático que permita esta pérdida de heterocigosidad, lo que puede incluso relacionarse con la falla de los mecanismos de reparación del ADN.

Actualmente no existen estudios que permitan predecir el CTCG en pacientes con alto riesgo a presentar esta neoplasia, como son los pacientes con CO, los cuales muestran un riesgo de 7 a 10 veces más que la población general. En este estudio no se pudieron identificar las variantes D816V y D816H en ninguno de los pacientes del grupo 2 (con criptorquidia idiopática), posiblemente debido al tamaño de muestra que aun es pequeño con el que se cuenta actualmente. Debido a esto se espera una proporción relativamente pequeña de casos de CO que en un futuro desarrollen CTCG.

8.5 GENOTIPIFICACIÓN EN EL GEN AR

Nuestros resultados demuestran que la variante P390S del gen que codifica para el AR se identificó con un genotipo homocigoto normal en los tres grupos de estudio, es decir todos los individuos incluidos en el estudio presentan sus dos alelos normales, como se muestra en la Figura 20.

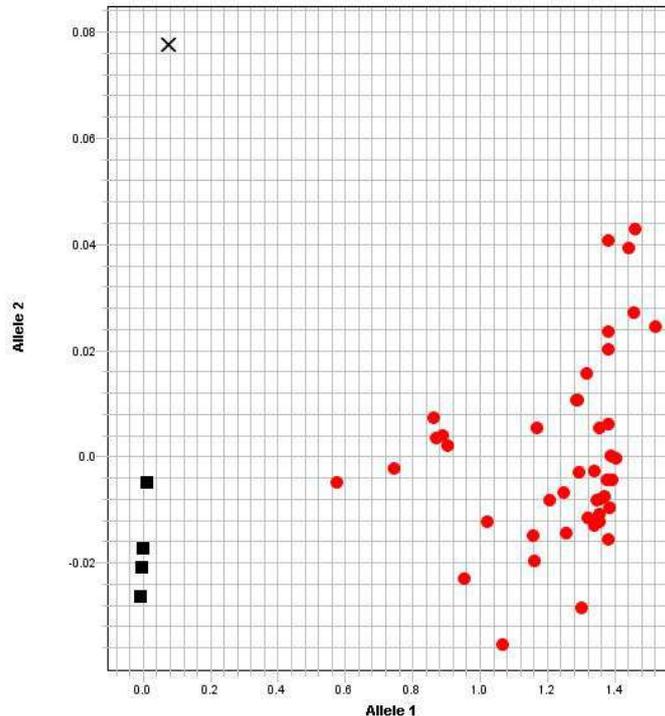


Figura 20. Análisis de discriminación alélica para la sonda P390S.

La presencia de esta variante fue descubierta por Garolla y cols. en 2005 en pacientes con diagnóstico de CTCG, en una muestra de 123 pacientes de población italiana. Esta alteración se ubica en el exón 1 del gen *AR* y tiene un importante papel en la actividad transcripcional. Esta variable consiste en una transición de una C por una T, lo que provoca un cambio de una prolina por una serina en el codón 390 del *AR*. En la población de estudio, esta alteración se presentó en un paciente, lo que representó el 0.8% (1/123) de la población estudiada. Otro estudio demostró la presencia de P390S en un paciente con oligozoopermia severa en población alemana y en dos pacientes norteamericanos con cáncer de próstata. Esta alteración ha sido observada en otras afecciones urológicas y se ha relacionado con la aparición de cáncer^{56,62,63}, sin embargo en nuestro estudio no se encontró dicha variante, ya que toda la población analizada muestra un genotipo homocigoto normal.

En el caso de la variante A297T del gen que codifica para el AR no se observaron tampoco diferencias en el genotipo de los grupos estudiados ya que los tres resultaron con un genotipo heterocigoto, es decir todos los individuos incluidos en el estudio presentaron un alelo alterado y uno normal, como se muestra en la Figura 21.

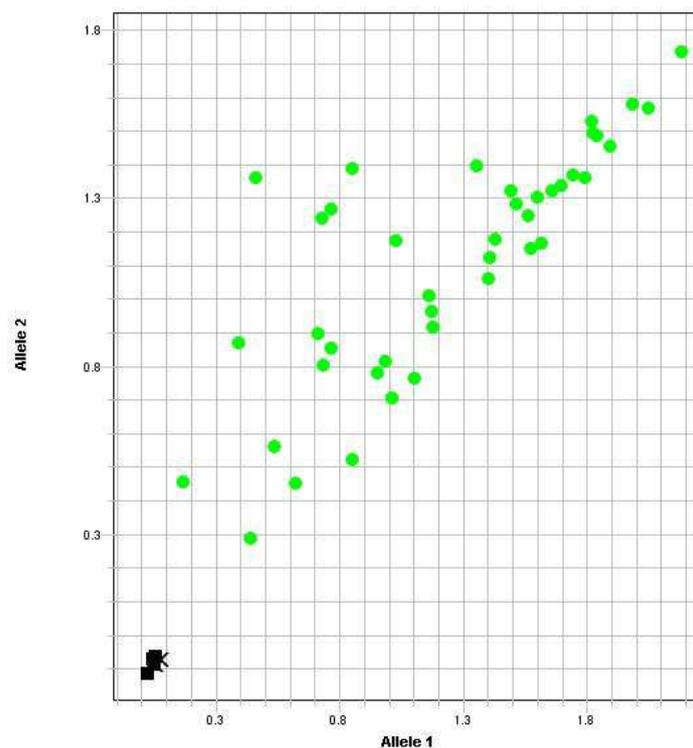


Figura 21. Análisis de discriminación alélica para la sonda A297T.

La variante A297T del gen que codifica para el AR fue descrita por primera vez por el grupo de Garolla y cols. en 2005 en un paciente italiano con diagnóstico de CTCG con histotipo seminomatoso; sin embargo hasta la fecha no ha sido descrita en ninguna otra afección. Dicha variante se ubica en el exón 1 y consiste en la transición de una G por una A, lo que provoca la sustitución de una de alanina por una treonina en el codón 297. Su localización puntual se ha relacionado con el sitio de transactivación del receptor de andrógenos, sin embargo aún no se sabe cómo interviene esta alteración en la aparición de CTCG. El estudio de Garolla y cols. Indica que esta variante está asociada con la neoplasia del tipo seminoma⁵⁶.

En la población analizada por este se detectó un genotipo heterocigoto generalizado para la variante A297T; esto marca una diferencia con los datos reportados por el grupo de Garolla. Esta diferencia refleja simplemente el comportamiento normal de la población seleccionada para este estudio, en donde la presencia de un alelo con la variante no se asocia al fenotipo del CTCG, sino a la variabilidad genética normal.

Las variantes P390S y A279T del gen *AR* no se asociaron, en ninguno de los grupos analizados en este estudio, al CTCG. El análisis de resultados indica que se requiere un mayor tamaño de la muestra de estudio, para poder llegar a una conclusión más clara. Sin embargo, la proporción que se espera de pacientes con CO idiopática que desarrollarán CTCG en un futuro es baja, por lo que se deduce que solamente en pocos casos se podrá relacionar a ambas enfermedades. Sin embargo estos resultados son muy útiles debido a que describen por primera vez el comportamiento general en la población de estudio. Adicionalmente es necesario realizar metodologías más finas para poder encontrar vías de señalización o genes de importancia en ambas patologías que permitan proponer mecanismos que ligen a estas.

8.6 BUSQUEDA DE LA DELECCIÓN L57 EN EL GEN *AR*

Mediante el método de secuenciación automatizada se identificó otra de las variantes del exón 1 del gene *AR*, la cual consiste en una delección de una lisina en el codón 57 (Del L57), dicha alteración se detectó en uno de los pacientes del grupo 1, el cual presentó CO idiopática unilateral del tipo esporádico como se muestra en la Figura 22.

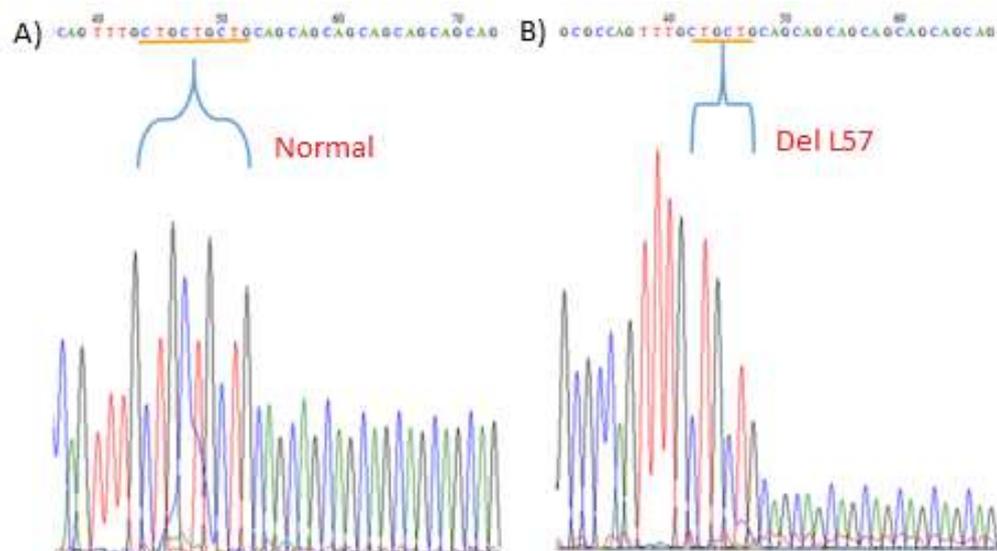


Figura 22. En esta imagen se puede observar el electroferograma correspondiente a la secuenciación automatizada de un fragmento del exón 1, en la cual se puede observar: A) La secuencia normal (F) 3'-5', en la cual se observa la presencia del trinucleotido CTG en el codón 57 y B) La secuencia alterada (F) 3'-5' en un paciente con CO idiopática unilateral esporádica con la Del L57.

Esta delección fue previamente reportada por Garolla y cols, en 2005 la cual se identificó por primera vez en un paciente italiano con CTCG y sin antecedentes de CO utilizando secuenciación automatizada, otros estudios ya habían identificado la Del L57 en un caso con cáncer de laringe^{56,64}. La Del L57 se ubica justo antes del fragmento de Poli Q, por lo que se localiza en el sitio de transactivación del AR, lo que hace relevante a esta delección, es su probablemente participación en el cambio conformacional del dominio N-terminal, lo cual podría resultar en una baja actividad del receptor.⁵⁶

En el mismo año se realizó el tamizaje de esta misma alteración en pacientes con CO idiopática, sin embargo no se logró detectarla⁵⁷. En este estudio la Del L57 se detectó solamente en un paciente del grupo 2, (con CO idiopática) lo cual representa el 1.92% (1/52 pacientes) de los alelos afectados. Esta es la primera ocasión en que se identifica la Del L57 en un grupo de riesgo para el desarrollo de la neoplasia como lo son los pacientes con CO idiopática, la cual ha sido caracterizada en pacientes con cáncer testicular.

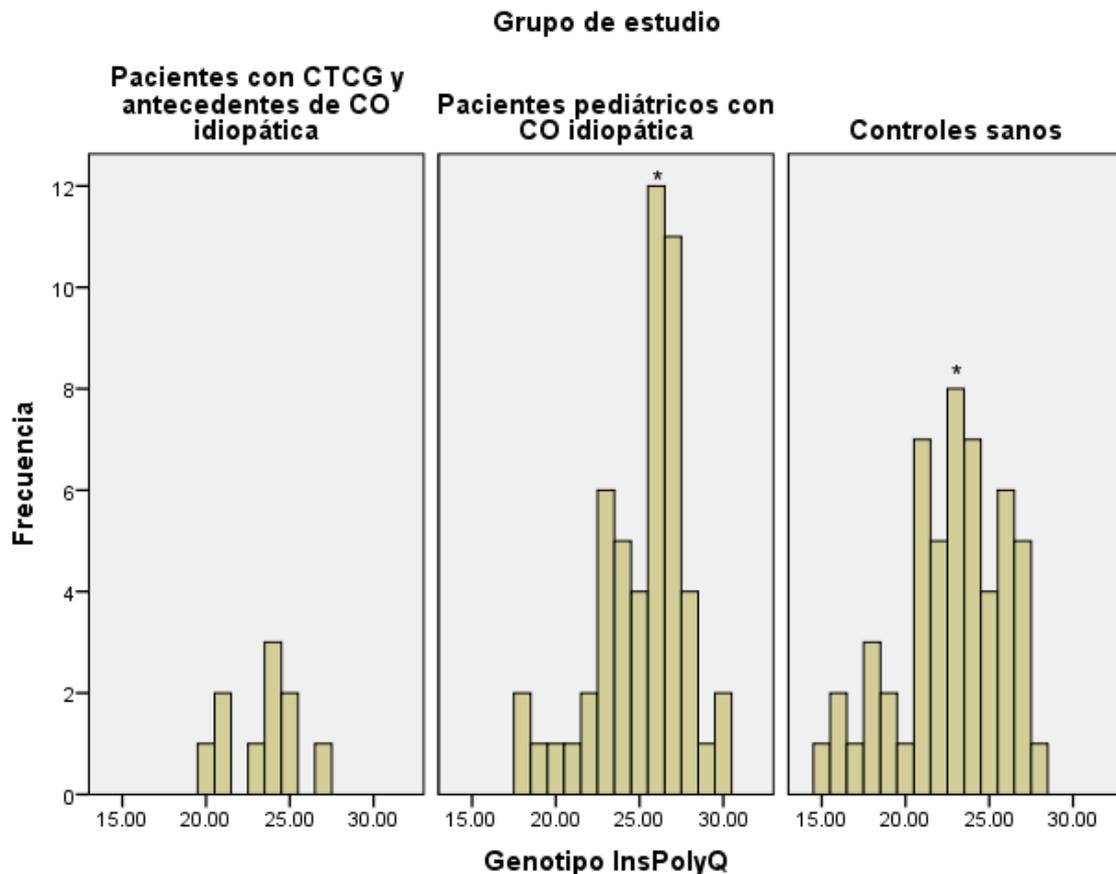


Figura 24. Distribución normal del número de inserciones de Poly Q en el exón 1 del gen *AR* en donde se muestra para el grupo 1 (10 pacientes con CTCG y antecedentes de CO idiopática con una media de 24.40 inserciones y una desviación estándar de 2.171), el grupo 2* (52 pacientes pediátricos con CO idiopática con una media de inserciones de 25.15 y una desviación estándar de 2.725) y el grupo 3* (53 controles sanos con una media de inserciones de 22.72 y una desviación estándar de 3.177) mediante una prueba de ANOVA seguida de la prueba de Tukey.

El exón 1 codifica para varias regiones de fragmentos de repetidos de ADN, dentro de éstas la más importante es la repetición de tripletes CAG que inicia en el codón 58 con una extensión en repetidos promedio de 21 ± 2 repetidos sin embargo se ha identificado un rango de fragmento de repetidos entre 14 y 35 dentro de la población normal. Este triplete codifica para un repetido de poliglutaminas (Poli Q) el cual tiene una influencia definitiva en la actividad del AR y se ha asociado con diversas patologías como el cáncer de próstata, cáncer testicular, criptorquidia, el síndrome de Kennedy, entre otros.^{53,65}

Estudios realizados en diversas poblaciones demuestran que el número de inserciones normales es variable, para el caso de población norteamericana lo normal representó en promedio 21.3 inserciones respecto a pacientes con 21.12.⁶⁶ Este dato es similar al reportado en población italiana previamente mencionado, contrastantemente en la población china, el promedio normal fue de 23.5 inserciones en controles sanos y 23.4 en pacientes con CO⁶⁷. Sin embargo aunque en esta población se reporta una asociación entre el número de inserciones y el fenotipo de criptorquidia, las diferencias son muy sutiles en comparación a lo encontrado en nuestro estudio (grupo 1,2 y 3 con 24.40, 25.15 y 22.72 inserciones en promedio respectivamente) Contrario a lo descrito por diversos autores el numero de inserciones en el grupo 1 (CTCG) está por encima del promedio en el grupo control al igual que en el grupo 2 (CO idiopática).

Se ha documentado que el tamaño de repetidos de CAG está relacionado con la actividad de AR ya que a mayor tamaño de dicho repetido, se observa una menor transactivación del AR. Sin embargo se ha visto que el tamaño reducido de este, se relaciona consistentemente con el desarrollo de CTCG y de próstata de alto grado, así como el inicio temprano de estas neoplasia y una mayor recurrencia de estas enfermedades. Mientras que un tamaño mayor al promedio de estos repetidos, se relaciona con un funcionamiento deficiente del AR. Se ha demostrado también que cuando se encuentra una delección en el fragmento de Poli Q, se presenta una elevada actividad transcripcional, por lo que se sugiere que la función de éste es la de inhibir dicha transactivación. Sin embargo la continua expansión de este fragmento permite el desarrollo de las características primarias y secundarias en el hombre, ya que personas con fragmento largo de Poli Q pueden ser fértiles y no presentar ambigüedad genital.^{53,68}

9 CONCLUSIONES

En este trabajo se determinó que los SNPs analizados de manera dirigida en los genes *cKIT* (D816V, D816H) y *AR* (P390S, A279T) no presentan asociación entre la CO idiopática y el CTCG en nuestra población de estudio.

Sin embargo la delección L57 y el número de inserciones de Poli Q en el exón 1 del gen *AR* son variantes que se presentan en común entre los pacientes con CO idiopática y los pacientes con CTCG, lo que podría explicar la relación de ambos padecimientos.

10 REFERENCIAS

1. Cantoral Marina, Benjamín A. (2015). Estudio de variantes alélicas del gen c-KIT asociadas a seminoma en un grupo de pacientes mexicanos con criptorquidia idiopática en el Instituto Nacional de Pediatría (Tesis de especialidad en urología pediátrica). Universidad Nacional Autónoma de México, México
2. International Agency for Research on Cancer The GLOBOCAN project. Octubre, 18, 2012, <http://globocan.iarc.fr/>
3. Ferguson L, Agoulnik AI. Testicular cancer and Cryptorchidism. *Frontiers in Endocrinology* 2013, 4: 1-9.
4. Virtanen HE, Bjerknes R, Cortes D, Jørgensen N, Rajpert-De Meyts E, Thorsson AV, Thorup J, Main KM. Cryptorchidism: classification, prevalence and long-term consequences. *Acta Paediatrica* 2007, 96(5):611-6.
5. Foresta C., Zucarello D., Garolla A., Ferlin A. Role of Hormones, Genes, and Environment in Human. *Endocrine Reviews* 2008, 29(5):560–580.
6. Elder J.S. The undescended testis: hormonal and surgical management. *Surgery Clinical North America*. 1988, 68(5):983-1005.
7. Backhouse K. M.; Hewer H. R. Features of reproduction in the grey seal. *Medical Biology Illustrated* 1964, 14:144-150.
8. Hutson JM, Terada M, Zhou B, Williams MPL. Normal testicular descent and the aetiology of cryptorchidism. *Advance Anatomical Embryology Cell Biol* 1995,132:1-56
9. Wensing C.J. Testicular descents in the rat and a comparison of this process in the rat with that in the pig. *Anatomic Rec*. 1986, 214: (2) 154-160.
10. Ivell R.; Hartung S. The molecular basis of cryptorchidism. *Molecular Human Reproduction*. 2003, 9(4):175-81.
11. Massart F.; Saggese G. Morphogenetic Targets and Genetics of Undescended Testis. *Sexual Development* 2010, 4:326-335.
12. Ashley R.; Ashley MD.; Barthold JS.; Thomas F.; Kolon MSD.. Cryptorchidism Pathogenesis, Diagnosis, Treatment and Prognosis. *Urology Clinical North America*. 2010, 37: 183-193.
13. Looijenga LH. Human testicular (non) seminomatous germ cell tumors: the clinical implications of recent pathobiological insights. *Journal of Pathology*. 2009; 218:146-162.
14. Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Human Reproduction*. 2001; 16:972–978.
15. Cortes D, Thorup JM, Visfeldt J. Cryptorchidism: aspects of fertility and neoplasms. A study including data of 1,335 consecutive boys who underwent testicular biopsy simultaneously with surgery for cryptorchidism. *Hormone Responses*. 2001; 55(1):21-7.
16. Trussell JC and Lee PA. The relationship of cryptorchidism to fertility. *Current Urology Reproduction*. 2004; 5: (2) 142-148
17. Tasian GE, Hittelman AB, Kim GE, DiSandro MJ, Baskin LS. Age at orchiopexy and testis palpability predict germ and Leydig cell loss: clinical predictors of adverse histological features of cryptorchidism. *Journal of Urology*. 2009; 182: (2) 704-709.
18. Farrer J.H.; Walker A.H.; Rajfer J. Management of the post pubertal cryptorchid testis: A statistical review *Journal of Urology*. 1985, 134:1071.
19. Hinman F.; Jr. Opening remarks: Cryptorchidism. *European Journal of Pediatric*. 1993, 152 (Suppl 2): 53-55.
20. Ferlin A.; Simonato M.; Bartoloni L.; Rizzo G.; Bettella A.; Dottorini T.; Dallapiccola B.; Foresta C. The INSL3-LGR8/GREAT ligand-receptor pair in human cryptorchidism. *Journal of Clinical Endocrinology Metablims*. 2003, 88: 4273-4279.
21. Bay K. and Andersson A.-M. Human testicular insulin-like factor 3: in relation to development, reproductive hormones and andrological disorders. *International Journal of Andrology* 2010, 34, 97-109.
22. E. Huyghe, T. Matsuda, P. Thonneau. Increasing incidence of testicular cancer worldwide: a review, *Journal Urologic*. 2003, 170: 5-11
23. Jerónimo C. Henrique R. Epigenetic biomarkers in urological tumors: A systemic review. *Cancer Letters* 2011
24. Bray F, Ferlay J, Devesa SS, et al. Interpreting the international trends in testicular seminoma and non seminoma incidence. *National Clinical Practice of Urology* 2006; 3:532.

25. Jemal A.; Bray F.; Center M. M.; Farlay J.; Ward E.; Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer Journal Clinical*. 2011 61: 69-90.
26. J. Ferley, H.R. Shin, Forman D, Mathers C, Parkin D.M, Cancer incidence and mortality worldwide. IARC Press Lyon 2008.
27. Siegel R.Ward E.; Brawley O.; Jemal A. The impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer Journal Clinical* 2011, 61: 212-236
28. Eble JN, Sauter G, Epstein JL and Sesterhenn IA (eds) WHO Classification of tumours. Pathology and Genetics of tumours of the Urinary System and Male Genital Organs 2004 Ch. 4 250-262 (IARC Press, Lyon).
29. Kratz C.; Mai P. and Greene M. Familial testicular germ cell tumours. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism* 2010, 24: 503-513.
30. Greene M.; Kratz C.; Mai P.; Mueller C.; Peters J.; Bratslavsky G.; Ling A.; Choyke P.; Premkumar A.; Bracci J.; Watkins R.; McMaster M.; Korde L. 2010. Familial testicular germ cell tumors in adults: summary of genetic risk factors and clinical phenotype. *Endocrine-Related Cancer* 2010, 17: R109-R121
31. Cook M.; A systematic review and metaanalysis of perinatal variables in relation to the risk of testicular cancer-experiences of son. *International Journal of Epidemiology* 2010. 39, 1605-1608
32. Gerner M.; Turner M.; Ghadirian P.; Krewski D.; Epidemiology of testicular cancer: an overview. *International Journal of Cancer* 2005, 116, 331:339
33. Kanetsky P.; Mitra N.; Vardhanabhuti S.; Li M.; Vaughn D.; Letrero R.; Ciosek S.; Doody D.; Smith L.; Weaver J.; Albano A.; Chen C.; Starr J.; Rader D.; Godwin A.; Reilly M.; Hakonarson H.; Schwartz S.; Nathanson K.. Common variation in KITLG and at 5q31.3 predisposes to testicular germ cell cancer. *Nature Genetics* 2009, 41: 811-815
34. Rapley E.; Turnbull C.; Al Olama A.; Dermitzakis E.; Linger R.; Huddart R.; Renwick A.; Hughes D.; Hines S.; Seal S.; Morrison J.; Nsengimana J.; Deloukas P.; Rahman N.; Bishop D.; Easton D.; Stratton M.. A genome-wide association study of testicular germ cell tumor. *Nature Genetics* 2009, 41: 807-810.
35. Turnbull C.; Rahman N.. Genome-wide association studies provide new insights into the genetic basis of testicular germ-cell tumour. *International Journal of Andrology* 2011, 34(4 Pt 2): e86-96; discussion e96-7
36. Sheikine Y.; Genega E.; Melamed J.; Lee P.; Reuter V.; Ye H.. Molecular genetics of testicular germ cell tumours. *American Journal of Cancer* 2012, 2(2): 153-167
37. Port M.; Schmelz HU.; Sparwasser C.; Albers P.; Pottek T.; Abend M.. Gene expression profiling in seminoma and Nonseminoma. *Journal of Clinical Oncology* 2005, (23)
38. Looijenga L. H., Hersmus R., Leeuw B., Stoop H., Cools M., Oosterhuis W., Drop S., Wolffenbuttel K. Gonadal tumours and DSD. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2010, 24: 291-310
39. Lemmon MA. and Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell Press* 2010 141 (7): 1117-34
40. Yuzawa S., Opatowsky Y., Zhang Z., Mandiyan V., Lax I. and Schlessinger J. Structural basis for activation of the receptor tyrosine kinase KIT by stem cell factor. *Cell*. 2007, 130, 323-334.
41. Heinrich MC.; Blanke CD.; Druker BJ.; Corless CL.. Inhibition of KIT Tyrosine Kinase Activity: A novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies. *Journal of clinical Oncology* 2002, 20 (6): 1692-1703
42. Tian Q.; Henry F.; Frierson HF.; Krystal GW, Moskaluk CA. Activating cKit gen mutations in human germ cell tumors. *American Journal of Pathology*. 1999, 154(6)
43. Pan C.; Chen P.; Chian H.. KIT (CD117) is frequently overexpressed in thymic carcinomas but is absent in thymomas. *Journal of Pathology* 2004, 202: 375-381.
44. Izquierdo MA.; Valk PV.; Otte JV.; Rubio G.; Germa-Lluch JR.; Ueda R.; Scheper RJ.; Takahashi T.; Giaccone G. Differential expression of the c-kit Proto-oncogen in germ cell tumours. *Journal of Pathology*. 1995, 177: 253-258.
45. www.genename.org, www.rcsb.org, www.ensembl.org
46. Willmore P.; Holden JA.; Chadwich BE.; Layfield L. Detection of c-kit exons 11- and 17-activating mutations in testicular seminomas by high-resolution melting amplicon analysis. *Modern Pathology* 2006, 19: 1164-1169.
47. Sakuma Y.; Sakurai S.; Oguni S.; Hironaka M.; Saito K. Alterations of the c-kit gene in testicular germ cell tumors. *Cancer Sciences*. 2003, 94(6)
48. Looijenga LH.; Leeuw H.; Oorschot MV. Stem cell factor receptor (c-kit) codon 816 mutations predict development of bilateral testicular germ-cell tumors. *Cancer Research* 2003, 63: 7674-7678.

49. Miller Ct et al.. cis Regulatory changes in KIT ligand expression and parallel evolution of pigmentaction in sticklenback and humans. *Cell* 2007, 131, 1179-1189.
50. Kratz CP, Han SS, Rosenberg P, Berndt SI, Burdett L, Yeager M, Korde LA, Mai PL, Pfeiffer R, Greene MH. Variants in or near KITLG, BAC1, DMRT1, and TERT-CLPTM1L predispose to familial testicular Germ Cell Tumour. *Journal of Medical Genetics* 2011, 48 (7): 473-476.
51. Kanetsky PA, Mitra N, Vardhanabhuti S, et al. Common variation in KITLG and at 5q31.3 predisposes to testicular germ cell cancer. *Nature Genetics* 2009, 41:811.
52. Li J. and Al-Azzawi F. Mecanism of androgen receptor action. *Maturitas* 2009. 20;63 (2): 142-8
53. Gelmann E. P. Molecular biology of the androgen receptor. *Journal of Clinical Oncology*. 2002, 20: 3001-3015.
54. Davis C.; Siegmund K.; Vandenberg D.; Skinner E.; Coetzee G.; Thomas D.; Pike M.; Cortessis V. Heterogenous effect of androgen receptor CAG tract length on testicular germ cell tumor risk: shorter repeats associated with seminoma but not other histologic types. *Carcinogenesis* 2011, 32 (8): 1238-1243.
55. Västermark A.; Giwercman Y.; Hagströmer O.; De-Meyts E.; Eberhard J.; Stahl O.; Cedermark G.; Rastkhani H.; Daugaard G.; Arver S.; Giwercman A. Polymorphic variation in the androgen receptor gene: Assosiation with risk of testicular germ cell cancer and metastatic disease. *European Journal of Cancer*. 2011, 47: 413-419.
56. Garolla A.; Ferlin A.; Vinanzi C.; Roverato A.; Sotti G.; Artibani W. and And Foresta C. Molecular analysis of the androgen receptor gene in testicular cancer. *Endocrine Related Cancer* 2005, 12 645-655.
57. Ferlin A.; Garolla A.; Betella A.; Bartoloni L.; Vinanzi C.; Roverato A. and Foresta C. Androgen receptor gene CAG and GGC repeat lengths in cryptorchidism. *European Journal of Endocrinology*. 2005, 152 419-425.
58. Argimon J, Jiménez J. Métodos de investigación clínica y epidemiológica. 3ra. Ed. Elsevier. España 2006.
59. Looijenga L., Leeuw H., Ooeschot M., Gurp R., Stoop H., Gillis Ad., Gouveia C., Weber R., Kirkels W., Dijk T., Lindern M., Valk P., Lajos G., Olah E., Nesland J., Fossa S. and Oosterhuis W. Stem cell factor receptor (*c-KIT*) codón 816 mutations predict development of bilateral testicular germ-cell tumors. *Cancer Research*. 2003, 63, 7674-7678.
60. Willmore-Payne C., Holden J., Chadwick B and Layfield L. Detection of c-Kit exons 11- and 17-activating mutations in testicular seminomas by high-resolution melting amplicon analysis. *Modern Pathology*. 2006, 19, 1164-1169.
61. Tian Q., Frierson H., Krystal G. and Moskaluk C. Activating c-kit gene mutations in human germ cell tumors. *American Journal of Pathology*. 1999, 154 (6).
62. Taplin M., Halabi S., Rejeshkumar B. Hormone-refractory prostate cáncer: Evaluation of response. *Medical Oncology*. 2010, 2 (3): 189-207.
63. Hiort O., Holterhus P., Horter T., Schulze W., Kremke B., Bals-Pratsch M., Sinneker G. and Kruse K. Significance of mutation in androgen receptor gene in males whit idiopathic infertility. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2000, 85 (8).
64. Urushibata, T., Iwatake, H., Kaneko, T. and Kato, I, 10th International. Congress of. Endocrinology. 1996. Abstract P3-706
65. Västermark A., Giwercman Y., Hagströmer O., De-Meyts E., Eberhard J., Stahl O., Cedermark G., Rastkhani H., Daugaard G., Arver S. and Giwercman A. Polymorphic variation in the androgen receptor gene: Assosiation with risk of testicular germ cell cáncer and metastatic disease. *European Journal of Cancer*. 2011, 47, 413-419.
66. Davis-Dao C., Seigmund K., Vandenberg D., Skinner E., Coetzee G., Thomas D., Pike M. and Cortessis V. Heterogeneous effect of androgen receptor CAG tract length on testicular germ cell tumor risk: shorter repeats associated with seminoma but not other histologic types. *Carcinogenesis*. 2011, 32 (8): 1238-1243.
67. Sasagawa I., Suzuki Y., Tateno T., Nakada T., Muroya K. and Ogata T. CAG repeat length of the androgen receptor gene in japanese males with cryptorchidism. *Molecular human Reproduction*. 2000, 6 (11): 973-975.
68. Chamberlain N., Driver E. and Miesfeld R. The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic Acid Research*. 1994, 22 (15): 3181-3186.

11 ANEXOS

ANOVA de un factor

Genotipo InsPolyQ

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	158.372	2	79.186	9.376	.000
Intra-grupos	945.924	112	8.446		
Total	1104.296	114			

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Genotipo InsPolyQ

HSD de Tukey

(I) Grupo de estudio	(J) Grupo de estudio	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 99.9%	
					Límite inferior	Límite superior
Pacientes con CTCG y antecedentes de CO idiopática	Pacientes pediátricos con CO idiopática	-1.75385	1.00349	.192	-5.4588	1.9512
	Controles sanos	.68302	1.00196	.775	-3.0163	4.3824
Pacientes pediátricos con CO idiopática	Pacientes con CTCG y antecedentes de CO idiopática	1.75385	1.00349	.192	-1.9512	5.4588
	Controles sanos	2.43687*	.56725	.000	.3425	4.5312
Controles sanos	Pacientes con CTCG y antecedentes de CO idiopática	-.68302	1.00196	.775	-4.3824	3.0163
	Pacientes pediátricos con CO idiopática	-2.43687*	.56725	.000	-4.5312	-.3425

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.001.

Genotipo InsPolyQ

HSD de Tukey

Grupo de estudio	N	Subconjunto para alfa = 0.001
		1
Controles sanos	53	22.7170
Pacientes con CTCG y antecedentes de CO idiopática	10	23.4000
Pacientes pediátricos con CO idiopática	52	25.1538
Sig.		.018