



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIO DE POSGRADO  
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES DE PROGRESION  
NEOPLÁSICA: OCT3/4, KI67 Y  $\beta$  CATENINA EN  
GÓNADAS DE PACIENTES CON DISGENESIA  
GONADAL MIXTA.

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN:

ENDOCRINOLOGÍA PEDIÁTRICA

PRESENTA:

DRA. CAROLINA DOMÍNGUEZ HERNÁNDEZ

ASESORAS DE TESIS:

DRA. NAYELY GARIBAY NIETO

DRA. GLORIA QUEIPO GARCIA

DRA. ROCIO PEÑA ALONSO

MC. PATRICIA GUADALUPE MEDINA BRAVO



HOSPITAL INFANTIL *de* MÉXICO  
FEDERICO GÓMEZ  
Instituto Nacional de Salud

MÉXICO, DF.

FEBRERO 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS SUPERIORES  
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ**

**IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES DE PROGRESION NEOPLÁSICA:  
OCT3/4, KI67 Y  $\beta$  CATENINA EN GÓNADAS DE PACIENTES CON DISGENESIA  
GONADAL MIXTA.**

**TESIS**

Para obtener el título de Especialista en:

**ENDOCRINOLOGÍA PEDIÁTRICA**

**P R E S E N T A :**

**DRA. CAROLINA DOMÍNGUEZ HERNÁNDEZ**

**DIRECTORAS DE TESIS:**

---

**DRA. NAYELY GARIBAY NIETO  
GARCÍA**

---

**DRA. GLORIA QUEIPO**

---

**DRA. ROCIO PEÑA ALONSO  
GUADALUPE**

---

**M.C. PATRICIA**

**MEDINA BRAVO**

**MÉXICO, D.F.**

**FEBRERO 2011**

## AGRADECIMIENTOS

**G**racias a ti, Dios, por darme la oportunidad de cumplir esta meta, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía en este tiempo.

**R**oberto, gracias por acompañarme en esta travesía, por estar incondicionalmente a mi lado, por compartir tu vida conmigo, te amo.

**A** ti mamá, gracias, por darme siempre un ejemplo de lucha, de amor, de perseverancia, gracias por tu apoyo, te quiero mucho.

**C**on todo el cariño, a mi padre, por enseñarme que el deseo de superación, que la fuerza de voluntad y la disciplina son importantes para lograr mis metas.

**I**gualmente, quiero agradecer el apoyo de mis directoras de tesis, Dra. Nayely Garibay, Dra. Gloria Queipo, Dra. Rocio Peña, Dra. Patricia Medina, por todo el tiempo en el que amablemente me ayudaron con este proyecto, por la paciencia que siempre mostraron, por permitirme aprender de su experiencia y por la amistad que me brindaron.

**A** todos mis amigos, gracias, por compartir este camino, por su apoyo en los buenos y malos ratos, los quiero mucho.

**S**on muchas las personas especiales a las que me gustaría agradecer hoy su amistad, apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos, en el corazón. Sin importar en dónde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

*No basta saber, se debe también aplicar. No es suficiente querer, se debe también hacer.*

*Johann Wolfgang Goethe.*

#### **XIV. BIBLIOGRAFIA**

1. MacLaughlin DT, Donahoe PK. Sex determination and differentiation. *NEJM*. 2004;350:367-378.
2. Hersmus R, De Leeuw B, Wolffenbuttel KP, Drop S, Oosterhuis JW, Cools M, Looijenga LHJ. New insights into type II germ cell tumor pathogenesis based on studies of patients with various forms of disorders of sex development (DSD). *Mol Cell Endocrinol*. 2008; 291:1-10.
3. Leendert HJ, Looijenga RH, Wolter JO, Cools M, Stenvert LS, Drop S, and Wolffenbuttel KP. Tumor risk in disorders of sex development (DSD). *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2007;21(3):480-495.
4. Sobel V, Yuan-Shan Z, McGinley JI. Fetal hormones and sexual differentiation. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2004;31:837-856.
5. Caignec CL, Baron S, McElreavey K, Joubert M, Rival JM, Mechinaud F. 46,XY gonadal dysgenesis: Evidence for autosomal dominant transmission in a large kindred. *Am J Med Genet* 2003;116A:37-43.
6. Uehara S, Hashiyada M, Sato K, Nata M, Funato T, Okamura K. Complete XY gonadal dysgenesis and aspects of the SRY genotype and gonadal tumor formation. *J Hum Genet*. 2002;47:279-284.
7. Wallace T, Levin HS. Mixed gonadal dysgenesis: A review of 15 patients reporting single cases of malignant intratubular germ cell neoplasia of the testis, endometrial adenocarcinoma, and complex vascular anomaly. *Arch Pathol Lab Med*. 1990. 114:679-688.
8. Telvi L, Lebbar A, Del Pino O, Barbet JP, Chaussain JL. 45,X/46,XY mosaicism, farner syndrome, male pseudohermaphroditism, mixed gonadal dysgenesis, Y chromosome abnormalities, sex determination. *Pediatrics*. 1999;104:304-308.
9. Cools M, Stenvert L.S, Drop S, Wolffenbutte KP, Oostehuis W, Looijenga HJ. Germ cell tumors in the intersex gonadal: Old paths, new directions, moving frontiers. *Endocr Rev*. 2006;27(5):468-484.
10. Kersemaekers MF, Honecker F, Stoop H, Cools M, Molier M, Wolffenbuttel K, Bokemeyer C, Li Y, Lau YF, Oosterhuis, Leendert HJ, Looijenga PhD. Identification of germ cells at risk for neoplastic transformation in gonadoblastoma. An immunohistochemical study for OCT3/4 and TSPY. *Hum Pathol*. 2005;36:512-521.
11. Palma I, Peña RY, Contreras A, Cebayos RG, Coyote N, Eraña L, Kofman-Alfaro S, Queipo G. Participation of OCT3/4 and  $\beta$ -catenin during dysgenetic gonadal malignant transformation. *Cancer Lett*. 2008; 263:204-211.
12. Honecker F, Kersemaekers AM, Molier M, Van Weeren PC, Stoop H, Ronald R de Krijger, Katja P Wolffenbuttel, Wolter Oosterhuis, Carsten Bokemeyer and Leendert HJ Looijenga. Involvement of

E-cadherin and B-catenin in germ cell tumours and in normal male fetal germ cell development. *J Pathol.* 2004;204:167-174.

13. Strohmeyer T, Reese D, Press M, Ackermann R, Hartmann M, Slamon D. Expression of the c-kit proto-oncogene and its ligand stem cell factor (SCF) in normal and malignant human testicular tissue. *J Urol.* 1995;153:511-515.

14. Rajpert E, Skakkebaek NE. Expression of the c-kit protein product in carcinoma-in-situ and invasive testicular germ cell tumours. *Int J Androl.* 1994;17:85-92.

15. Cools M, Van Aerde K, Kersemaekers AM, Boter M, Stenvert LS, Drop S, Wolffenbuttel KP, Steyerberg EW, Oosterhuis J, Leendert H.J, Looijenga. Morphological and Immunohistochemical differences between gonadal maturation delay and early germ cell neoplasia in patients with undervirilization syndromes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(9):5295-5303.

16. Peña-Alonso R, Nieto K, Alvarez R, Palma I, Nájera N, Eraña L, Dorantes LM, Kofman-Alfaro S, Queipo G. Distribution of Y-chromosome-bearing cells in gonadoblastoma and dysgenetic testis in 45,X/46,XY infants. *Mod Pathol.* 2005;18:439-445.

17. Cools M, Stoop H, Kersemaekers AM, Stenvert, Drop SL, Wolffenbuttel KP, Bourguignon JP, Slowilowska-Hilczner J, Kula K, Faradz S, Oosterhuis JW, Looijenga LH. Gonadoblastoma arising in undifferentiated gonadal tissue within dysgenetic gonads. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:2404-2413.

18. Looijenga LH, Stoop H, De Leeuw HP, Gouveia CA, Gillis A, Kees EP, Roozendaal V, Everardus J, Van Zoolen JJ, Weber RF, Wolffenbuttel KP, Van Dekken H, Honecker F, Bolemeier C, Elizabeth J, Perlman, Schneider DT, Kononen J, Oosterhuis W. POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors. *Cancer Res.* 2003;63:2244-2250.

19. Stoop H, Honecker F, Cools M, Krijger R, Looijenga LH. Differentiation and development of human female germ cells during prenatal gonadogenesis: an immunohistochemical study. *Hum Reprod.* 2005;20(6):1466-1476.

20. Chemes HE, Muzulin PM, Venara MC, Muhlmann MC, Martínez M, Gamboni M. Early manifestations of testicular dysgenesis in children: pathological phenotypes, karyotype correlations and precursor stages of tumour development. *APMIS.* 2003;111:1-13.

21. Lezzoni JC, Kap-Herr CV, Golden L, Gaffey MJ, MD. Gonadoblastomas in 45,X/46,XY mosaicism: Analysis of Y chromosome distribution by fluorescence in situ hybridation. *Anat Pathol.* 1997;108:197-201.

22. Yun-Fai C. Sex chromosome genetics '99: Gonadoblastoma, testicular and prostate cancers, and the TSPY Gene. *Am J Hum Genet.* 1999;64:921-927.

23. Jong J, Stoop H, Dohle GR, Bangma CH, Kliffen M, Esser JW, Van den Bent M, Kros JM, Oosterhuis W, and Looijenga LH. Diagnostic value of OCT3/4 for pre-invasive and invasive testicular germ cell tumours. *J Pathol.* 2005;206:242-249.

24. Schnieders F, Dörk T, Arnemann J, Vogel T, Werner M, Schmidtke J. Testis-specific protein, Y-encoded (TSPY) expression in testicular tissues. *Hum Mol Genet.* 1996;5(11):1801-1807.
25. De Meyts ER, Hanstin R, Jørgensen N, Græm N, Vogt P, Skakkebæk NE. Developmental expression of POU5F1 (OCT3/4) in normal and dysgenetic human gonads. *Hum Reprod.* 2004;19(6):1338-1344.
26. Skakkebæk NE, De Meyts ER, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod.* 2001;16(5):972-978.
27. Nunes MV, Bianco B, Verreschi IT. Disgenesias gonadais e tumores: Aspectos genéticos e clínicos. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2005;49/1:60-70.
28. Alvarez RA. Tesis: Distribucion de células con cromosoma Y en gonadoblastoma y gónada disgenética en pacientes pediátricos con cariotipo 45,X/46,XY. Hospital General de México. 2004.
29. Palma-Lara IM. Tesis: Participación de las proteínas  $\beta$ -catenina y OCT3/4 durante la transformación maligna del Gonadoblastoma en pacientes con disgenesia gonadal mixta. Instituto Politécnico Nacional. 2008.

# ÍNDICE

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
I. Resumen.....	1
II. Marco Teórico .....	2
III. Antecedentes.....	9
IV. Planteamiento del problema .....	11
V. Justificación.....	12
VI. Objetivos.....	13
VII. Material y Métodos.....	14
VIII. Resultados.....	20
IX. Discusión.....	24
X. Conclusiones.....	27
XI. Tablas.....	28
XII. Glosario.....	31
XIII. Anexos.....	32
XII. Bibliografía.....	38

## “IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES DE PROGRESIÓN NEOPLÁSICA: OCT3/4, KIT Y $\beta$ CATENINA EN GÓNADAS DE PACIENTES CON DISGENESIA GONADAL MIXTA”

### I. RESUMEN.

**Antecedentes:** La Disgenesia Gonadal Mixta (DGM) se define como la formación incompleta de las gónadas, como resultado de alteraciones en el proceso de migración u organización de las células germinales en la gónada fetal. En la DGM con cariotipo 45,X/46, XY las gónadas se caracterizan por estría gonadal y testículo disgenético contralateral, hay presencia de estructuras müllerianas y los genitales externos dependerán del fenotipo gonadal (femeninos, masculinos, frecuentemente se observa ambigüedad genital). Del 12-40% de los pacientes tienen riesgo de desarrollar tumores de células germinales tipo II (TCG). El Gonadoblastoma (GB) es un tumor que maligniza a disgerminoma/seminoma y afecta principalmente a estos pacientes es considerado como la etapa más temprana de la neoplasia germinal. Aún cuando los mecanismos que desencadenan la progresión de la neoplasia no se conocen, se ha propuesto la participación de moléculas como el factor de transcripción OCT3/4 en éste proceso. Este factor limita su expresión a células madre y a células germinales masculinas o femeninas inmaduras, por lo que alteraciones en su regulación podrían inducir diferentes destinos celulares y llevar a la malignización. Se ha mostrado que esta molécula ejerce su efecto a través de la proteína  $\beta$ -Catenina, sin embargo no hay estudios concluyentes del comportamiento de estas proteínas en la gónada disgenética sin gonadoblastoma.

**Objetivo:** Conocer si los patrones de expresión de OCT3/4 y  $\beta$ -Catenina en gónadas disgenéticas de pacientes con DGM son de utilidad para conocer el riesgo de desarrollar gonadoblastoma.

**Material y Métodos:** Se realizaron estudios de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia con anticuerpos específicos para OCT3/4,  $\beta$ -Catenina, y Ki67 (marcador de proliferación celular) en 12 muestras de tejido gonadal fijado e incluido en parafina de pacientes con disgenesia gonadal mixta sin gonadoblastoma.

**Resultados:** En nuestra muestra de gónadas disgenéticas sin gonadoblastoma se identificó a OCT3/4 positivo en 10/12 gónadas,  $\beta$ -catenina solo fue positivo en 2/12 (caso 3 y 5), y únicamente en el caso 5 se co-localizó con OCT3/4 lo que sugiere un mal pronóstico en este paciente. El análisis del c-KIT fue positivo en 7/12 pacientes lo que muestra proliferación en estas gónadas.

**Discusión:** Al no coexistir OCT3/4 y  $\beta$ -catenina en las muestras de pacientes con DGM hace pensar que  $\beta$ -catenina participa en un estadio posterior en la progresión neoplásica.

#### IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los pacientes con trastornos del desarrollo sexual, como la DGM tienen mayor riesgo de desarrollar tumores de células germinales, es por eso que la gonadectomía se realiza de forma profiláctica aún sin el conocimiento real del riesgo.

Los marcadores OCT3/4, c-KIT,  $\beta$ -Catenina son expresados de forma temprana en las células germinales indiferenciadas, en ambos sexos, y dejan de expresarse durante la diferenciación de las células germinales en gónadas normales.

No existe suficiente evidencia sobre el valor pronóstico de los marcadores PLAP, OCT 3/4, TSPY en la detección temprana de neoplasias en pacientes con trastorno de diferenciación sexual. Se sabe que OCT3/4, TSPY y  $\beta$  Catenina se han identificado en las células germinales del gonadoblastoma. El mecanismo por el cual la  $\beta$ -Catenina participa en la transformación a gonadoblastoma, aun no es clara.

La pregunta de investigación que se plantea es conocer si las proteínas OCT3/4, KI67,  $\beta$  CATENINA se expresan en las gónadas disgenéticas de pacientes con DGM sin gonadoblastoma?

## “IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES DE PROGRESION NEOPLÁSICA: OCT3/4, KIT Y $\beta$ CATENINA EN GÓNADAS DE PACIENTES CON DISGENESIA GONADAL MIXTA”

### II. MARCO TEÓRICO

La determinación sexual requiere de un proceso ordenado y secuencial que se lleva a cabo en tres etapas: 1) Establecimiento del sexo genético establecido por la presencia de genotipo XX o XY, 2) Diferenciación gonadal en la que se define la ruta que seguirá el embrión indiferenciado, y 3) Diferenciación fenotípica en la que se definen las características sexuales internas y externas (1,2).

El desarrollo gonadal inicia en la semana 5 de gestación; se observa una estructura primordial común en el sexo femenino y masculino llamada cresta urogenital que se localiza en la superficie ventromedial del mesonefros. Este primordio se mantiene en forma indiferenciada hasta la semana 7, cuando inicia la proliferación de cordones sexuales, que llegarán a ser túbulos seminíferos compuestos por células de Sertoli en el varón y folículos ováricos en la mujer (1, 2,3).

La cresta urogenital se forma del mesodermo bajo la influencia de varios factores entre los que se describen principalmente: Wt1 (Wilms' tumor-suppressor-1), SF1 (steroidogenic factor 1) y DAX (dosage sensitive sex reversal-adrenal hipoplasia congénita on the X chromosome), aunque también se encuentran involucrados otros genes como Lim1, Lhx9, Emx2. Los genes determinantes de testículo son SRY y SOX9, mientras que los promotores ováricos son DAX1 y WNT4. (1,2)

Las células germinales primordiales aparecen durante la tercera semana de vida fetal entre las células somáticas endodérmicas del saco vitelino, cerca del origen de la alantoides. El plegamiento del embrión lleva a la migración pasiva de células germinales primordiales del saco vitelino al intestino posterior durante la cuarta semana de vida fetal. En la quinta semana, las células germinales migran de forma activa a través del mesenquima a la gónada bipotencial, la cual se forma al final de la semana seis, hasta este momento las células germinales primordiales aún son indiferenciadas. Esta migración de las células germinales se lleva a cabo al menos parcialmente por la expresión de los genes *stella* y *fragilis*, los cuales son expresados exclusivamente en las células germinales diferenciadas. Sin embargo la función exacta de éstos genes no está clara, pero es indispensable para el desarrollo de las células germinales. Su producto interactúa con BMP4 (bone morphogenetic protein) (1,4).

Las células germinales pueden ser distinguidas por la expresión de marcadores como PLAP (placental-like alkaline phosphatase), OCT3/4 (octamer binding transcription factor 3/4) y c-Kit, en los siguientes pasos de maduración, las células germinales pierden éstas características embriogénicas. Inicialmente OCT3/4 fue identificado como uno de los elementos de regulación en la diferenciación de las células madres embriogénicas, pero la expresión de OCT3/4 está también presente en las células germinales primordiales y gonocitos y su contraparte maligna. (1,4)

La diferenciación de las células germinales en el testículo inicia en la semana 6 post concepción. Las células germinales primordiales masculinas o pre-espermatogonia son rodeadas por las células de Sertoli se juntan para formar los cordones testiculares. A la semana 7, las células del estroma mesonéfrico penetran en la gónada y se diferencian en células de Leydig. Al tercer mes de gestación, las células de Leydig llenan completamente el espacio intersticial.

El tiempo y la adecuada expresión del gen SRY, localizado en el brazo corto del cromosoma Y induce una cascada de reacciones resultando en la expresión de varios genes, factores de transcripción y al final resulta en el desarrollo testicular de la gónada en dirección masculina. Debido a la interacción con las células de pre-Sertoli, la diferenciación de los gonocitos en pre espermatogonias se mueven hacia la lamina basal donde madurarán en un futuro. Durante este proceso de maduración se pierde la expresión de los genes embriogénicos, y comienza la expresión de genes adicionales, como VASA (human homolog of the mouse vasa gene, un marcador general de las células germinales) y TSPY (testis specific protein-Y encoded), indicadores de la diferenciación del linaje de las células germinales masculinos (2,3).

Existen diferencias tempranas en el desarrollo sexual masculino y femenino que son evidentes en la proliferación de células germinales. Las células germinales masculinas sufren mitosis durante la migración, pero tan pronto se forme la gónada, su crecimiento se frena y se mantiene en fase quiescente G0 del ciclo celular hasta el nacimiento bajo la influencia de un factor inhibitorio de la meiosis secretado por las células de Sertoli. Después del nacimiento las células germinales reanudan el ciclo celular y experimentan la división meiótica, la cual produce espermatogonias haploides. Las células de Sertoli nutren a las células germinales, la cual completa la espermatogénesis en la pubertad, bajo la influencia de gonadotropinas. (1,4).

Las células germinales femeninas experimentan la mitosis y migran a la cresta urogenital y entran al ovario, las células inician la división meiótica donde se detienen en la profase 1 hasta el nacimiento. En este estadio sobrevive alrededor de las células de la granulosa y se mantiene los oocitos en su estado de folículo primordial, donde esperan su activación en la pubertad por las gonadotropinas. (1,2,4).

La ausencia de cromosoma Y o del gen SRY lleva al desarrollo de ovarios, en este caso, durante la semana 9, las células germinales primordiales se diferencian a oogonias y entre la semana doce y trece, la proliferación de oogonias inician su diferenciación a oocitos.

Los conductos Wolffianos y Müllerianos, están presentes en el feto de ambos sexos en una edad temprana de la gestación. Los conductos Wolffianos aparecen durante la semana 4 de la gestación, mientras que los conductos Müllerianos lo hacen entre las semana 6 y 7. En el varón los conductos Müllerianos regresan a la semana 8.5 como resultado de la secreción de Hormona antimülleriana (HAM) por las células de Sertoli, esta regresión ocurre de forma craneocaudal.

La secreción de testosterona inicia aproximadamente en la semana 8 y lleva a la diferenciación de los conductos de Wolff a epidídimo, vaso deferente, conducto eyaculatorio y vesícula seminal. Este proceso se completa alrededor de la semana doce.

En el sexo femenino, los conductos de Wolff regresan en la semana once, en la ausencia de testosterona los conductos Müllerianos se diferencian a oviducto, útero y cérvix y tercio superior de vagina.

Cuando el desarrollo cromosómico, gonadal o anatómico es atípico se produce un desorden del desarrollo sexual (DDS) (2,3). Existen múltiples causas que pueden llevar a DDS; que van desde mutaciones en proteínas codificadoras de genes que juegan un papel en el desarrollo de la diferenciación, alteraciones cromosómicas, mosaicismos, factores ambientales, etc. (2) Dentro de los DDS se encuentra la disgenesia gonadal, que es el tema que atañe a esta tesis.

Disgenesia Gonadal 46,XY, puede ser definida como la formación incompleta de las gónadas, como resultado de alteraciones en el proceso de migración u organización de las células germinales en la gónada fetal (2,5). Las características clínicas pueden ser divididas en tres formas histológicas:

- a) Disgenesia gonadal pura 46,XY, con estrías gonadales bilaterales, estructuras Müllerianas bien desarrolladas y ausencia de estructuras Wolffianas, y fenotipo femenino, que presentan síntomas ginecológicos en la adolescencia como amenorrea y pubertad retrasada.
- b) Disgenesia gonadal mixta 46, XY las gónadas se caracterizan por una estría gonadal de un lado y un testículo disgenético o de apariencia normal del otro lado intra abdominal.
- c) Disgenesia gonadal parcial se caracteriza por la presencia de testículos disgenéticos bilaterales, puede haber restos Müllerianos y Wolffianos que usualmente correlacionan con el grado de diferenciación testicular, la ambigüedad de genitales externos es

variable, La histología consiste en una pobre formación de túbulos seminíferos en combinación con estroma similar a ovario (5,6).

Como ya se mencionó, la Disgenesia Gonadal Mixta (DGM) es un desorden del desarrollo sexual caracterizado por desarrollo asimétrico de las gónadas, fue descrito por primera vez por Sohval en 1963. En 1973, Davidoff y Federman consideraron al desarrollo asimétrico gonadal como un tumor testicular de una gónada rudimentaria o estría gonadal. En la DGM, como resultado de una disminución en la producción de factor inhibidor mülleriano gonadal por la disgenesia testicular, hay presencia de estructuras internas müllerianas invariablemente. Los genitales externos pueden presentarse desde femeninos normales a masculinos normales en apariencia y frecuentemente tienen características ambiguas. Los pacientes fenotípicamente femeninos frecuentemente presentan virilización, hirsutismo y cambio de voz en la pubertad. Pueden encontrarse estigmas de síndrome de Turner. La mayoría de los pacientes tienen un mosaico que incluye una línea celular X0 y otra línea celular que tiene Y (7).

En el 90% de los casos de diagnósticos prenatales 45,X/46,XY, se encuentra un fenotipo masculino, este resultado de fenotipo masculino normal preponderante es observado de forma prenatal pero no en el diagnóstico posnatal, ya que solo los individuos fenotípicamente anormales son referidos para estudios citogenéticos (3). El fenotipo descrito en un estudio realizado en el Hospital Saint Vincent de Paul en 1998, fue variable, reportando hipospadias y/o genitales internos anormales, criptorquidia uni o bilateral, micropene así como la falta de fusión en labios mayores (8).

Berkowitz sugirió que cuando una línea celular 45,X invade el primordio genital, la gónada llega a ser una estría gonadal. El reporte del Hospital de Saint Vincent de Paul en 1998 sugiere que la masculinización en varones con mosaico 45,X/46,XY no muestran relación con la proporción de clones 45,X en linfocitos o gónadas. Por otro lado las anomalías del cromosoma Y parecen ser frecuentemente asociado con el mosaico 45,X/46,XY y la relación causa efecto entre estos dos eventos es posible. La gran variedad del fenotipo que muestran los pacientes con complemento cromosómico 45,X/46,XY puede ser inducido por una determinación testicular anormal por genes localizados en el cromosoma Y (8).

Los pacientes con formas específicas de DDS, tienen un riesgo incrementado de desarrollar tumores de células germinales. En este grupo de tumores, se han identificado varias entidades que se han caracterizado por la edad de presentación clínica, la histología, el comportamiento clínico y la constitución genómica. De acuerdo a éstos parámetros Looijenga et al., propusieron una clasificación de 5 tipos de tumores de células germinales, la cual ya ha sido reconocida por la OMS (3). Dicha clasificación se muestra en la tabla 1:

**Tabla 1. Clasificación de los tumores de células germinales de acuerdo a Looijenga et al.**

<b>Tipo</b>	<b>Histología</b>	<b>Origen celular</b>	<b>Sitio anatómico</b>
I	Teratoma/Tumor de saco de vitelino	Células germinales embrionarias	Línea media
II	TCG seminomatoso/no seminomatoso	Células germinales primordiales	Línea media
III	Seminoma espermatocítico	Espermatocito primario	Testículo
IV	Quiste dermoide	<i>Parthogenote</i>	Ovario
V	Mola hidatiforme	<i>Androgenote</i>	Útero

TCG, tumor de células germinales.

En los DDS, solo los tumores de células germinales (TCG) tipo II tienen relevancia, estos se dividen en tumores seminomatosos y no seminomatosos. El síndrome de disgenesia testicular tiene varias características para desarrollar este tipo de cáncer testicular como criptorquidia, infertilidad, se observa desarrollo testicular subóptimo, factores ambientales como xeno-estrógenos y antiandrógenos y posiblemente factores genéticos. (3,9)

Histológicamente, los tumores seminomatosos están compuestos por células germinales primordiales neoplásicas/gonocitos. Los TCG no seminomatosos, se subdividen en carcinoma embrionario, somático y en elementos extra embrionarios. El gonadoblastoma es una lesión formada por células germinales mixtas en diferentes estadios de maduración y de células de soporte pre-Sertoli/granulosa. En 30% de los pacientes con gonadoblastoma, se ha observado un sobre-crecimiento del componente germinal.

La subsistencia de células germinales primordiales en tejido gonadal indiferenciado y cordones sexuales de la gónada disgenética expresan TSPY, y una sub-población de éstas también expresan OCT3/4. Martine y colaboradores suponen que la regulación de OCT3/4 en esas células germinales primordiales resultan en apoptosis, finalmente llevan a la formación de estrías. Sin embargo el riesgo de la expansión clonal en las células germinales OCT3/4 positivas, y TSPY positivas en tejido gonadal indiferenciado y cordones sexuales es alta en frecuencia llevando al desarrollo de gonadoblastoma (3, 9, 10).

El gonadoblastoma afecta casi exclusivamente a pacientes con desordenes del desarrollo sexual, en el que el tumor está fuertemente asociado con la presencia de un cromosoma Y extra, o con la evidencia de secuencias de Y positivas. Se ha encontrado que una región específica del cromosoma Y es crucial para el desarrollo de este tipo de cáncer. Se identificó que la región alrededor del centrómero del cromosoma Y, referida como región GBY (gonadoblastoma on the Y

chromosome), es importante ya que varios genes candidatos son localizados en este fragmento de cromosoma, incluyendo TSPY, el cual codifica para una proteína testicular específica sobre el cromosoma Y, y que se ha encontrado en grandes cantidades sobre las células de gonadoblastoma y en carcinoma in situ. La mayoría de las células precursoras de los tumores de células germinales tipo II muestran una codificación doble positiva para TSPY y OCT3/4. Con lo anterior se creó un modelo en el que la combinación de la inhibición de apoptosis por parte de OCT3/4, y la inducción de proliferación por TSPY, resulta en transformación maligna de las células germinales embriónicas, llevando a carcinoma in situ y gonadoblastoma (3,10).

La expresión anormal de OCT3/4 es el factor de riesgo más conocido para la transformación maligna. OCT3/4 es expresado en todas las células germinales tumorales pluripotenciales y es usado como marcador diagnóstico de carcinoma in situ, gonadoblastoma, seminoma/disgerminoma y carcinoma embrionario. Se expresa normalmente durante los estadios tempranos de la embriogénesis y en las células madre embriónicas. Se requiere para la sobrevivencia de las células germinales primordiales. En el desarrollo gonadal femenino OCT 3/4 se expresa en la oogonia y en los oocitos, y nunca en células germinales incluidas en los folículos, de acuerdo con estas observaciones se cree que hay una regulación a la baja de OCT3/4 cuando las células germinales femeninas entran en meiosis, como resultado OCT3/4 se encuentra expresada de forma importante hasta la semana de gestación 25. En el desarrollo gonadal masculino, OCT3/4 se expresa en los gonocitos en el centro del túbulo, es regulado a la baja durante la maduración de las células germinales, sin embargo se ha observado que OCT3/4 se encuentra anormalmente prolongada en quienes tienen células germinales con retraso en su desarrollo, esto ha sido asociado con procesos neoplásicos (2, 9, 11).

$\beta$ -Catenina se ha visto involucrada en la diferenciación de la célula madre embrionaria en el ratón, por la vía de señalización-transducción Wnt. La mutación de  $\beta$ -Catenina o algún disturbio en su degradación lleva a una acumulación en el núcleo, un proceso implicado en el desarrollo de cáncer. Sin embargo el mecanismo por el cual la  $\beta$ -Catenina participa en la transformación a gonadoblastoma, aun no está clara (2,11,12).

En un estudio realizado por Honecker et al donde se evaluó  $\beta$ -Catenina, se encontró fuertemente positiva durante todos los estadios de desarrollo fetal (localización sub-membranosa). En testículos de adultos normales,  $\beta$ -Catenina se encontró expresada en el citoplasma de las células germinales de estadios tempranos de la espermatogénesis (Espermatogonias A y B). En Carcinoma in situ y en carcinoma intratubular indiferenciado y gonadoblastoma se encontró un patrón similar al de las células germinales fetales, con un citoplasma claro y localización sub-membranosa. Se ha observado que pierde su expresión al progresar a disgerminomas o tumores seminomatosos (12).

Ki67 es un mitógeno de tirosin cinasa; se expresa en testículos normales, y en células de Sertoli, lo que sugiere un mecanismo trófico local complementando al sistema LH-FSH-testosterona. El nivel de transcripción correlaciona con la presencia de espermatogénesis normal, mientras que la expresión se ha encontrado disminuida o ausente en espermatogénesis alterada asociada con criptorquidia o atrofia testicular así como con orquitis crónica. También se ha detectado en tumores de células germinales seminomatosos, sin embargo está ausente en los no seminomatosos. Esto sugiere que su expresión en tumores puede aumentar el crecimiento en algunas líneas celulares tumorales (13, 14).

El riesgo de desarrollar tumores de células germinales tipo II en pacientes con DDS puede ser clasificado en diferentes niveles: alto, moderado o intermedio, bajo y desconocido.

Los pacientes de alto riesgo son pacientes con disgenesia gonadal con la región GBY en su genoma y con gónadas intra abdominales, pacientes con insensibilidad parcial a los andrógenos con criptorquidia y pacientes con síndrome de Frasier y Denys-Drash. El porcentaje de riesgo va de 15 a 60%.

El riesgo intermedio son pacientes con secuencias de Y positivas como Síndrome de Turner y deficiencia de 17 beta hidroxisteroide deshidrogenasa, disgenesia gonadal, o insensibilidad parcial a los andrógenos; las dos últimas categorías con gónadas en escroto.

Las células germinales en las gónadas indiferenciadas pueden presentar cambios benignos, y presentar retraso en su maduración, los cuales son muy difíciles de distinguir de lesiones neoplásicas in situ. Sin embargo estas condiciones benignas pueden, en algunos casos tener predisposición a malignizarse. Por esta razón la gonadectomía en pacientes con desordenes de diferenciación sexual se realiza profilácticamente a edades tempranas. (9,15).

La prevalencia de tumor de células germinales en disgenesia gonadal es alrededor del 12 al 40%. Sin embargo esta puede ser una pequeña parte ya que no se han establecido criterios para el diagnóstico de cambios neoplásicos tempranos en niños pequeños, llevando a una interpretación diferente de los resultados (7,8,15).

La posición ectópica del testículo disgenético incrementa el riesgo debido a que la prevalencia del tumor de células germinales en la criptorquidia simple es estimado como riesgo 4 a 10 veces mayor a la prevalencia normal de 6 a 11 por 100 000 (15).

### III. ANTECEDENTES

En un estudio realizado por Marie F y colaboradores de 6 pacientes con gónadas disgenéticas con GB se realizaron los marcadores c-KIT, PLAP, OCT3/4 y TSPY, reporta que el GB esta compuesto por células germinales en diferentes estadios de maduración, pudiendose encontrar células germinales inmaduras, normales y CIS de testículo. C-KIT se encontró positivo en 3 de 6 muestras con gonadoblastoma, mientras que en las 6 muestras se encontraron positivas OCT3/4 y PLAP solo en las células germinales inmaduras, y TSPY en las células germinales maduras. Se concluyó que previo al desarrollo de tumores de células germinales se involucra la selección y expansión clonal de células germinales, positivas para OCT3/4 y TSPY. C-Kit no es un marcador confiable para detección de Gonadoblastoma. PLAP se encontró positivo en Gonadoblastoma y en formas invasivas. (10).

En un estudio previo de nuestro grupo se analizaron las gónadas de 7 pacientes con diagnóstico de DGM, todos con gonadoblastoma, algunos acompañados de disgerminoma, testículos disgenéticos y estrías gonadales. OCT3/4 se encontró estaba positivo en el núcleo de las células germinales inmaduras del gonadoblastoma, sin embargo no estaba positiva en las células maduras del gonadoblastoma, en las células de la periferia del tumor ni en los testículos disgenéticos. El marcador B catenina estaba ausente en los testículos disgenéticos y sobreexpresada en células germinales inmaduras de gonadoblastoma (11).

En otro reporte de nuestro grupo se analizó la distribución de XY en otros 5 casos de pacientes con cariotipo 45X/46XY y gonadoblastoma, se encontró que había una mayor distribución de XY en la zona del gonadoblastoma que en el resto del testículo disgenético o la estría gonadal, esto hace suponer que la presencia de material cromosómico Y participa en la patogénesis del tumor. El hallazgo de que el gen TSPY localizado en el locus GBY (gonadoblastoma locus on the Y chromosome), participa en la transformación a malignidad es consistente con las observaciones mencionadas. La alta proporción de línea celular Y en el tumor sugiere la sobre expresión de TSPY (16).

En un estudio de Martine Cools en donde se estudió la morfología e inmunología de 40 gónadas sin aparente transformación neoplásica de pacientes de edades entre 17 semanas de gestación y 25 años, y se compararon con las características morfológicas e inmunohistoquímicas de 20 muestras de gonadoblastoma/disgerminoma, Las gónadas estudiadas se obtuvieron de pacientes con cariotipo 46XX, 46XX/46XY, 45X/46XY y 46XY, se encontraron 4 patrones de histología de la gónada disgenética: tejido testicular, ovárico, estría y tejido gonadal indiferenciado. La diferencia del tejido gonadal indiferenciado con la estría fue que contiene células germinales, pero no está organizada en túbulos seminíferos ni folículos. Las células germinales fueron

marcadas para TSPY, OCT3/4, c-Kit, PLAP y VASA. La expresión de TSPY nunca se encontró en ovarios. Sin embargo se encontró abundantemente expresado en testículos disgenéticos y tejido gonadal indiferenciado comparado con la intensidad en gónadas fetales y normales, sugiriendo un incremento en la expresión de TSPY cuando las células germinales se encuentran en un ambiente desfavorable (17). Se reportó la presencia de OCT3/4 y PLAP con alta intensidad en testículo, tejido gonadal indiferenciado, gonadoblastoma y disgerminoma; c-Kit se encontró de igual intensidad en los mismos tejidos, sin embargo también se encontró expresado con alta intensidad en ovarios, esto corrobora q OCT3/4, c-Kit, PLAP están bien establecidos como marcadores en varios tumores de células germinales (12,18). Y finalmente se encontró a VASA altamente expresado en testículo, tejido gonadal indiferenciado, ovario y gonadoblastoma y puede estar presente o no en disgerminomas. En general se identificó en las gónadas disgenéticas sin tumor de células germinales la presencia de áreas con diferenciación testicular y/o ovárica y áreas de gónada indiferenciada (13 de 40). En una sub-población de células germinales en estas áreas indiferenciadas se encontró positivo OCT3/4, c-Kit, PLAP y TSPY. En las gónadas con gonadoblastoma se encontraron de forma adyacente a la lesión áreas de tejido gonadal indiferenciado con las mismas características (10 de 20). Basados en estas observaciones, se sugiere que el origen del gonadoblastoma es por la persistencia de células germinales positivas en áreas de tejido gonadal indiferenciado. Se reportó una incidencia de 35% de tumor de células germinales en el total de las gónadas. El retraso en la maduración de células germinales, como se describe en condiciones intersexuales y pacientes con anomalías cromosómicas, es caracterizada por la expresión prolongada de estos marcadores y es considerada un factor de riesgo para la transformación maligna (17, 18, 19)..

## **V. JUSTIFICACIÓN**

La prevalencia de tumores de células germinales en gónadas disgenéticas oscila entre el 12 al 40% en pacientes con TDS y alteraciones de los cromosomas sexuales.

El riesgo de desarrollar un tumor de células germinales en pacientes con criptorquidia va de 4 a 10 veces la prevalencia normal (6-11 por 100 000). En estos casos existe también una gran limitación para el diagnóstico temprano de dicha patología.

La presencia de tejido gonadal disgenético ha sido identificado como precursor de gonadoblastoma. El tener la disponibilidad de marcadores para los diferentes estados del desarrollo de células germinales, permite predecir el desarrollo tumoral temprano en los pacientes con riesgo de desarrollar gonadoblastoma.

El presente trabajo se justifica en el hecho de que no existen suficientes estudios que hayan evaluado la presencia de marcadores genéticos de riesgo para el desarrollo de gonadoblastoma en niños con DGM antes del desarrollo de gonadoblastoma.

## **VI. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL:**

Conocer si los patrones de expresión de OCT3/4, KI67,  $\beta$ -CATENINA en gónadas disgenéticas de pacientes con DGM son de utilidad para conocer el riesgo de desarrollar gonadoblastoma.

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS:**

- Evaluar la expresión y co-localización de los marcadores de progresión tumoral OCT3/4, KIT,  $\beta$ -catenina, TSPY en diferentes líneas celulares presentes en las gónadas de los pacientes con Disgenesia Gonadal Mixta.
- Identificar en que estirpe celular se identifican estos marcadores de riesgo tumoral.
- Describir la función gonadal y el fenotipo gonadal y genital de los pacientes con DGM.

## **VII. MATERIAL Y METODOS:**

### **DISEÑO DE INVESTIGACIÓN:**

El presente estudio es un trabajo descriptivo, transversal.

### **DEFINICIÓN DEL UNIVERSO:**

Pacientes con diagnóstico de Disgenesia Gonadal Mixta del Hospital Infantil de México Federico Gómez de la clínica de trastornos de la diferenciación sexual identificados en el periodo 1990 a 2010.

### **CRITERIOS DE INCLUSION:**

Pacientes con diagnóstico de DGM de la clínica de trastornos de la diferenciación sexual del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Estar de acuerdo en participar en el estudio y firmar carta de consentimiento informado por padres o tutores y de asentimiento en caso de ser mayor de 8 años.

### **CRITERIOS DE EXCLUSION:**

No contar con tejido gonadal disponible para el estudio genético e histológico.

### **DEFINICION DE LAS VARIABLES**

#### **VARIABLES:**

*OCT3/4* (octamer binding transcription factor)

Definición conceptual: Es un factor de transcripción específico de células germinales indiferenciadas utilizado como marcador diagnóstico de TCG.

Definición operacional: Presencia o no de dicho marcador valorado por inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.

Tipo de variable: nominal, dicotómica.

*KI67:*

Definición conceptual: Es una proteína característica de las células germinales primordiales, que induce proliferación celular.

Definición operacional: Presencia o no de dicho marcador valorado por inmunihistoquímica e inmunofluorescencia.

Tipo de variable: nominal, dicotómica.

*$\beta$  Catenina:*

Definición conceptual: Es un factor de transcripción que está involucrado en la diferenciación de célula madre embriónicas por la vía de señal de Wnt.

Definición operacional: Presencia o no de dicho marcador valorado por inmunihistoquímica e inmunofluorescencia.

Tipo de variable: nominal, dicotómica.

*Función gonadal:*

Definición conceptual: Es la respuesta gonadal representada por la producción de hormonas sexuales posterior a la estimulación con hormona gonadotropina corionica humana.

Definición operacional: Es la medición de testosterona basal, a las 24 hrs, 48 hrs y 72 hrs posteriores a la estimulación con 5000 UI de gonadotropina corionica humana dividida en tres dosis y con aplicación c 24 hrs los días 1, 2 y 3, obtenida por muestra de sangre y expresada en ng/dL por técnica de quimioluminiscencia. Se considera respuesta adecuada cuando a las 72 hrs se tiene un incremento de testosterona en rangos puberales.

Tipo de variable: Escala, ordinal.

VARIABLE INDEPENDIENTE:

Disgenesia Gonadal Mixta.

#### VARIABLE DEPENDIENTE:

Marcadores genéticos OCT3/4, KIT,  $\beta$ -CATENINA Y TSPY

Función gonadal

#### TAMAÑO DE LA MUESTRA:

Se incluirán los pacientes con diagnóstico de Disgenesia Gonadal Mixta identificados del año 1990 al 2010, de quienes se cuente con tejido gonadal en bloque de parafina o tenga gonadectomía programada.

#### GÓNADAS

Se utilizarán gónadas de pacientes con un rango de edad de 1 año 8 meses a 19 años 8 meses con diagnóstico clínico e histopatológico de Disgenesia Gonadal Mixta con cariotipo 45X/46XY, obtenidas por gonadectomía o biopsia gonadal. Todos los pacientes son de origen mestizo Mexicano. Todos los pacientes tienen historia familiar negativa para ambigüedad de genitales, consanguinidad, neoplasias y enfermedades genéticas.

#### MÉTODO:

Se identificarán los pacientes de la clínica de trastorno de la diferenciación sexual con diagnóstico de DGM, se revisarán las características de cada paciente como, edad, fenotipo, características de genitales, prueba de estimulación con gonadotropina, cariotipo en sangre, estudios de imagen, cirugías realizadas y estudios histopatológicos. Se localizará a los pacientes a quienes previamente se les ha realizado gonadectomía o toma de biopsia gonadal y se ubicarán los bloques de parafina de patología. Los bloques serán revisados nuevamente por la experta en esta área. Con el tejido de los bloques de parafina se realizará cariotipo en gónada y estudio de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia para determinar la presencia de los marcadores genéticos OCT3/4, KIT,  $\beta$ -CATENINA Y TSPY.

En el caso de los pacientes en quienes no se ha realizado gonadectomía, se realizará nueva valoración clínica y de función gonadal para valorar realización de gonadectomía o toma de biopsia gonadal y una vez obtenido el tejido se realizará análisis histopatológico y genético.

## INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOFLUORESCENCIA

Las biopsias de cada caso fueron fijadas con formol al 3.5% en PBS durante 24 hrs (Tabla A). El material se deshidratará utilizando una serie de alcoholes graduales, se eliminará el exceso de parafina con xileno y se incluirá en Paraplasto (Oxford Labware). Se harán cortes de 5  $\mu\text{m}$  y se desparafinarán con xileno y se rehidratará en una serie gradual de etanol.

### A. Inmunoperoxidasa

Una vez que las laminillas son rehidratadas se lavaron con agua destilada y con solución salina de fosfos (PBS) (ver tabla 6) a pH 7.2. Con el propósito de preservar la integridad de los antígenos del tejido, las laminillas serán tratadas con amortiguador de citratos 1X (DakoCytomation, Target Retrieval Solution) y serán sometidas a 20 a 25 lbs de presión y 121°C durante 5 min. Se dejarán enfriar durante 20 min. El peróxido de hidrógeno será bloqueado con una solución de peróxido de hidrógeno al 1% durante 10 min. a una temperatura ambiente. Los cortes se lavaron con PBS-Tween 20 (PBS-T20) y se incubarán 10 min. a temperatura ambiente con una solución bloqueadora de proteínas (Biogenex, USA). Una vez decantado el bloqueador, las preparaciones se incubaron 20 min. en cámara húmeda a temperatura ambiente con el anticuerpo primario en una dilución 1/100 (DakoCytomation, Atibody Diluent cat S0809). En todos los casos se realizará un análisis de control negativo, incubando el tejido con PBS y bloqueador de proteínas. Una vez lavados los cortes PBS-Tween20 se incubarán por 20 min con el anticuerpo secundario que es un polímero antiIgG de ratón/conejo/cabra conjugado con estreptavidina-peroxidasa (Dako, USA). La reacción enzimática será revelada empleando la solución de sustrato cromógeno durante 10 min (kit LSAB+Sys/HRP, Dako-Cytomation, Carpintería, CA, cat K0679) contrastadas con hematoxilina, usando entellan como medio de montaje. Las muestras se observarán empleando un microscopio de campo claro (Axioskop 2 FS plus, Zeiss) a 10X, 40X y 100X aumentos. Se tomaron fotos con una cámara AxioCam HR (Zeiss).

### B. Inmunofluorescencia.

Las laminillas rehidratadas (serie gradual de etanol), se lavarán con agua destilada y PBS a pH 7.2. Con el propósito de preservar la integridad de los antígenos del tejido, las laminillas se tratarán con amortiguador de citratos 1X y serán sometidas a una presión 20 a 25 lbs/pulgada y 121°C durante 5 min. Se dejarán en friar durante 20 min. y se lavaron con PBS-T20, se incubarán 10 min. a temperatura ambiente con una solución bloqueadora de

proteínas. Una vez decantado el bloqueador, las preparaciones se incubarán 20 min en una cámara húmeda a temperatura ambiente con el anticuerpo primario (1/100). Posterior a los lavados el material se incubará nuevamente bajo las mismas condiciones con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón hecho en cabra y acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC). Las muestras fluoresceinadas serán tratadas con RNAsa 20 min y lavadas con una solución SSC 2X (ver tabla 6). Se contrastarán con yoduro de propidio (tinción nuclear) y como medio de montaje y potenciador de la fluorescencia se utilizará vectashiel (Vector, USA). El análisis de inmunofluorescencia se llevará a cabo en un microscopio confocal Axiovert 100M Software LSM 510, empleando un Laser de 488nm y 543 nm, así como filtros de pase corto (BP 505-530) para FITC y pase largo (LP 560) para las tinciones de contraste del núcleo o citoplasma.

#### Doble Inmunofluorescencia.

Las laminillas rehidratadas en una serie gradual de etanol se lavarán con agua destilada y con PBS pH 7.2. Con el propósito de mantener los antígenos del tejido, las laminillas se trataron con amortiguador de citratos 1X y sometidas a una presión de 20 a 25 lbs/pulgada y 121°C durante 5 min. Se dejarán enfriar durante 20 min. Después los cortes se lavarán con PBS-T20 y se incubarán 10 min. a temperatura ambiente con una solución bloqueadora de proteínas. Una vez decantado el bloqueador, las preparaciones se incubarán toda la noche a 4°C en una cámara húmeda con el anticuerpo primario anti-OCT3/4 (1/100). Después de los lavados con PBS-T20, los cortes se incubarán 20 min con el anticuerpo secundario anti-ratón fracción IgG2b acoplado a CY5 (Alexa, Company) durante 1 hr. Transcurrido el tiempo y posterior a los lavados, se incubarán con el segundo anticuerpo anti-β-catenina (1/100) acoplada en la fracción Fab a FITC\*\* durante 2 hrs. Finalmente las laminillas serán lavadas con una solución SSC 2X y se adicionó vectashiel como medio de montaje. El análisis de inmunofluorescencia se llevó a cabo con un microscopio confocal Axiovert 100M Software LSM 510, empleando los Laser de 488 y 543 nm, así como filtros de pase corto (BP 505-530) para FITC y pase largo (LP 560) para CY5.

#### Marcaje de Anticuerpo primario con FITC \*\*

El anticuerpo primario anti-β-catenina subclase IgG1-Kappa será acoplado a fracciones Fab previamente marcadas con FITC, basados en el protocolo de marcaje Zenon Mouse IgG labeling Kits (Molecular Probes, USA). Para ello se incuban 200µg/ml del anticuerpo con 5 µL de la solución de IgG marcado anti-ratón Zenon®, durante 5 min. a temperatura

ambiente, transcurrido el tiempo se adicionó 5 µL de la solución de bloqueo y se incubará por 5 min. más a temperatura ambiente. El anticuerpo marcado será almacenado a 4°C, protegiendo de la luz hasta su uso. Las soluciones utilizadas se observan en la tabla 2

#### PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

I. PBS 1X	Cloruro de sodio NaCl	11.94 gr
	Fosfato de Na	8.51 gr
	Aforar con agua despitada a 1000 mL	
II. Formol al 3.5% en PBS 1X, pJ 7.2	Formaldehído al 37% CH <sub>2</sub> O	9.45 ml
	PBS 1X	100ml
III. Solución de SSC20X, pH 7.0	Cloruro de sodio NaCl	175.3 gr
	Citrato de Sodio	88.2 gr
	H <sub>2</sub> O inyectable	1000 mL

#### ANALISIS DE LABORATORIO:

Prueba de estimulación con gonadotropina corionica humana:

Se toma una muestra de sangre basal y 24 hrs, 48 hrs y 72 hrs posteriores a la administración de 1500 UI de gonadotropina corionica humana por día por 3 dosis administradas de forma intramuscular cada 24 hrs apartir del día 1. Se mide Testosterona diariamente por 4 días consecutivos.

Para procesar la muestra de sangre y medir testosterona se utiliza el inmunoensayo enzimatico quimioluminiscente competitivo en una fase sólida en un analizador IMMULITE.

Se considera respuesta adecuada cuando a las 72 hrs se tiene un incremento de testosterona en rangos puberales.

#### ANALISIS ESTADÍSTICO:

Se realizará estadística descriptiva, con medidas de tendencia central y dispersión. Se comparará la frecuencia de la expresión de cada uno de los marcadores en individuos con DGM, así como la función gonadal y el fenotipo del paciente.

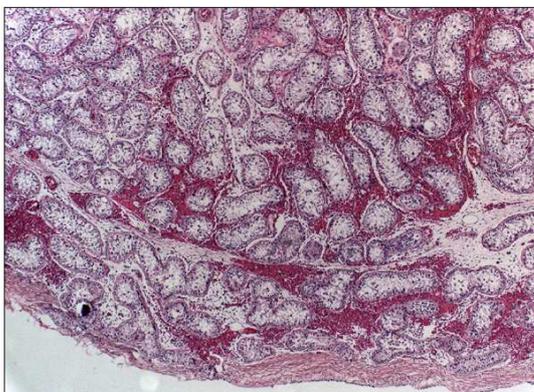
## VIII. RESULTADOS

Se estudiaron 12 gónadas de 8 pacientes con diagnóstico clínico, citogenético e histopatológico de Disgenesia Gonadal Mixta (testículo disgenético y estría contralateral), de los casos estudiados 2/12 están en rol femenino, 7/8 tienen cariotipo 45XO/46XY. Los genitales externos en su mayoría fueron genitales ambiguos, y fue el motivo de consulta en 6/8 pacientes. De acuerdo a la escala de Prader, en 1/8 se encontró un Prader II, 5/8 tuvieron Prader III, 1 presentó Prader IV. En el caso 2 se encontró una paciente en rol femenino sin ambigüedad genital únicamente se observó hipoplasia de labios menores.

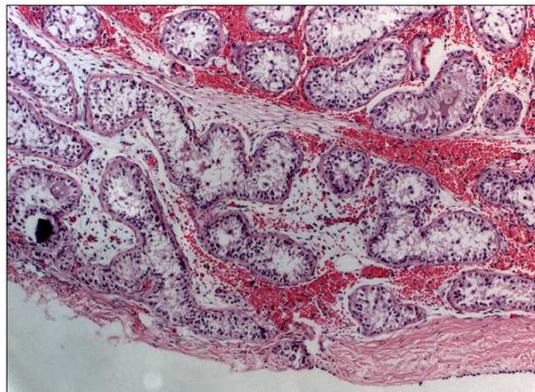
De las 12 muestras estudiadas 2 se obtuvieron por biopsia y 10 fueron obtenidas por gonadectomía (Tabla 1). El estudio histopatológico indicó que 4/12 gónadas eran estrías y las 8 restantes testículos disgenéticos (Figura 1).

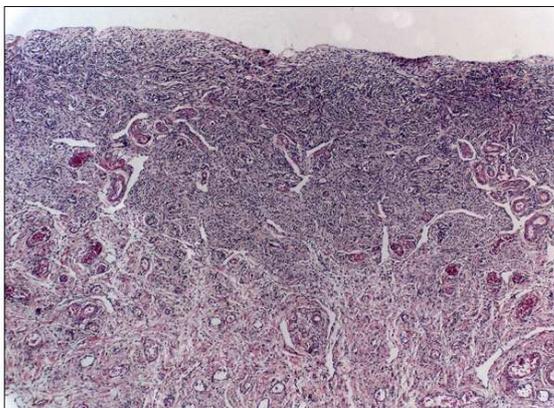
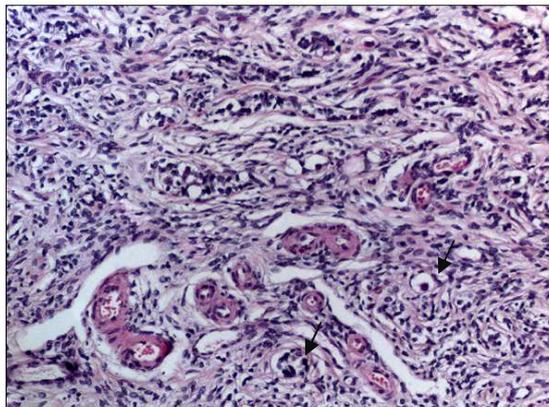
**Figura 1. A y B corresponden al caso 4 muestran testículo disgenético con disminución de células germinales, presencia de túbulos seminíferos en la albugínea y calcificación intratubular. C y D corresponden al caso 7 muestran una cintilla (estría) gonadal constituida por estroma similar al que se observa en el ovario y escasas células grandes, redondas similares a células germinales.**

A



B



**C****D**

En todos los pacientes incluidos en el estudio se siguió el protocolo de abordaje de TDS, en la prueba inicial de reserva testicular con GCh se encontró conservada en 6/7 pacientes, de los cuales 4 se encontraban en la minipubertad. Durante el seguimiento de los casos, se observó que en 3/5 disminuyó la función testicular en un periodo de tiempo de 3 a 8 años, en el caso 5 mejoró la reserva en un periodo de 1 año de una a otra valoración, sin embargo no alcanzó niveles aceptables y en el paciente 8 se encontró conservada 12 años después (Tabla 2).

Una de las complicaciones más graves en estos pacientes es el desarrollo de tumor de células germinales, por lo que se estudiaron marcadores de progresión neoplásica en los tejidos gonadales incluidos en parafina. Se analizaron 12 gónadas, sólo en 3 pacientes se analizaron las 2 gónadas (tabla 3). Se realizó inmunohistoquímica del factor de transcripción OCT3/4, el cual es considerado como un indicador de células germinales indiferenciadas. Éste marcador fue positivo en 10/12 gónadas analizadas (Figura 2) y se identificó fuera y dentro de los túbulos seminíferos así como en las estrías en algunas células de tejido gonadal indiferenciado. Estudios anteriores mostraron que en el gonadoblastoma OCT3/4 co-localizaba con  $\beta$ -catenina en células germinales indiferenciadas sugiriendo que la activación de esta vía podría ser la que indujera el desarrollo tumoral. En nuestra muestra de gónadas disgenéticas sin gonadoblastoma se identificó  $\beta$ -catenina solo en 2/12 (caso 3 y 5), y únicamente en el caso 5 se co-localizó con OCT3/4 lo que sugiere un mal pronóstico en este paciente. Sin embargo al no coexistir OCT3/4 y  $\beta$ -catenina en el resto de las muestras hace pensar que  $\beta$ -catenina participa en un estadio posterior en la progresión neoplásica. El análisis del KI67 fue positivo en 7/12 pacientes lo que muestra proliferación en estas gónadas.

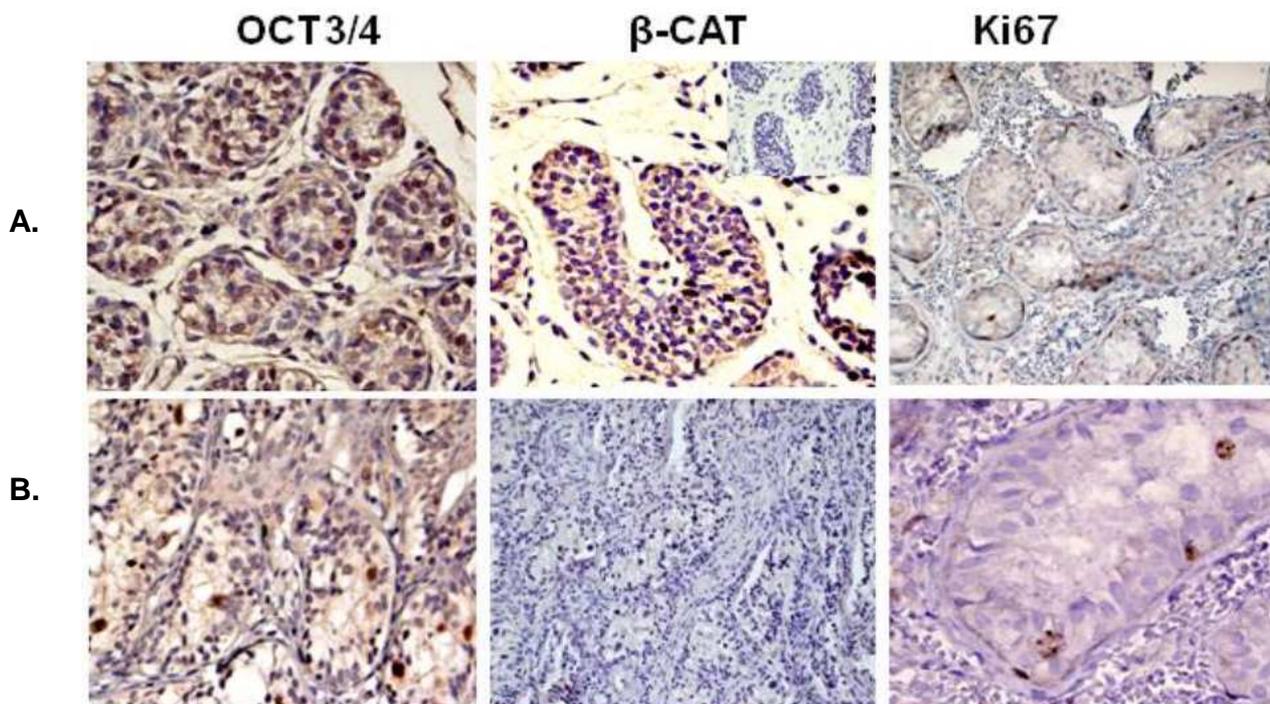
**Figura 2. Inmunohistoquímica de los marcadores OCT3/4,  $\beta$ -Catenina, Ki67. (Los marcadores positivos se observan en color café debido al marcaje con inmunoperoxidasa).**

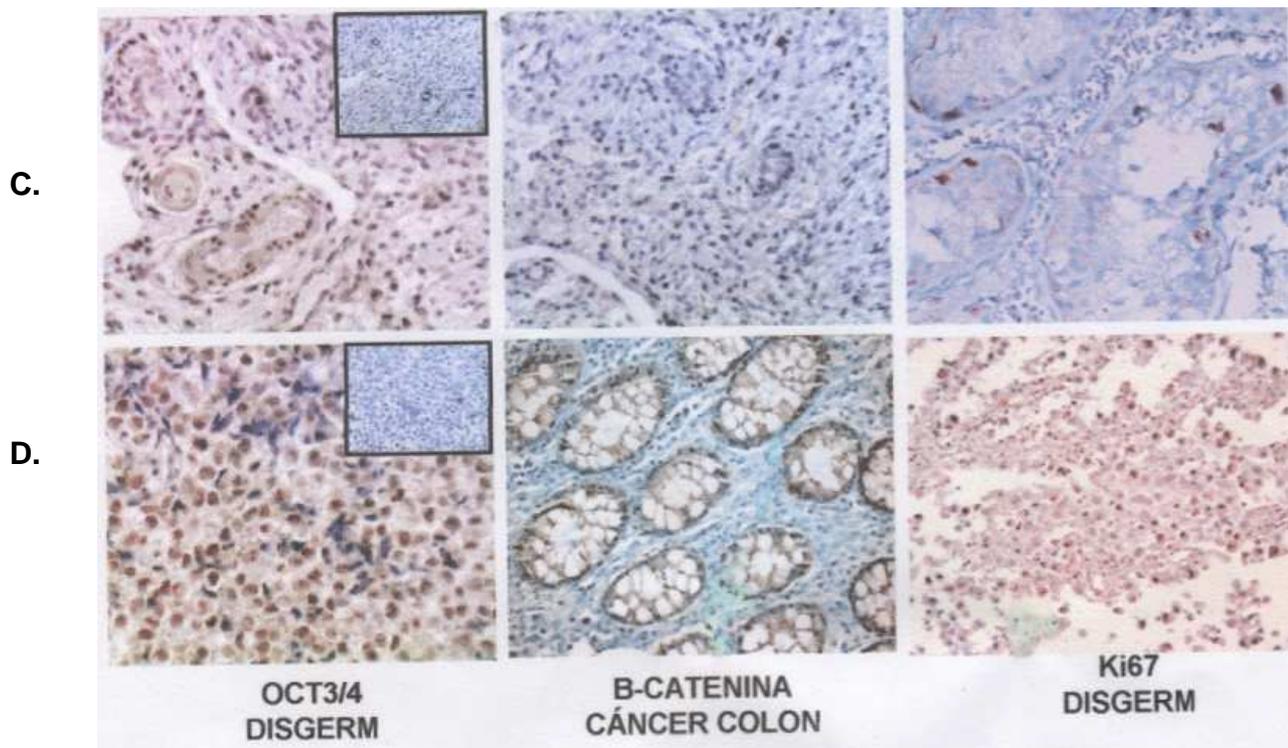
**A. Testículo disgenético izquierdo (Caso 5), en la imagen central se observa  $\beta$ -Catenina presente en el núcleo de las células germinales Indiferenciadas, OCT3/4 y Ki67 son negativos.**

**B. Testículo disgenético derecho (Caso 4), se muestran positivos OCT3/4 en la imagen izquierda, y Ki67 en la imagen derecha, ambos en el núcleo de células germinales inmaduras.**

**C. Estría (Caso 7), se aprecian escasas células germinales que corresponden a una zona de tejido gonadal indiferenciado, se observan positivos OCT3/4 en la imagen izquierda y Ki67 en la imagen derecha.**

**D. Controles, en la imagen derecha e izquierda se observa disgerminoma como control positivo para OCT3/4 y Ki67 y en la imagen central se observa tejido correspondiente a cáncer de colon para mostrar la positividad de  $\beta$ -Catenina.**





## IX. DISCUSIÓN:

La disgenesia gonadal Mixta es una de las causas frecuentes de TDS con alteraciones cromosómicas y ambigüedad genital (2). La presentación clínica de esta patología es con genitales externos que pueden presentarse desde femeninos normales a masculinos normales en apariencia, pero más frecuentemente tienen características ambigüas. Las gónadas se caracterizan por estría gonadal de un lado y testículo disgenético o de apariencia normal contralateral. En todos los pacientes estudiados la función testicular se encontró conservada al inicio de la vida y esta función fue variable durante su evolución, en algunos casos puede llegar a iniciar pubertad, como se observa en nuestro paciente número 8. Sin embargo, la más grave de las complicaciones de esta patología es el desarrollo de tumor de células germinales. Los tumores de células germinales en los pacientes con TDS se inician como una lesión premaligna conocida como gonadoblastoma este tumor esta constituido por células germinales de gran tamaño similares a las observadas en el seminoma/disgerminoma y células derivadas de cordones sexuales que semejan células inmaduras de Sertoli/granulosa. Estos elementos están íntimamente relacionados y forman nidos redondos u ovalados de diversos tamaños, separados por bandas de tejido conectivo y contenidos por una célula basal gruesa. Frecuentemente presenta depósitos hialinos y las células germinales pueden mostrar una actividad mitótica aumentada mientras que los derivados de los cordones sexuales no muestran mitosis. En algunos nidos pueden observarse

calcificaciones; y en un elevado porcentaje maligniza a TCG tipo II. Los mecanismos por los cuales las células germinales adquieren totipotencialidad y capacidad de proliferación tumoral son desconocido. Se menciona que las células germinales indiferenciadas tienen características muy similares a las células madre, y que éstas se pierden conforme se diferencia la gónada. En el estudio de marcadores tumorales algunas de las moléculas que participan en el proceso de transformación neoplásica, han sido descritas en gonadoblastoma y en seminoma/disgerminoma (3,5). Sin embargo existen pocos trabajos que hayan descrito el comportamiento de estos marcadores en gónadas disgenéticas que nos ayuden a tomar decisiones en el manejo quirúrgico de estos pacientes. En este trabajo se analizaron 12 gónadas con el objetivo de conocer la expresión de los marcadores OCT3/4,  $\beta$ -catenina, c-kit en las gónadas sin gonadoblastoma de pacientes con DGM y eventualmente plantear hipótesis que pudieran ayudar a conocer el riesgo de malignización y el proceso de desarrollo tumoral en las gónadas de éstos pacientes.

De los pacientes incluidos en este estudio el 87.5% presentó el cariotipo clásico 45,X/46,XY y un paciente 46,XY, en éste último caso no se realizó estudio citogenético en la gónada para establecer la presencia de otra línea celular que habitualmente es 45,X0. Sin embargo, el cariotipo 46,XY en pacientes con DGM está descrito (2,5,6).

En 75% de los pacientes se observó ambigüedad genital, la escala de Prader encontrada fue de la II – IV. Nuevamente estos datos concuerdan con lo descrito en la literatura (2,5,6).

De acuerdo a los datos obtenidos en éste estudio, podemos sugerir que independientemente que se tenga una adecuada producción de testosterona entre el primero y segundo años de vida, ésta tiende a perderse paulatinamente, debido a la presencia de la línea 45,X y al testículo disgenético, ambos factores podrían condicionar una inadecuada producción de testosterona. Sin embargo, ante una gónada descendida con reserva testicular normal, es complicado tomar una decisión en el manejo quirúrgico así como la aceptación por parte de los padres.

En el estudio de Martine et al. se encontraron 4 patrones de histología de la gónada disgenética: tejido testicular, ovárico, estría y tejido gonadal indiferenciado. En el tejido gonadal indiferenciado o tejido testicular con OCT3/4 positiva sobre la lamina basal, en donde se encuentran una alta concentración de células germinales tumorales, concluyendo que el tejido gonadal indiferenciado es la región en donde se inicia la formación del gonadoblastoma. La progresión tumoral inicia en células germinales indiferenciadas. (17).

La histología de nuestros casos fueron 3 estrías y 9 testículos disgenéticos y los estudios de inmunohistoquímica mostraron la existencia de células germinales indiferenciadas y positivas a OCT3/4 en 91.6% de las gónadas; éste resultado sugiere la capacidad de la gónada disgenética y estría gonadal para desarrollar una neoplasia. Sin embargo las moléculas que desencadenan o

aceleran la progresión neoplásica no se conocen. Estudios previos sugirieron a  $\beta$ -catenina como éste factor desencadenante ya que se habían encontrado co-localizados en el núcleo de la célula germinal indiferenciada y c-KIT se expresó como un marcador de proliferación (11), en nuestros casos la presencia de  $\beta$ -catenina y Ki67 se observó en 2 y 7 gónadas respectivamente, lo que indica que en la gónada disgenética  $\beta$ -catenina no es la proteína que promueve el proceso de malignización. En el caso de encontrarse la coexistencia de estas moléculas sugieren que ya se inició el desarrollo tumoral.

De acuerdo a los reportes en la literatura el gen TSPY podría ser un buen candidato para desarrollar el proceso neoplásico ya que fue encontrado abundantemente expresado en células con testículos disgenéticos y tejido gonadal indiferenciado, comparado con la intensidad de TSPY en gónadas fetales y pareado con gónadas normales, lo que sugiere una regulación a la alta de TSPY cuando las gónadas se encuentran en un ambiente desfavorable.

Cuando el tejido testicular, muestra varios grados de disgenesia, contienen células germinales que expresan abundantemente TSPY, algunas de estas células mantienen su expresión para OCT3/4, con el tiempo estas células deberían de morir, sin embargo alguna posibilidad de sobrevivir y proliferar, eventualmente llevando a una expresión clonal y a formación de CIS. Este marcador ya se encuentra en estudio. Sin embargo es necesario realizar estudios de seguimiento para evaluar si efectivamente existe un mayor riesgo de gonadoblastoma en aquellas gónadas que tiene el marcador positivo, o bien este solo se expresa cuando ya se ha desarrollado el gonadoblastoma.

## X. CONCLUSIONES

- 10/12 gónadas estudiadas expresaron el marcador OCT3/4, lo cual refleja el riesgo potencial de éstas gónadas a malignizarse.
- Sólo 2/12 gónadas expresaron  $\beta$ -catenina, lo cual sugiere que otro mecanismo independiente de ésta molécula podría estar involucrado en el desarrollo de gonadoblastoma.
- Los pacientes en quienes se realizó biopsia gonadal y que mostraron positividad en la expresión de OCT3/4 requieren un seguimiento sistematizado en el cual se incluyan pruebas de función gonadal, así como biopsia con la finalidad de evaluar cambios en el comportamiento de los marcadores que pudieran indicar progresión neoplásica.
- Se debe completar el análisis de la expresión de OCT3/4,  $\beta$ -catenina, KI67 y TSPY en tanto en la serie con gónada disgenética como en los gonadoblastomas de la serie previa, para establecer cual combinación de marcadores puede predisponer al desarrollo de neoplasia.
- Hasta no determinar que combinación de marcadores predisponen a desarrollo de neoplasia y mientras no se haga de rutina la búsqueda de éstos marcadores, continuará siendo controversial la realización de gonadectomía profiláctica en pacientes que conservan la función gonadal.

**XI. TABLAS**

**Tabla 1. Características fenotípicas de los pacientes con disgenesia gonadal mixta**

Paciente	Edad	Rol	Cariotipo	Escala de Prader	Obtención del tejido gonadal	Fenotipo gonadal
1	15	Masculino	45XO/46XY	IV	Gonadectomía Gonadectomía	Estría derecha Testículo disgenético izquierdo
2	19a 9m	Femenino	45XO/46XY	Femenino Normal	Gonadectomía	Estría der
3	4a	Femenino	45XO/46XY	III	Gonadectomía Gonadectomía	Estría izq Testículo disgenético derecho
4	4a4m	Masculino	46XY,9qh+,16qh+,22 sat +	II	Gonadectomía	Testículo disgenético derecho
5	3a7m	Masculino	45XO/46X + mar	III	Gonadectomía Gonadectomía	Testículo disgenético derecho Testículo disgenético izquierdo
6	9a1m	Masculino	46XY	III	Gonadectomía	Testículo disgenético derecho
7	1a8m	Masculino	45XO/46XY	III	Biopsia Gonadectomía	Testículo disgenético derecho Estría izquierda
8	12a	Masculino	45XO/46XY	III	Biopsia	Testículo disgenético izquierdo

**Tabla 2. Valoración de reserva testicular con GCh previo a la gonadectomía**

Paciente	Edad en la 1er prueba	Respuesta testicular a las 72 hrs.Ingreso (ng/dl)	Edad en la 2da. Prueba	Respuesta testicular preqx (ng/dl)
1	2a1m	100	10a7m	26.2
2	-----	-----	19a8m	31.3
3	2m	335	-----	-----
4	3m	104	3a9m	<20
5	1a1m	51	2a1m	87.6
6	4m	333	7a6m	24.6
7	3m	254	-----	-----
8	9m	515	1a8m	305

**Tabla 3. Expresión de marcadores de progresión neoplásica**

Paciente	Fenotipo gonadal	Oct3/4	B-catenina	Ki 67
1	Estría derecha	+	-	-
	Testículo disgenético izquierdo	+	-	+
2	Estría derecha	+	-	-
	Estría izquierda	+	+	-
3	Testículo disgenético derecho	-	-	-
	Testículo disgenético izquierdo	-	+	-
4	Testículo disgenético derecho	+	-	+
	Testículo disgenético izquierdo	+	-	+
5	Testículo disgenético derecho	+	-	+
	Testículo disgenético izquierdo	-	+	-
6	Testículo disgenético derecho	+	-	+
	Testículo disgenético izquierdo	+	-	+
7	Testículo disgenético derecho	+	-	+
	Estría izquierda	+	-	+
8	Testículo disgenético derecho	+	-	+
	Testículo disgenético izquierdo	+	-	+

## XII. GLOSARIO

***Disgenesia gonadal:*** Es una formación incompleta de las gónadas, resultado de alteraciones en el proceso de migración de las células germinales y/o su correcta organización e la cresta gonadal fetal.

***Testículo Disgenético:*** Gónada pequeña, redonda u ovalada, de localización intra abdominal o inguinal. Con túbulos seminíferos pobremente diferenciados localizados hacia el centro de la gónada y ampliamente separados de la periferia de tejido conectivo estromal.

***Estría gonadal:*** Remanente gonadal con estroma semejante al del ovario con o sin estructuras primitivas de cordones sexuales pero sin folículos o células germinales bien desarrolladas.

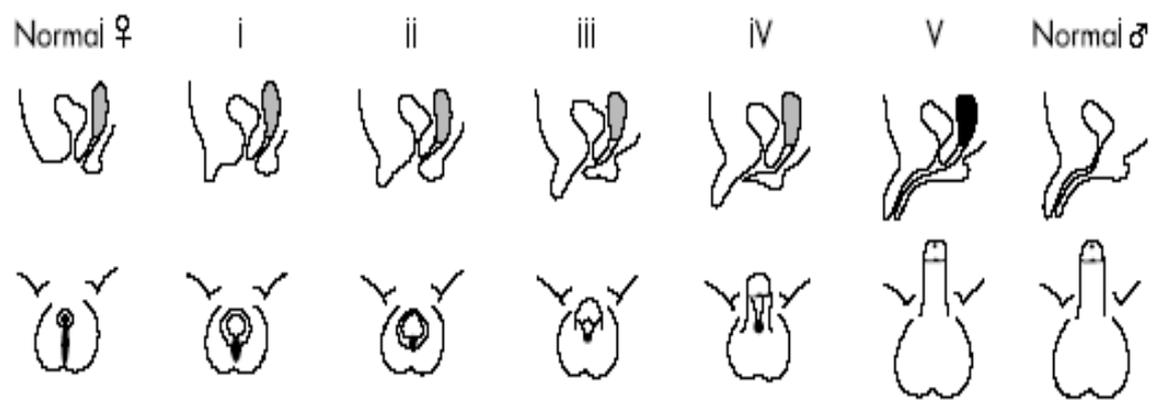
***Gonadoblastoma:*** Tumor de células germinales in situ, constituido por células germinales de gran tamaño similares a las observadas en el seminoma/disgerminoma y células derivadas de cordones sexuales que semejan células inmaduras de Sertoli/granulosa. Estos elementos están íntimamente relacionados y forman nidos redondos u ovalados de diversos tamaños, separados por bandas de tejido conectivo y contenidos por una célula basal gruesa. Frecuentemente presenta depósitos hialinos y las células germinales pueden mostrar una actividad mitótica aumentada mientras que los derivados de los cordones sexuales no muestran mitosis. En algunos nidos pueden observarse calcificaciones.

***Seminoma/disgerminoma:*** Tumor maligno de células germinales compuestos por células uniformes, con citoplasma claro, bordes bien definidos y núcleos vesiculares con uno o mas nucléolos prominentes, que pueden o no organizarse en nidos compactos separados por tabiques de tejido conectivo. Por lo general se asocia a infiltración linfocítica y frecuentemente a inflamación granulomatosa.

### XIII. ANEXOS

#### ANEXO 1

#### ESCALA DE PRADER





## ANEXO 2

### “IDENTIFICACION DE MARCADORES GENETICOS OCT3/4, KIT, $\beta$ CATENINA Y TPSY EN GÓNADAS DE PACIENTES CON DISGENESIA GONADAL MIXTA” HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Dra. Nayely Garibay, Dra. Gloria Queipo, Dra. Rocio Peña, Dra. Patricia Medina, Dra. Carolina Domínguez

#### DATOS GENERALES

Fecha: \_\_\_\_\_ Nombre: \_\_\_\_\_

Registro: \_\_\_\_\_ Originario de \_\_\_\_\_ Fecha nacimiento: \_\_\_\_\_

Edad actual: \_\_\_\_\_ Teléfono: \_\_\_\_\_

#### ANTECEDENTES

Fecha de primer consulta: \_\_\_\_\_ Fecha de última consulta: \_\_\_\_\_

Motivo de consulta: \_\_\_\_\_

Consanguinidad en padres: No \_\_ Si \_\_ Familiares con trastorno de la diferenciación sexual: No \_\_ Si \_\_

Cual: \_\_\_\_\_ Gesta: \_\_\_\_\_ Semanas de Gestación: \_\_\_\_\_

Embarazo de alto riesgo: No \_\_ Si \_\_ . Uso de progestágenos: No \_\_ Si \_\_

Diagnósticos Previos: \_\_\_\_\_

Tratamientos Recibidos: \_\_\_\_\_

#### EXAMEN FÍSICO:

Peso: \_\_\_\_\_ Kg (p. \_\_\_\_\_), Talla: \_\_\_\_\_ cm. (p. \_\_\_\_\_), IMC \_\_\_\_\_ Kg/m<sup>2</sup> (p. \_\_\_\_\_)

Fenotipo:

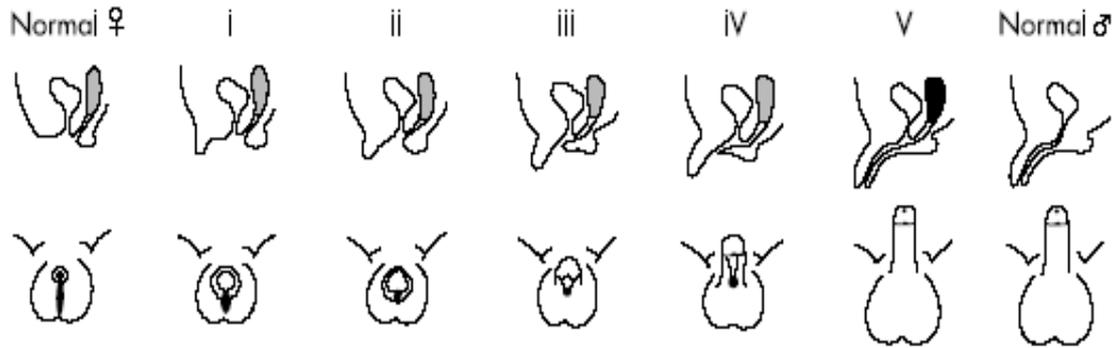
Tanner Mamario: \_\_\_\_\_ Tanner Pubico: \_\_\_\_\_ Tanner Genital: \_\_\_\_\_

Tamaño de falo: \_\_\_\_\_ Ubicación de meato: \_\_\_\_\_ Palpación de gónadas: No \_\_ Si \_\_

Ubicación de gónadas \_\_\_\_\_ Volumen testicular: \_\_\_\_\_

Periné y escroto: \_\_\_\_\_ Escala de Prader: \_\_\_\_\_

#### Escala de Prader



**ESTUDIOS DE LABORATORIO Y GABINETE:**

Curva con Gonadotropina Coriónica

Fecha:	Testosterona	DHT	Relación
Basal			
24 Hrs			
48 Hrs			
72 Hrs			

Fecha:	Testosterona	DHT	Relación
Basal			
24 Hrs			
48 Hrs			
72 Hrs			

Otras Pruebas:

Edad Ósea:

Fecha: \_\_\_\_\_ Edad Cronológica: \_\_\_\_\_ Edad Ósea: \_\_\_\_\_

Otros estudios genéticos: \_\_\_\_\_

Estudios de Imagen: (US, TAC, RM) \_\_\_\_\_

Valoración Psicológica: \_\_\_\_\_

**CIRUGIAS REALIZADAS:**

**ESTUDIOS HISTOPATOLÓGICOS:**

**MARCADORES GENÉTICOS:**

OCT3/4:

c-Kit:

$\beta$ -catenina:

TSPY:



### ANEXO 3

#### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

#### “IDENTIFICACION DE MARCADORES GENETICOS OCT3/4, KIT, $\beta$ CATENINA Y TPSY EN GÓNADAS DE PACIENTES CON DISGENESIA GONADAL MIXTA”

Su hijo (a) ha sido considerado para participar en un estudio de investigación, en el que se busca valorar la existencia de marcadores genéticos que se pueden asociar con la presencia de malignidad en el tejido gonadal debido a su problema de disgenesia gonadal mixta. Algunos estudios han demostrado que éstos marcadores se encuentran presentes cuando ya se ha desarrollado un proceso tumoral, sin embargo no se ha demostrado que dichos marcadores se encuentren presentes antes del desarrollo del proceso tumoral.

El presente estudio consiste en analizar el tejido gonadal por el servicio de patología y genética para determinar las características histológicas y la presencia de los marcadores genéticos. En el caso de que ya se cuente con tejido gonadal solicitamos su autorización para realizar dicho análisis. En el caso de que a su hijo no se le haya realizado antes resección de tejido gonadal, se realizará una prueba de estimulación con gonadotropina para valorar la función actual de la gónada. En el caso de que no exista función adecuada se decidirá retirar la gónada y en el caso de que se encuentre con adecuada función se realizará toma de biopsia.

Para la realización de los procedimientos quirúrgicos (retiro o biopsia de gónada), se deberán cubrir por parte de los padres o tutores los requisitos que marca el hospital para su realización, así como el costo de dicho procedimiento y su ingreso al hospital. Los riesgos para su realización son los mismos que para cualquier procedimiento quirúrgico, los riesgos anestésicos, náusea, dolor, inflamación e infección en el sitio quirúrgico.

El costo de los marcadores genéticos será cubierto por parte del protocolo de estudio.

Por participar en este estudio usted y su hijo(a) no recibirán ninguna compensación económica. Su participación en el estudio es totalmente voluntaria. Los resultados de los marcadores genéticos obtenidos se le entregarán en su consulta de control en el servicio de endocrinología, así como la interpretación de los mismos.

Durante el estudio la doctora responsable del mismo, **Dra. Nayely Garibay Nieto; Investigador; Endocrinóloga Pediatra**, responderán cualquier duda que usted o su hijo tengan acerca de la enfermedad o del estudio, pudiendo dirigirse a la siguiente dirección y/o teléfono Hospital Infantil de México Federico Gómez; Dr. Márquez # 62. Col. Doctores. Delegación Cuauhtémoc. CP 06720. México DF. Teléfono: (55) 52 28 99 17 extensión 1494. El hecho de decidir no participar en el estudio no cambia en lo absoluto la atención médica y el interés que los médicos de esta Institución siempre han tenido con su hijo(a).

Por medio de la presente, yo: \_\_\_\_\_  
(nombre del padre, madre o tutor)

\_\_\_\_\_ del paciente \_\_\_\_\_  
(parentesco) (nombre del paciente que participará en el estudio)

Acepto en forma voluntaria que mi hijo(a) participe en el estudio de investigación. He leído de forma cuidadosa este documento y entiendo todo lo que implica, además que se me ha asegurado que las muestras de tejido gonadal que se tomen serán utilizadas únicamente con los fines propuestos en esta investigación y que los resultados me serán notificados y serán totalmente confidenciales. En caso de que el paciente y/o el tutor no sepan escribir se colocará la huella digital.

\_\_\_\_\_  
**Nombre y firma del paciente**

\_\_\_\_\_  
**Nombre y firma del padre, madre o tutor responsable**

\_\_\_\_\_  
**Nombre y firma del testigo 1**

\_\_\_\_\_  
**Nombre y firma de testigo 2**

**Dirección** \_\_\_\_\_

**Dirección** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
**Nombre y firma del investigador**

**Fecha:** \_\_\_\_\_

## ANEXO 4

### CARTA DE ASENTIMIENTO INFORMADO



#### “IDENTIFICACION DE MARCADORES GENETICOS OCT3/4, KIT, $\beta$ CATENINA Y TPSY EN GÓNADAS DE PACIENTES CON DISGENESIA GONADAL MIXTA”

Has sido considerado(a) para participar en un estudio de investigación, en el que se busca valorar la existencia de marcadores genéticos que se pueden asociar con la presencia de malignidad en el tejido gonadal debido a su problema de disgenesia gonadal mixta. Algunos estudios han demostrado que éstos marcadores se encuentran presentes cuando ya se ha desarrollado un proceso tumoral, sin embargo no se ha demostrado que dichos marcadores se encuentren presentes antes del desarrollo del proceso tumoral.

Para participar en este estudio se tomará una sola muestra de sangre, que nos servirá para medir las grasas y azúcares en la sangre, así como la cantidad de hormonas tiroideas (sustancias producidas por un órgano que se encuentra en el cuello llamado tiroides), lo cual se toma regularmente para tu consulta dado que la obesidad produce que se alteren con el riesgo de lesionar las venas y las arterias del cuerpo.

El presente estudio consiste en analizar el tejido gonadal por el servicio de patología y genética para determinar las catecterísticas de la muestra y la presencia de los marcadores genéticos. En el caso de que ya se cuente con tejido gonadal solicitamos tu autorización para realizar dicho análisis. En el caso de que no te hayan realizado antes algún procedimiento para retirar tejido gonadal, se realizará una prueba de estimulación de la gónada con un medicamento (gonadotropina) para valorar su función actual. En el caso de que no exista función adecuada se decidirá retirar la gónada y en el caso de que se encuentre con adecuada función se realizará toma de biopsia (que consiste en la toma de una pequeña porción de la gónada).

Por participar en el estudio no recibirás ninguna compensación económica. Tu participación en el estudio es totalmente voluntaria. Hacer estos estudios permitirá conocer y tratar de prevenir las complicaciones que pudieran presentarse en un futuro por la enfermedad que presentas.

Los resultados obtenidos se te entregarán en la consulta de control en el servicio de endocrinología, así como la interpretación de los mismos

Los riesgos por participar se limitan a los de la toma de la muestra de tejido gonadal son los mismos que para cualquier procedimiento quirúrgico, los riesgos anestésicos, náusea, dolor, inflamación e infección en el sitio quirúrgico.

Durante el estudio la doctora responsable del mismo, **Dra. Nayeli Garibay Nieto; Investigador; Endocrinóloga Pediatra**, responderán cualquier pregunta que tú o tu familiar responsable tengan acerca de la enfermedad o del estudio, pudiendo dirigirse a la siguiente dirección y/o teléfono Hospital Infantil de México Federico Gómez; Dr. Márquez # 62. Col. Doctores. Delegación Cuauhtémoc. CP 06720. México DF. Teléfono: (55) 52 28 99 17 extensión 1494.

El hecho de decidir no participar en el estudio no cambia en lo absoluto la atención médica y el interés que los médicos de esta Institución siempre han tenido contigo.

Por medio de la presente, yo \_\_\_\_\_  
(nombre del paciente que participará en el estudio)

Acepto en forma voluntaria participar en el estudio de investigación. He leído de forma cuidadosa este documento y entiendo todo lo que implica, además que se me ha asegurado que las muestras de tejido gonadal que se tomen serán utilizadas únicamente con los fines propuestos en esta investigación y que los resultados me serán notificados y serán totalmente confidenciales. En caso de que el paciente y/o el tutor no sepan escribir se colocará la huella digital.

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del paciente

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del padre, madre o tutor responsable

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del testigo 1

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma de testigo 2

Dirección \_\_\_\_\_

Dirección \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del investigador

Fecha: \_\_\_\_\_

