



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

“ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN *INSL3* EN PACIENTES  
MEXICANOS CON CRIPTORQUIDIA IDIOPÁTICA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

**JUAN CARLOS GUTIÉRREZ SANTANA**

DIRECTOR DE TESIS

**Dra. Rosa María Viguera Villaseñor**  
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

ASESOR INTERNO

**Dr. Jorge Flavio Mendoza Rincón**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

Mexico D.F., Mayo 2012





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA.**

**"ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN *INSL3* EN PACIENTES MEXICANOS CON CRIPTORQUIDIA IDIOPÁTICA".**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**BIOLOGO**

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

**JUAN CARLOS GUTIÉRREZ SANTANA.**

**DIRECTOR: DRA. ROSA MARÍA VIGUERAS VILLASEÑOR.**

**ASESOR: JORGE FLAVIO MENDOZA RINCÓN.**



## **AGRADECIMIENTOS.**

La presente tesis representa un propósito cumplido; que sin la colaboración de varias personas no hubiera sido posible.

En primer lugar doy un agradecimiento muy especial a la Dra. Margarita Chávez Saldaña, por haberme brindado la oportunidad de colaborar con este proyecto, por el apoyo y la paciencia que tuvo a pesar de algunas inconsistencias de mi parte, y por los comentarios y enseñanzas que compartió conmigo.

Por otro lado mi admiración y agradecimiento a la Dra. Rosa María Viguera Villaseñor, jefa del Laboratorio de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Pediatría; por aceptar que formara parte del grupo de trabajo del laboratorio, así como por su valioso apoyo, palabras de aliento y consejos que me ofreció durante mi estancia. De igual modo agradezco por la ayuda económica que directa e indirectamente me brindó al otorgarme una beca durante un año.

Al Dr. Jorge Flavio Mendoza Rincón, por la amistad que me ha brindado, por darme la oportunidad de colaborar en su laboratorio, y por los consejos que me ha dado durante la realización de este escrito.

A cada uno de los integrantes del Laboratorio de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Pediatría.

Así mismo, un agradecimiento muy especial al Dr. Juan Osvaldo Cuevas Alpuche del Servicio de Urología del Instituto Nacional de Pediatría, quién nos proporcionó los pacientes necesarios para la realización de esta tesis.

Por otro lado un agradecimiento especial a la Dra. Karla Alejandra Santos Jasso del Dpto. de Urología del Instituto Nacional de Pediatría y a la Dra. Emiy Yocoyama Rebollar del Depto. de Genética Humana del Instituto Nacional de Pediatría quienes participaron activamente durante la realización de este proyecto.

Así mismo, mi sincero aprecio a la Dra. Lucia Taja Chayeb del Laboratorio de Genética Molecular y Farmacogenética del Instituto Nacional de Cancerología (INCAN), por consentir el uso del secuenciador de su laboratorio y por colaborar en la realización de las secuenciaciones.

A cada uno de los sinodales que con sus comentarios enriquecieron este trabajo.

Dra. María Esther Cruz Beltrán.

Biol. José Misael Vicente Hernández Vázquez.

Biol. Itzen Aguiñiga Sánchez.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (UNAM).

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biología de la Reproducción y el Servicio de Urología del Instituto Nacional de Pediatría. La tesis se realizó con el apoyo financiero de los proyectos 87101/2008 (CONACYT), 63/2008 (Recurso Federal, del Instituto Nacional de Pediatría, Secretaria de Salud) y de la beca PROBEI de la C.C.I.N.S.H.A.E. (Comisión Coordinadora de Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad).

## ÍNDICE.

RESUMEN. ....	1
INTRODUCCIÓN. ....	2
ETIOLOGÍA. ....	5
FACTORES ENDÓCRINOS. ....	6
FACTORES ANATÓMICOS. ....	7
FACTORES GENÉTICOS. ....	7
a) Criptorquidia sindrómica. ....	8
b) Genes asociados. ....	9
GEN INSL3. ....	11
GEN RXFP2. ....	17
GEN HOXA10. ....	19
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA. ....	21
JUSTIFICACIÓN. ....	22
HIPÓTESIS. ....	22
OBJETIVOS. ....	22
OBJETIVOS PARTICULARES. ....	23
MATERIAL Y MÉTODO. ....	23
1. CLASIFICACIÓN DEL ESTUDIO. ....	23
2. POBLACIÓN DE ESTUDIO. ....	24
A) POBLACIÓN OBJETIVO: ....	24
B) POBLACIÓN ELEGIBLE: ....	24
3. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE PACIENTES. ....	24
A) CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE PACIENTES. ....	24
B) CRITERIOS DE EXCLUSIÓN. ....	24
4. CONSIDERACIONES ÉTICAS. ....	25
5. ESTRATEGIA GENERAL. ....	25
6. DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO. ....	26
I. EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA. ....	26
II. CUANTIFICACIÓN DE ADN EXTRAÍDO. ....	27
III. EVALUACIÓN DE INTEGRIDAD DEL ADN. ....	27
IV. CUANTIFICACIÓN SÉRICA DE INSL3. ....	28
V. BÚSQUEDA DE VARIANTES ALÉLICAS CONOCIDAS DEL GEN INSL3. ....	29
▪ Análisis de discriminación alélica. ....	29
VI. SECUENCIACIÓN. ....	31
▪ Amplificación del Exón 1 y 2 del gen INSL3 por PCR punto final. ....	31
▪ Purificación de los exones amplificados del gen INSL3. ....	34
▪ Reacciones para secuenciación. ....	35
VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO. ....	36
RESULTADOS. ....	38
BÚSQUEDA DE VARIANTES ALÉLICAS CONOCIDAS DEL GEN INSL3. ....	38
BÚSQUEDA DE VARIANTES ALÉLICAS DESCONOCIDAS DEL GEN INSL3 MEDIANTE EL MÉTODO DE SECUENCIACIÓN. ....	41
CUANTIFICACIÓN SÉRICA DE INSL3. ....	43

CONCLUSIONES. ....	55
ANEXO. ....	65
TABLAS DE SÍNDROMES EN LOS QUE SE PRESENTA LA CRIPTORQUIDIA. ....	65

## FIGURAS.

FIGURA 1 LOCALIZACIÓN DE LOS TESTÍCULOS EN LA CRIPTORQUIDIA. MOSTRANDO SU CLASIFICACIÓN EN BASE A LA UBICACIÓN DE LOS TESTÍCULOS. MODIFICADO DE BAY Y COLS., 2011. -----	2
FIGURA 2. FASES DEL DESCENSO TESTICULAR. EN EL ESQUEMA SE APRECIAN LAS DIFERENTES POSICIONES DEL TESTÍCULO. A Y B MUESTRAN LA FASE TRANSABDOMINAL (INSL3-DEPENDIENTE); C Y D MUESTRAN LA FASE INGUINOESCROTAL (ANDRÓGENO-DEPENDIENTE). MODIFICADO DE FORESTA Y COLS., 2008. ---	4
FIGURA 3. GEN <i>INSL3</i> . A) LOCUS DE <i>INSL3</i> EN EL CROMOSOMA 19, B) ESTRUCTURA DEL GEN, C) PRODUCTO TRANSCRIPCIONAL O ARNM, D) ESQUEMA DEL PÉPTIDO MOSTRANDO LOS DOMINIOS IMPORTANTES DE LA PRE-PROHORMONA Y E) MODELO HIPOTÉTICO DE LA PROTEÍNA. -----	11
FIGURA 4. ESTRUCTURA DE <i>INSL3</i> Y ESQUEMATIZACIÓN DEL PROCESO DE MADURACIÓN DESDE PREPROHORMONA, PROHORMONA Y HORMONA MADURA. MODIFICADO DE FORESTA Y COLS., 2008. ---	12
FIGURA 5. GRÁFICA DE LOS NIVELES SÉRICOS DE <i>INSL3</i> EN DIFERENTES ETAPAS DE DESARROLLO DEL VARÓN. MODIFICADO DE BAY Y ANDERSSON, 2011. -----	13
FIGURA 6. ESQUEMA HIPOTÉTICO DEL RECEPTOR RXFP2, CONFORMADO POR UN PÉPTIDO SEÑAL, DOMINIO EXTRACELULAR, SIETE DOMINIOS TRANSMEMBRANALES Y UN DOMINIO INTRACELULAR. MODIFICADO DE BOGATCHEVA Y COLS., 2007. -----	17
FIGURA 7. ESQUEMA DEL EXÓN 1 DEL GEN <i>HOXA10</i> DONDE SE MUESTRAN ALGUNAS VARIANTES REPORTADAS. TOMADO DE MASSART Y SAGGESE 2010. -----	20
FIGURA 8. GEL DE AGAROSA AL 0.8% MUESTRA LA PRESENCIA DE ADN ÍNTEGRO. CARRIL 1 MARCADOR DE PESO MOLECULAR $\lambda$ - <i>Hind</i> III; LOS CARRILES 2-7 MUESTRAN LA PRESENCIA DE ADN ÍNTEGRO.-----	28
FIGURA 9. COMPLEJO ANTÍGENO MARCADO-ANTICUERPO Y ANTÍGENO PROBLEMA-ANTICUERPO EN LA REACCIÓN DE RADIOINMUNOANÁLISIS. -----	28
FIGURA 10. MÉTODO DE FLUORESCENCIA DE 5' EXONUCLEASA (TAQMAN®) PARA DETERMINACIÓN DE POLIMORFISMOS POR DISCRIMINACIÓN ALÉLICA. -----	30
FIGURA 11. HIBRIDACIÓN DE LA SONDA Y LIBERACIÓN DE FLUOROCROMO DEBIDO A LA ACCIÓN DE LA ENZIMA AMPLITAQ GOLD® ADN POLIMERASA, Y DETECCIÓN DE LAS EMISIONES DE LAS FLUORESCENCIAS DE LOS ALELOS DE CADA UNA DE LAS MUESTRAS. -----	31
FIGURA 12. 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 AMPLIFICADOS, MODIFICADO DE LODISH Y COLS., 2005. -----	33
FIGURA 13. DIAGRAMA DEL PROGRAMA DE PCR PUNTO FINAL PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL EXÓN 1 DE <i>INSL3</i> . -----	33
FIGURA 14. DIAGRAMA DEL PROGRAMA DE PCR PUNTO FINAL PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL EXÓN 2 DE <i>INSL3</i> . -----	34
FIGURA 15. PROGRAMA UTILIZADO PARA EL TERMOCICLADOR 9600 DE PERKIN ELMER. -----	36
FIGURA 16. ANÁLISIS DE DISCRIMINACIÓN ALÉLICAS PARA LAS VARIANTES: A. P.R102C. B. P.R105H EN EL QUE SE MUESTRA QUE EL 100% DE LOS INDIVIDUOS RESULTARON HOMOCIGOTOS NORMALES.-----	39
FIGURA 17. ANÁLISIS DE DISCRIMINACIÓN ALÉLICA PARA EL SNP P.R102H QUE MUESTRA UNO DE LOS PACIENTES CO COMO HETEROCIGOTO. -----	39
FIGURA 18. AMPLIFICADOS DEL GEN <i>INSL3</i> A) CARRIL 1 MARCADOR DE PESOS, DEL CARRIL 2 AL 10 AMPLIFICADOS DE 448PB CORRESPONDIENTE AL EXÓN 1 EN PACIENTES CO, CARRIL 11 CONTROL NEGATIVO B) CARRIL 1 MARCADOR DE PESOS; DEL CARRIL 2 AL 10 AMPLIFICADOS DE 326PB CORRESPONDIENTE AL EXÓN 2 EN PACIENTES CO, CARRIL 11 CONTROL NEGATIVO. -----	41
FIGURA 19. ESPECTROFEROGRAMAS QUE MUESTRAN LA SECUENCIACIÓN DEL EXÓN 1 DEL GEN <i>INSL3</i> DE DOS PACIENTES CO HETEROCIGOTOS, CADA UNO CON UNA VARIANTE ALÉLICA DIFERENTE A) P.L42L Y B) P.A60T. -----	42
FIGURA 20. ESPECTROFEROGRAMAS DE LAS SECUENCIAS ALTERADAS DEL EXÓN 2 DEL GEN <i>INSL3</i> CORRESPONDIENTES AL SNP A) P.T86M Y B) P.R105R. -----	43
FIGURA 21. COMPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS DE <i>INSL3</i> EN PACIENTES CO (COLUMNAS VERDES) VS GRUPO CONTROL (COLUMNAS NARANJAS) MOSTRANDO BAJAS CONCENTRACIONES DESDE LOS 8 AÑOS DE EDAD, Y HACIÉNDOSE MÁS EVIDENTES DESPUÉS DE LOS 14 AÑOS.-----	44

## TABLAS.

TABLA 1. GENES INVOLUCRADOS CON LA CRIPTORQUIDIA. -----	10
TABLA 2. VARIANTES ALÉLICAS ASOCIADAS A LA CO IDIOPÁTICA.-----	15
TABLA 3. CONDICIONES DE LA MEZCLA PARA DISCRIMINACIÓN ALÉLICA DE LAS VARIANTES ALÉLICAS A ANALIZAR.-----	30
TABLA 4. CONDICIONES DE LA MEZCLA DE REACCIÓN DE PCR PARA LOS EXONES 1 Y 2 DEL GEN <i>INSL3</i> . -----	32
TABLA 5. CONDICIONES DE LA MEZCLA DE REACCIÓN PARA LA SECUENCIACIÓN DE LOS EXONES 1 Y 2 DEL GEN <i>INSL3</i> . -----	35
TABLA 6. FRECUENCIA ALÉLICA Y GENOTÍPICA DEL SNP c.3334T>C EN PACIENTES MEXICANOS CON CO IDIOPÁTICA.-----	40
TABLA 7. CORRELACIÓN DEL FENOTIPO CON EL GENOTIPO DE LA VARIANTE c.3334T>C EN PACIENTES MEXICANOS CON CO IDIOPÁTICA.-----	40
TABLA 8. COMPARACIÓN DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS DEL SNP c.3334T>C EN LA POBLACIÓN MEXICANA Y OTRAS POBLACIONES DEL MUNDO. -----	41
TABLA 9. CONCENTRACIONES SÉRICAS DE <i>INSL3</i> (MEDIA ± EE) EN PACIENTES CO Y CONTROLES. -----	44

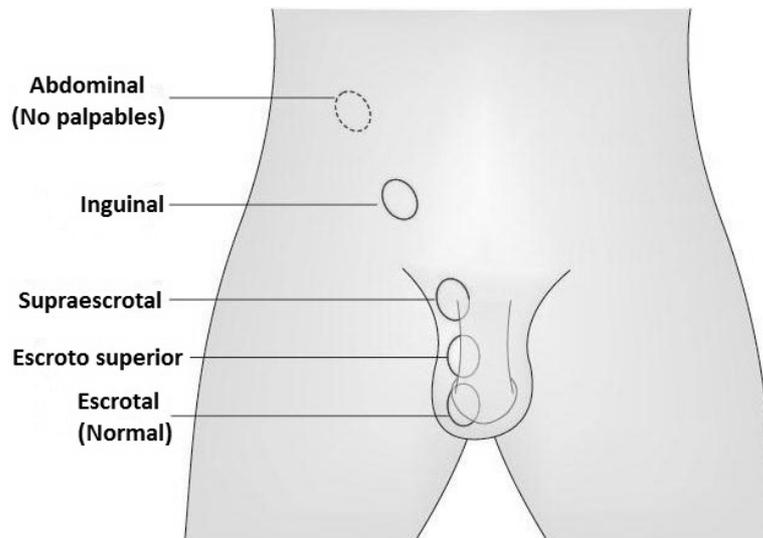


## RESUMEN.

La criptorquidia o no descenso testicular (CO), es la falla congénita al nacimiento más frecuente en humanos. Los pacientes CO en edad adulta presentan mayor riesgo de desarrollar infertilidad y cáncer testicular (CT). Esta patología es considerada una enfermedad compleja, en la que intervienen varios genes, uno de ellos es *INSL3*, muy importante en la primera fase del descenso testicular y se ha reportado que pacientes con CO presentan bajos niveles séricos de *INSL3* en comparación con niños sanos. En este estudio se incluyeron 85 pacientes con CO idiopática y 99 niños control, en los que se analizaron cuatro SNPs (polimorfismos de un solo nucleótido) del gen *INSL3* (c.304C>T [p.R102C], c.305G>A [p.R102H], c.314G>A [p.R105H] y c.3334T>C) que podrían contribuir como factores de riesgo o susceptibilidad para la CO idiopática en pacientes mexicanos. El análisis de los SNPs se realizó mediante discriminación alélicas por el método de Taq-Man® y posteriormente se llevó a cabo el análisis de secuenciación automática de ambos exones de este gen en búsqueda de variantes no reportadas. La discriminación alélica mostró que el 100%, tanto de pacientes como grupo control, resultaron homocigotos normales para las variantes p.R102C y p.R105H, en tanto que la variante p.R102H se detectó en un solo paciente en estado heterocigoto con CO bilateral y sin antecedentes familiares, datos que concuerdan con estudios realizados en otras poblaciones, donde la proporción de variantes identificadas es similar a la nuestra. Por otro lado el SNP c.3334T>C ubicado en la región intrónica de *INSL3*, muestra mayor heterogeneidad alélica tanto en pacientes CO como controles, sin embargo aunque no se muestra diferencias significativas en ambos grupos, se puede observar que el estado heterocigoto predomina en los pacientes CO idiopáticos (51.8%). Mediante la secuenciación de ambos exones del gen *INSL3*, se detectaron dos alteraciones en el exón 1: p.L42L (c.126A>G) y p.A60T (c.179A>G), la primera alteración se identificó en 4 pacientes con CO idiopática, 2 bilateral y 2 unilateral, todos en estado heterocigoto; es importante mencionar que uno de ellos con antecedentes heredofamiliares; en cuanto a p.A60T se detectó en dos pacientes con CO bilateral, uno de ellos homocigoto. En el exón 2 se encontraron las alteraciones c.315T>A (p.R105R) y c.257C>T (p.T86M); en ambos casos los pacientes presentan CO bilateral sin antecedentes heredofamiliares. Finalmente la determinación sérica de *INSL3* se realizó en pacientes mayores de 8 años, de acuerdo con las edades que se especifica en la literatura en relación a una mayor expresión de *INSL3*; este análisis mostró una media de 0.306 ng/ml en los niveles de *INSL3* en los pacientes con CO, lo cual está por debajo de la media mostrada por el grupo control, que presentó niveles de hasta 0.555 ng/ml, lo que concuerda con lo reportado en la literatura, mostrando la importancia que tiene esta hormona en el descenso testicular. Los hallazgos en este estudio sobre la búsqueda de variantes alélicas en la población mexicana muestran la relación que existe entre el genotipo las variantes identificadas en nuestros pacientes y el fenotipo grave. Por otro lado es importante destacar que considerando que la CO es una enfermedad compleja en la que pueden estar interviniendo múltiples genes, en este trabajo únicamente analizamos un gen de toda la cascada génica que pueden estar participando en el descenso testicular, por lo que podemos inferir que al no detectar una alta frecuencia de alteraciones en el gen objetivo las alteraciones podrían estar en algún otro de esos genes.

## INTRODUCCIÓN.

El término criptorquidia (CO; OMIM # 219050) proviene del griego *kryptos* (oculto) y *orchis* (testículo), etimológicamente significa testículo oculto y hace referencia a la falla de uno o ambos testículos para descender por canal inguinal hasta su localización final dentro del saco escrotal; la CO es considerada la anomalía congénita genital más frecuente en varones nacidos vivos (Ferlin y cols., 2008; Damgaard y cols., 2008; Massart y Saggese, 2010). De acuerdo a la localización de los testículos, la CO se clasifica como abdominal (localizados dentro de la cavidad abdominal, por arriba del canal inguinal), inguinal (a lo largo del canal inguinal), supraescrotal (por arriba del saco escrotal), escroto superior o altamente escrotal y ectópica (fuera de la vía normal del descenso) (Fig. 1) (Bay y cols., 2011).



**Figura 1** Localización de los testículos en la criptorquidia. Mostrando su clasificación en base a la ubicación de los testículos. Modificado de Bay y cols., 2011.

La CO frecuentemente se considera una malformación leve, sin embargo puede afectar seriamente la salud de los varones en la edad adulta, debido a que representa un factor de riesgo que resulta en infertilidad y CT (Vigueras y cols., 2008; Vigueras y cols., 2010). Se propone que el origen de la malignidad es la falta de diferenciación de gonocitos a espermatogonias. Los gonocitos son células pluripotenciales, que al permanecer indiferenciados se hacen susceptibles al desarrollo de carcinoma *in situ* testicular; precursor del seminoma. Por lo cual, los niños con CO tienen un riesgo de 7.3 a 9.7 veces más que la población normal de desarrollar algún tumor testicular; además este tipo de pacientes presentan una



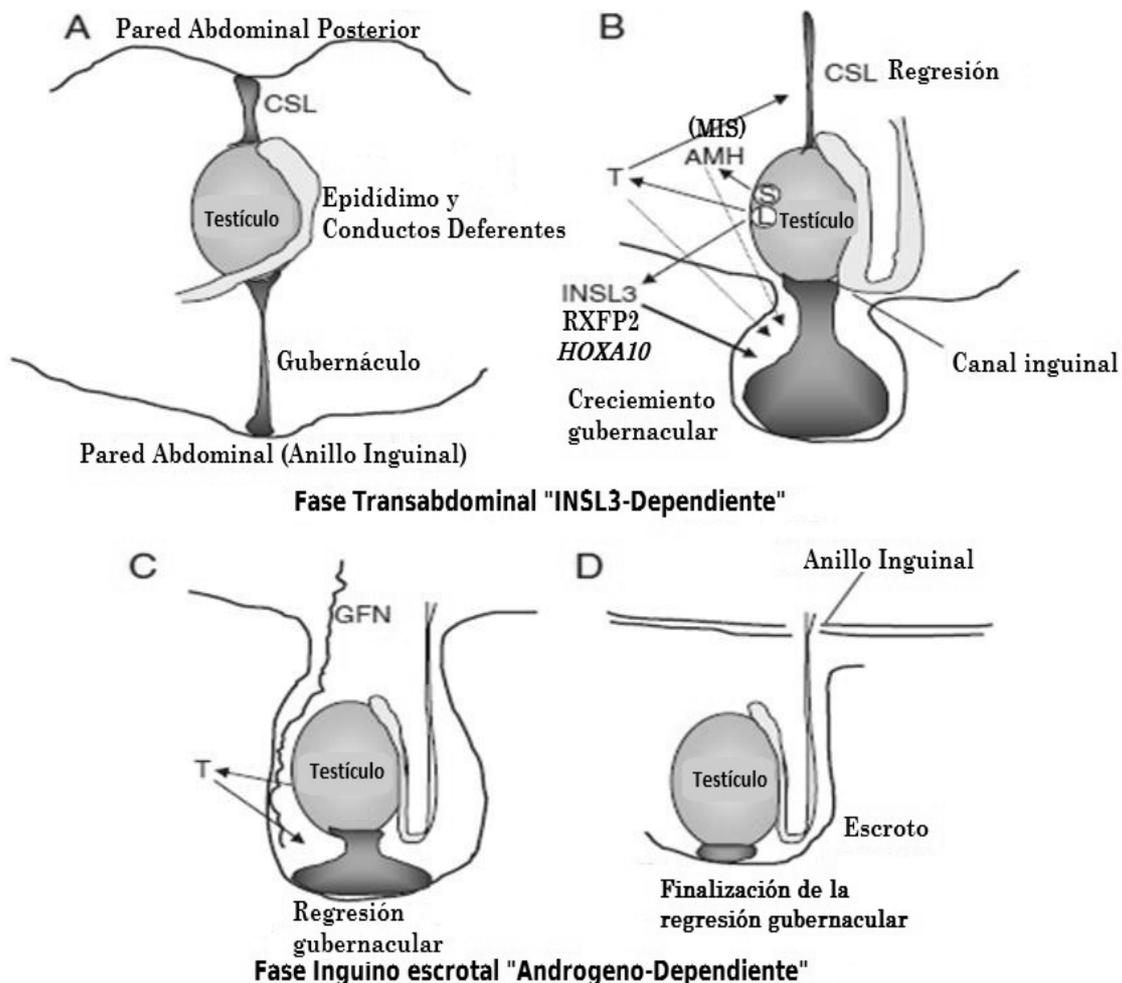
importante disminución en la concentración espermática y baja calidad seminal (Farrer y cols., 1985; Whitaker, 1988; Hinman, 1993; Cortes y cols 2001; Cortes, 2003; Ferlin y cols., 2008; Bay y Andersson, 2010; Massart y Saggese, 2010).

La frecuencia de la CO puede variar en las diferentes poblaciones, sin embargo mundialmente oscila entre un 2% al 4% de los varones nacidos vivos (Hutson y cols., 2010). En niños prematuros se incrementa hasta el 30%. Estas cifras disminuyen del 1% a 2% durante los 3 primeros meses de vida postnatal debido al descenso espontáneo, causado por la transitoria activación del eje hipotálamo-hipófisis-testículo que ocasiona el incremento en la concentración de hormonas, que son importantes para concluir el descenso testicular (Hutson y Clarke, 2007; Bay y cols., 2011). Cabe mencionar que en México, no se tienen datos epidemiológicos que nos orienten sobre la incidencia de la CO.

El descenso testicular es un evento complejo, mediado por factores hormonales y anatómicos, que se relacionan con el desarrollo de estructuras cruciales, tales como el gubernáculo, el canal inguinal y el escroto (Heyns y Hutson, 1995). Dicho proceso consta de dos fases: **transabdominal** e **inguinoescrotal**. La primera fase se lleva a cabo de la semana 8 a la 17 de la gestación, y durante ésta, el testículo se desplaza desde su posición abdominal a la zona inguinal y la segunda fase ocurre durante la semana 26 a la 32 de gestación, en esta fase los testículos se desplazan de la región inguinal al escroto, dicho evento se da 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 (Campbell, 1959; Backhouse y Hewer, 1964; Weil y Ueber, 1885; Wensing, 1986; Hutson y Donahoe, 1986; Arrendo y cols., 1991; Foresta y cols., 2008).

Durante la fase transabdominal, también llamada *INSL3*-dependiente (Foresta y cols., 2008), el testículo se encuentra unido a la pared abdominal posterior, mediante el ligamento suspensor craneal (CSL) (Fig. 2A), el cual degenera bajo la acción de la testosterona producida por las células de Leydig (Lim y cols., 2001); las cuales también producen el Factor asociado a la insulina 3 (*INSL3*), que al unirse a

su receptor el Péptido Receptor 2 de la Familia asociada a la relaxina/insulina (RXFP2) previamente llamado Receptor 8 acoplado a la proteína G, con sitios ricos de Leucina (LGR8/GRAT) localizado en células gubernaculares, estimula el crecimiento del gubernáculo distal; este complejo *INSL3-RXFP2* (ligando–receptor) participa de manera importante en esta primera fase incrementando la producción de AMPc dentro de las células gubernaculares, lo que ocasiona la retención de agua en células gubernaculares, específicamente en la matriz rica en glicosaminoglicanos permitiendo así, el crecimiento del gubernáculo y el paso del testículo a través de esta estructura (Shono y cols., 1994; Nef y Parada, 1999; Zimmermann y cols., 1999; Gorlov y cols., 2002; Feng y cols., 2004; Yamazawa y cols., 2006; Park y cols., 2008; Hutson y cols., 2010).



**Figura 2.** Fases del descenso testicular. En el esquema se aprecian las diferentes posiciones del testículo. A y B muestran la fase transabdominal (INSL3-dependiente); C y D muestran la fase inguinoescrotal (Andrógeno-dependiente). Modificado de Foresta y cols., 2008.



Otro gen involucrado en el descenso es *HOXA10* que participa en el correcto desarrollo embrionario del gubernáculo (Satokata y cols., 1995; Rijli y cols., 1995; Kolon y cols., 1999; Foresta y cols., 2008). Se ha visto que también la sustancia Inhibidora de los conductos de Müller (MIS), conocida también como Hormona Anti-Mülleriana (AMH) que es producida por las células de Sertoli, estimula la reacción inflamatoria del gubernáculo, ocasionando el crecimiento de esta estructura además de producir dilatación del canal inguinal, permitiendo el correcto descenso testicular hasta su posición final dentro del saco escrotal (Fig. 2B) (Heyns y cols., 1990; Heyns y Hutson, 1995; Hutson y cols., 2010).

Durante la fase inguinoescrotal también conocida como andrógeno-dependiente, el ligamento del gubernáculo tiende a acortarse y se incorpora al bulbo, lo que permite el desplazamiento del testículo a través de esta estructura (Fig. 2C) (Heyns y Hutson, 1995), esto mediado por la acción de los andrógenos, los cuales, actúan vía nervio genitofemoral (GFN), cuyas fibras sensoriales liberan el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y al unirse al receptor de CGRP en el gubernáculo ocasiona contracciones para permitir el descenso del testículo hacia el escroto (Hadziselimovic y cols., 1983; Hutson y Donahoe, 1986; Abney y Key, 1989; Husmann y Levy, 1995; Heyns y Hutson, 1995; Vigueras y cols., 2003; Vigueras y cols., 2004; Foresta y cols., 2008; Virtanen y Toppari, 2008; Hutson y cols., 2010). Finalmente la matriz extracelular del gubernáculo se remueve y con este evento culmina como un tejido fibroso que mantiene unido el testículo con el escroto, a partir de este proceso denominado regresión gubernacular se da por finalizado el descenso testicular, (Fig. 2D), cualquier falla en este proceso puede bloquear el descenso normal de los testículos (Wensing, 1973; Heyns y cols., 1990).

## ETIOLOGÍA.

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 (Ivell y Hartung, 2003; Massart y Saggese, 2010), los cuales podrían verse afectados por distintos factores endócrinos, anatómicos y genéticos.



## FACTORES ENDÓCRINOS.

Un punto crítico en la falla del descenso testicular ha sido atribuido a los defectos en la secreción o biosíntesis hormonal, en particular de andrógenos prenatales, a través del eje hipotálamo-hipófisis-testículo, causados principalmente por la deficiencia en la estimulación de gonadotropinas hipofisarias como LH (Hormona luteinizante) y FSH (Hormona folículo estimulante) (Hughes y Acerini, 2008; Virtanen y Toppari, 2008).

Otro eje que interviene de manera importante es placenta-gónada y se ha demostrado que la insuficiencia o mala función placentaria está relacionada con disminución en la secreción de gonadotropina coriónica humana (hCG) que resulta un factor fundamental para el desarrollo de CO (Cain y cols., 1994a,b; Husmann y Levy, 1995; Hughes y Acerini, 2008; Virtanen y Toppari, 2008; Kurpisz y cols., 2010).

Además, se ha propuesto que la alta producción de estrógenos maternos durante la gestación son un factor importante de desarrollar CO, aunque su papel dentro del proceso de descenso testicular no ha sido descrito en su totalidad, sin embargo se sabe que inhiben la producción de *INSL3*, que se considera un punto clave de inicio en el proceso del descenso testicular (Depue y cols., 1983; Hadziselimovic y cols., 2000; Virtanen y Toppari, 2008; Foresta y cols., 2008).

Por otra parte es importante mencionar el ambiente debido a la detección de sustancias exógenas con actividad estrogénica o antiandrogénica que se comportan como disruptores de la función endócrina normal, definidos como disruptores endócrinos (EDs), representados por talatos, xenoestrógenos, hormonas naturales y sintéticas, herbicidas, fungicidas, fito y micoestrógenos y otras sustancias que afectan la señalización endocrina que juega un papel importante en el incremento en la frecuencia de las fallas de la salud reproductiva del varón y la presencia de CO (Yoshida y cols, 2005; Virtanen y Topari, 2008; Kojima y cols., 2009; Wang y cols., 2008; Foresta y cols., 2008; Kurpisz y cols., 2010). Existen estudios que demuestran una mayor vulnerabilidad ante los EDs durante la etapa prenatal y en edades



tempranas de la infancia, sin embargo, esta exposición puede ocasionar problemas visibles al nacimiento como malformaciones congénitas y en la edad adulta infertilidad y cáncer (Skinner y Anway, 2005).

## **FACTORES ANATÓMICOS.**

El gubernáculo se ha propuesto como una de las estructuras con mayor participación en el descenso testicular, debe presentar cambios morfológicos para permitir el libre paso del testículo hacia el escroto. Dichos cambios comprenden el crecimiento y regresión gubernacular, por lo tanto se ha demostrado que cualquier falla o daño traumático en dicha estructura puede impedir el descenso testicular (Wensing, 1973; Kropp y Voeller 1981; Weil, 1885; Hutson y cols., 1988; Heyns y cols., 1990; Heyns y Hutson, 1995; Mc Mahon y cols., 1995; Husmann y Levy, 1995).

Los mecanismos que contribuyen a la falla del descenso testicular en pacientes con defectos congénitos en la pared abdominal han sido causa de controversia; se ha demostrado clínica y experimentalmente la importancia del incremento de la presión intraabdominal durante el desarrollo intrauterino para concluir el proceso de descenso testicular normal; por lo que la disminución en la presión intraabdominal puede inhibir este evento. Es importante destacar que los defectos en la pared abdominal no son la única causa de la disminución de la presión intraabdominal; se ha demostrado que el esfuerzo respiratorio fetal incrementa dicha presión y la ausencia o falla del esfuerzo respiratorio fetal, hasta una masiva obstrucción del tracto urinario, puede verse reflejado en el desarrollo de CO (Kaplan y cols., 1986; Attah y Hutson 1993; Koivusalo y cols., 1998).

## **FACTORES GENÉTICOS.**

La CO es un padecimiento multifactorial en el cual existen evidencias que sostienen la presencia de factores genéticos asociados a la CO, como múltiples genes que intervienen en el proceso de descenso testicular (Ashley y cols., 2010). Se ha observado que personas que presentan CO unilateral, el testículo



contralateral (normalmente descendido) presenta malignidad (Foresta y cols., 1996; Massart y Saggese, 2010). Dichos hallazgos sugieren que la CO puede ser considerada fundamentalmente como un signo de una alteración congénita.

Pardo y cols., (1975) reportaron la CO con una herencia Mendeliana, ligada al cromosoma Y, en un estudio de tres familias españolas con testículo no descendido unilateral izquierdo y las tres con antecedentes heredofamiliares; en la primer familia, el padre y sus tres hijos mostraban la patología; en la segunda familia, el padre, su hermano y su hijo presentaban el padecimiento; y en la tercer familia, los dos hermanos gemelos presentaron la malformación; concluyendo que el 6.2% de los hermanos y del 1.5 al 4.0% de los padres de pacientes con CO han presentado la patología. Lo anterior concuerda con lo reportado por Massart y Saggese (2010), que el 3.9 a 4.0% de los padres y del 6.2 al 9.8% de los hermanos de un paciente con CO también presentaron la patología. Datos recientes al respecto estiman que cerca del 22.7% de los pacientes con criptorquidia han presentado antecedentes familiares a diferencia de individuos control que presentan un 7.5% (Elert y cols., 2003; Foresta y cols., 2008).

La CO frecuentemente se presenta como un signo o un componente común de cerca de 250 síndromes que se encuentran asociados con aberraciones cromosómicas, muchos casos involucran cromosomas sexuales, sin embargo también se pueden presentar alteraciones en cromosomas autosómicos. Por otra parte en un gran número de pacientes con CO, esta malformación aparece como un rasgo aislado, sin la asociación a ningún síndrome, la presencia de la CO en esta condición es conocida como criptorquidia Idiopática o no sindrómica (Foresta y cols., 2008; Massart y Saggese, 2010).

#### **a) Criptorquidia sindrómica.**

La CO puede presentarse de manera frecuente u ocasional en varios síndromes (ver ANEXO); de hecho, es considerado un componente común, como un signo sumado a muchos otros para conformar un síndrome específico que la mayoría de las veces se encuentran asociados con aberraciones cromosómicas, tal y como se ha demostrado en anomalías de



herencia ligadas al cromosoma X, aneuploidías de cromosomas sexuales y en muchos autosomas (Czeizel y cols., 1981; Foresta y cols., 2008; Massart y Saggese, 2010). El síndrome de Klinefelter (47, XXY) es la aneuploidía más común en el humano con una prevalencia de uno en 500 varones nacidos vivos; sin embargo, la prevalencia exacta de criptorquidia en pacientes con este síndrome no se conoce (Foresta y cols., 2008).

Entre el 3-4% de los pacientes con CO están vinculados a anomalías cromosómicas. Foresta y cols. (2008) mostraron que la frecuencia de anomalías cromosómicas observadas en más de 1000 individuos con CO idiopática fue de 2.4%, en contraste, otro estudio realizado por este mismo grupo, en 400 individuos con criptorquidia sindrómica mostró que hasta el 7.6% de los pacientes presentan alteraciones cromosómicas evidentes.

Por otro lado, la criptorquidia bilateral es la más frecuentemente asociada con alteraciones cromosómicas (5%) en comparación con la forma unilateral (3%) (Foresta y cols., 2008; Massart y Saggese, 2010).

Las anomalías cromosómicas frecuentemente asociadas a la CO son las relacionadas con cromosomas sexuales, dando lugar a síndromes que se caracterizan por defectos en la función hipotalámica, hipofisaria o ambas, ocasionando alteraciones en la producción de gonadotropinas, en la síntesis de andrógenos o en la acción androgénica, que son claves en el proceso de descenso testicular (Hadziselimovic y cols. 1987, Foresta y cols., 2008).

#### **b) Genes asociados.**

Hasta la fecha el proceso completo de regulación del descenso testicular en humanos aún es desconocido. Resulta interesante conocer todos los factores genéticos o epigenéticos involucrados en dicho proceso, sin embargo, gracias a los numerosos estudios en modelos animales y estudios familiares, se ha sugerido la presencia determinante de factores genéticos o genes candidato asociados a la CO, los cuales han sido estudiados para una mejor comprensión de la fisiopatología de la enfermedad desde etapas muy



tempranas en el desarrollo embrionario (Tabla 1) (Foresta y cols., 2008; Kurpisz y cols., 2010).

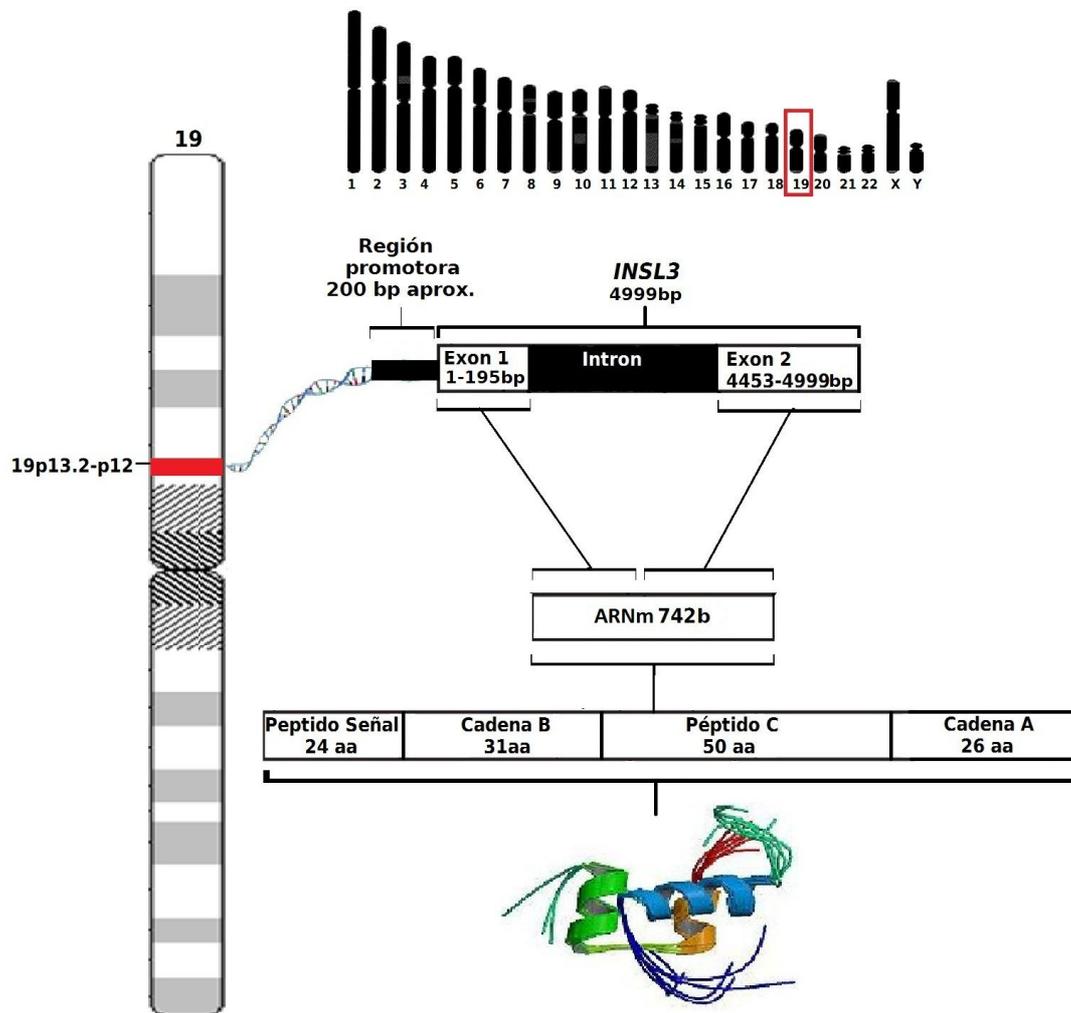
En años recientes, se ha dado particular atención a algunos genes involucrados en el proceso de descenso testicular, especialmente en el desarrollo gubernacular. Muchos de estos genes denominados morfogenéticos tales como: el Factor asociado a la insulina 3 (*INSL3*; OMIM #146738) y el Péptido Receptor 2 de la Familia relacionada a la relaxina/insulina (*RXFP2*; OMIM # 606655), que en realidad es el receptor de *INSL3*, ambos genes traducen proteínas que actúan como sistema ligando/receptor y juntos participan en la regulación del descenso testicular. Otro gen importante involucrado en el descenso testicular es *HOXA10* (OMIM # 142957) que codifica a una proteína que interviene sobre todo en el desarrollo embrionario, regula factores de transcripción específicos y controla el crecimiento y diferenciación de células gubernaculares (Foresta y cols., 2008; Massart y Saggese, 2010). Estos genes hasta la fecha han sido estudiados en diferentes poblaciones distintas a la población mexicana.

**Tabla 1.** Genes involucrados con la Criptorquidia.

Gen	Efecto fenotípico	Referencia
<b><i>INSL3</i></b>	Induce la diferenciación del gubernáculo, permitiendo el descenso testicular transabdominal a la región inguinal; además de reducir la apoptosis y favorecer la proliferación de células germinales. Las mutaciones en este gen están asociadas a seminoma.	Nef y Parada, 1999. Zimmermann y cols., 1999. Kawamura y cols., 2004. Anad-Ivell y cols., 2006. Yamazawa y cols., 2006. Foresta y cols., 2008.
<b><i>RXFP2</i></b>	Actúa como receptor de <i>INSL3</i> para activar el sobre crecimiento gubernacular distal, participa en el mantenimiento de la espermatogénesis y sus mutaciones se asocian a seminoma.	Nef y Parada 1999; Zimmermann y cols., 1999. Overbeek y cols., 2001. Gorlov y cols., 2002. Yamazawa y cols., 2006. Foresta y cols., 2008.
<b><i>HOXA10</i></b>	Clave en la morfogénesis gubernacular embrionaria.	Satokata y cols., 1995. Rijli y cols., 1995. Kolon y cols., 1999.

## GEN *INSL3*.

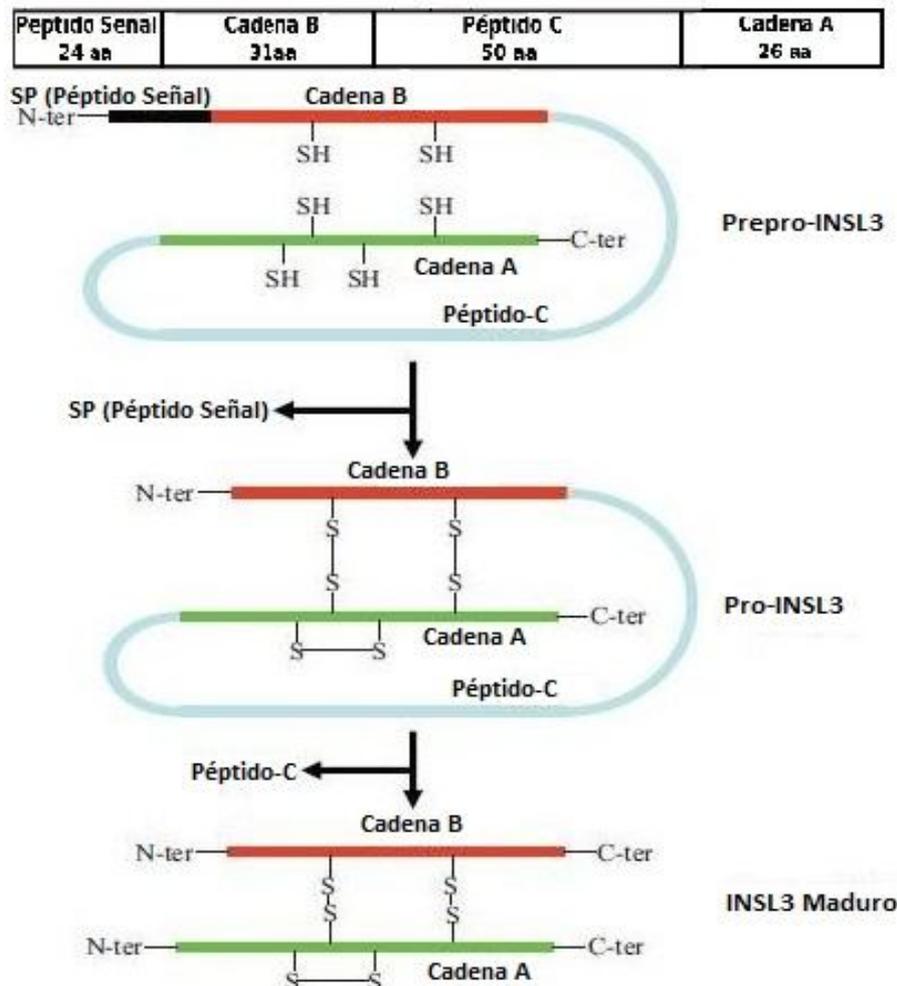
El gen *INSL3* inicialmente denominado insulina asociada a las células de Leydig (Ley I-L), también conocido como factor asociado a la relaxina (RLF), fue descrito en 1993 como una hormona proteica de estructura similar a la insulina. Se expresa en las células de Leydig pre y postnatales. Los transcritos de este gen representan uno de los más abundantes ARNm en dichas células y además su expresión inicia a muy temprana edad gestacional; varios autores coinciden que es a partir de la semana 12 de gestación aproximadamente (Adham y cols., 1993; Ferlin y cols., 2006; Bay y Andersson, 2010; Massart y Saggese, 2010).



**Figura 3.** Gen *INSL3*. A) Locus de *INSL3* en el cromosoma 19, B) estructura del gen, C) producto transcripcional o ARNm, D) esquema del péptido mostrando los dominios importantes de la pre-hormona y E) modelo hipotético de la proteína.

El gen *INSL3* se localiza en el brazo corto del cromosoma 19, en la región 13.2-p12, consta de 4999 pb con dos pequeñas regiones codificantes (exones) y una

región no codificante (intrón) (Burkhardt y cols., 1994; Ivell y cols., 2003; Sadeghian y cols., 2005; Ferlin y cols., 2006). La región promotora es relativamente corta de aproximadamente 200 pb, la cual conduce la transcripción a un ARNm de 742 bases (Fig. 3) (Koskimies y cols., 2002; Sadeghian y cols., 2005; El Houate y cols., 2007;).

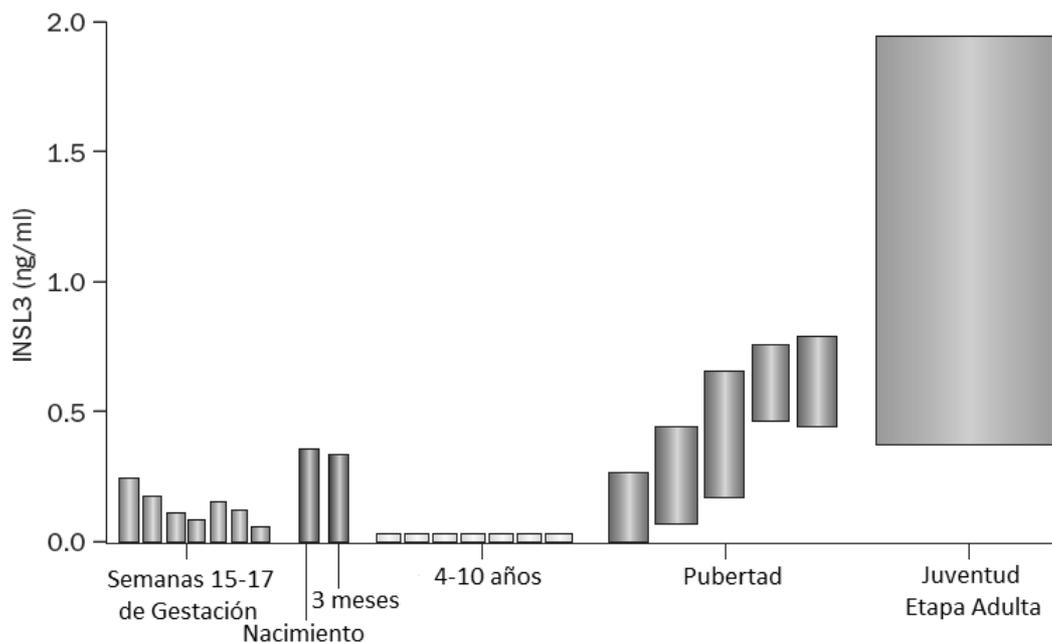


**Figura 4.** Estructura de INSL3 y esquematización del proceso de maduración desde preprohormona, prohormona y hormona madura. Modificado de Foresta y cols., 2008.

Este gen transcribe una preprohormona inmadura llamada PreproINSL3 de 131aa, compuesta de un péptido señal, una cadena A y B conectadas a través de un péptido C. El proceso de maduración hacia prohormona (proINSL3), consta de la eliminación del péptido C y la formación de dos enlaces disulfuro entre la cadena A y B, un enlace disulfuro dentro de la cadena A y finalmente, el péptido C es removido para dar lugar a la hormona madura INSL3; su producción es dependiente de la producción de LH, del estado de diferenciación y número de las células de Leydig, las cuales aumentan su población en el ser humano de la semana 14-18 de gestación hasta aproximadamente tres meses después del nacimiento y su

expresión coincide con la producción de esteroidogénesis y espermatogénesis (Fig. 4) (Ferlin y cols., 2006; Bay y cols., 2007; El Houate y cols., 2007; Foresta y cols., 2008; Bay y Andersson, 2010).

El papel de este péptido es de gran importancia en el desarrollo genital del varón, induciendo la diferenciación y desarrollo del gubernáculo, habilitando así el descenso testicular a la región inguinal (Nef y Parada 1999; Zimmermann y cols., 1999; Yamazawa y cols., 2006; Foresta y cols., 2008; Bay y cols., 2011). Esto ha sido demostrado en el humano gracias a la presencia de INSL3 en fluido amniótico de mujeres gestantes de varón, con niveles máximos de expresión durante la semana 15-17 de gestación y declina hacia la semana 22, hasta ser indetectable.



**Figura 5.** Gráfica de los niveles séricos de INSL3 en diferentes etapas de desarrollo del varón. Modificado de Bay y Andersson, 2011.

Al nacimiento la concentración de INSL3 circulante aumenta nuevamente, de tal manera que puede ser detectada en sangre de cordón umbilical; durante los tres primeros meses de vida (“minipubertad”) se observa un importante incremento en la producción de INSL3, alcanzando concentraciones de hasta 0.5 ng/ml, caracterizado por una importante actividad del eje hipotálamo-hipófisis-testículo (Anand-Ivell y cols., 2008; Ivell y Anand-Ivell, 2009; Bay y Andersson, 2010; Bay y cols., 2011); dicha producción de INSL3 declina durante la infancia, presentando concentraciones indetectables de la hormona en sangre periférica, sin embargo, a partir de la



pubertad hasta la etapa adulta, la producción de *INSL3* comienza a incrementarse hasta llegar a concentraciones relativamente estables, (2.0 ng/ml) a partir de los 18 años (Fig. 5) (Foresta y cols., 2004; Wikstrom y cols., 2006; Ferlin y cols., 2006; Bay y cols., 2007; Ivell y Anand-Ivell, 2009; Bay y cols., 2011).

Estas variaciones en la producción de *INSL3* demuestran la importancia de esta hormona, no solo dentro del proceso de descenso testicular, sino además en su participación primordial en la sobrevivencia de las células germinales y en el mantenimiento de una adecuada espermatogénesis (Kawamura y cols., 2004; Anand-Ivell y cols., 2006; Bay y cols., 2011).

Varios estudios en ratones *knock out* han contribuido al estudio de la participación substancial de *INSL3* en la CO. Se ha demostrado que ratones macho con ausencia de *INSL3*, presentan CO bilateral abdominal asociado con un mal desarrollo gubernacular (Hutson y Donahoe, 1986; Zimmermann y cols. 1999).

Zimmermann y cols. (1990), desarrollaron un ratón *knockout* del *INSL3* mediante recombinación homóloga de células troncales embrionarias, encontrando que las hembras eran fértiles y producían críos de tamaño normal, sin embargo todos los ratones machos *knock out* presentaban testículos criptorquídicos bilaterales abdominales, los testículos y el tracto genital podían moverse libremente en la cavidad abdominal, indicando una falta de pegado caudal. Posteriormente, al emplear técnicas de microscopía electrónica e histología, encontraron un mal desarrollo del gubernáculo en los embriones de 17 días de gestación (dg); esta observación y el hecho de que este gen no se exprese en el ovario durante los dg 8 a 17, apoyan el papel tan importante de *INSL3* en el sobre crecimiento y diferenciación gubernacular en ratones macho.

Inclusive se ha reportado que la sobre expresión de *INSL3* en ratones hembra transgénicos ocasiona la migración de los ovarios a una posición baja dentro del abdomen, lo cual es causado por presentar un desarrollo gubernacular similar a lo que sucede en el descenso testicular, demostrando el papel regulador de *INSL3* dentro de la fase transabdominal o *INSL3* dependiente (Adham y cols., 2002).



Por otra parte, estudios fisiológicos a nivel molecular han mostrado la importancia del gen *INSL3* en el desarrollo de la CO, describiendo la participación de variantes alélicas o polimorfismos que contribuyen de manera fundamental como factores de riesgo o susceptibilidad para que un individuo presente CO idiopática (Tabla 2).

**Tabla 2.** Variantes alélicas asociadas a la CO Idiopática.

Gen	Variantes Alélicas	Efecto de las variantes	Referencias
<i>INSL3</i>	p.P49S p.P93L p.R102C p.N110K p.R102H p.C19G p.V18M p.W69R p.R73X p.L9L(c.27G-A) p.L42L(c.126G-A) p.A60T p.R63X	Bajan la actividad del receptor, así como la habilidad de su activación, además de ocasionar un mal desarrollo gubernacular o disminución en ese proceso.	Tomboc y cols., 2000. Bogatcheva y cols., 2003. Canto y cols., 2003. Ferlin y cols., 2006. El Houate y cols., 2007.

Ferlin y cols., en el 2003 identificaron tres polimorfismos comunes en *INSL3* tanto en sujetos control como en niños criptorquídicos italianos, con lo que se infiere que no son mutaciones como tal, sino polimorfismos o variantes alélicas que pueden estar asociadas al padecimiento: p.L9L (c.27G-A), se presentó en 3% de hombres criptorquídicos y 5% de la población control; p.A60T (c.178G-A) en 42.5% de criptorquídicos y 47% de controles y p.L42L (c.126G-A) en el 57% y 58% respectivamente.

Además, encontraron tres sustituciones de nucleótidos (c.278C>T, c.304C>T, y c.305G>A) que conllevan a cambios de aminoácidos (p.P93L, p.R102C y p.R102H respectivamente), estas variantes fueron detectadas en condición heterocigota en



cuatro pacientes con CO (4 de 87 pacientes, 4.6%), sin encontrarse en ninguno de los 80 casos control, por lo que hacen suponer que esta últimas variantes están asociadas directamente a la CO.

Bogatcheva y cols., (2003) describen para la población estadounidense cinco variantes reportadas previamente: p.P49S, p.P93L, p.R102c, p.R73X y p.N110K, las cuales se asocian a CO, sin embargo, la alteración que estas variantes pueden ocasionar a nivel de la traducción de la proteína es diverso.

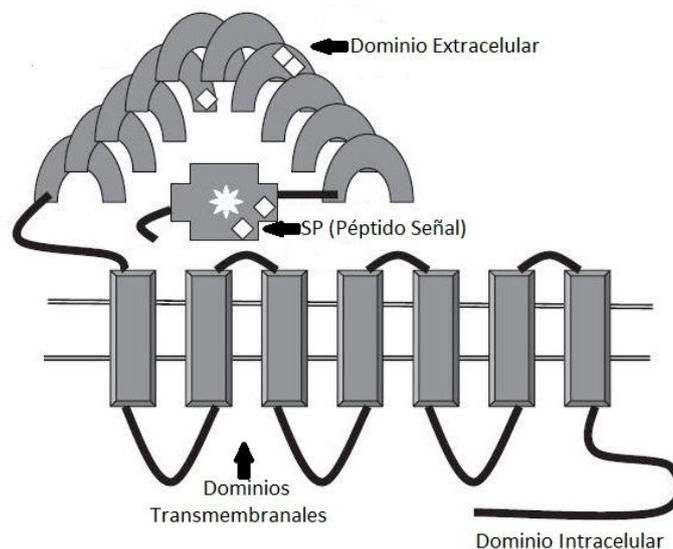
La variante p.P49S localizada en la cadena B del péptido, reduce severamente la habilidad de la hormona INSL3 de activar a RXFP2, debido a que los aminoácidos presentes desde la prolina 49 al triptófano 51 son críticos para la unión del INSL3 maduro con RXFP2. Por otra parte las variantes p.P93L localizada en el péptido C y p.N110K, en la cadena B, no han mostrado disminución considerable en la activación del receptor (Bullesbach y Schwabe, 2002), similar a lo que sucede con p.R102C la cual ocasiona una sustitución que afecta de manera moderada la fisiología de INSL3, ya que el cambio de un aminoácido Arginina (R) por una Cisteína (C) no cambia la estructura ni la función de la proteína de manera drástica. En contraste, p.R73X produce un péptido defectuoso, al presentar un codón de paro en el aminoácido 73, por lo que la proteína resultante, es un péptido incompleto y no funcional. Cabe mencionar que en estos estudios los individuos control no presentaron ninguna de estas alteraciones (Tomboc y cols., 2000; Ferlin y cols., 2006; El Houate y cols., 2007).

En el 2006, Ferlin y cols al estudiar a 540 pacientes criptorquídicos Italianos, describieron que el 1.9% de los pacientes presentaban las alteraciones p.R4H, p.W69R y p.R72K. La variante p.R4H se encontró en un paciente con cariotipo normal pero con una microdelección en la región *AZFc* del cromosoma Y; la p.W69R fue detectada en tres pacientes, su correlación con el cuadro clínico muestra una asociación con seminoma, dicha alteración podría estar ocasionando la reducción en el procesamiento de la cantidad de la hormona INSL3 activa; la variante p.R72K de igual forma se detectó en tres pacientes y se asoció a seminoma. También detectaron las variantes p.P93L (OMIN # 606655.0002), p.R102C (OMIN #

606655.0003) y p.R102H (OMIN # 606655.0004), previamente reportadas en la población italiana; de las cuales, se propone que p.R102C es la que presenta un papel más patogénico al modificar la estructura del péptido (Foresta y cols., 2008).

## GEN *RXFP2*.

El gen *RXFP2* (de sus siglas en inglés: *Relaxin-family peptide receptor 2*), receptor para *INSL3*, identificado en el 2002 e inicialmente nombrado *LGR8* (*leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 8*) o *GREAT* (de sus siglas en inglés: *G protein-coupled receptor affecting testis descent*) (Hsu y cols. 2002; Foresta y cols., 2008). Este gen se localiza en el brazo largo del cromosoma 13 en la región 13q13.1 en el humano, está constituido por 7331pb y 18 exones, traduce a una proteína de 754 aminoácidos, con varios sitios o dominios importantes: un péptido señal, un dominio extracelular, siete dominios transmembranales y un dominio intracelular; además contiene sitios ricos de leucina (gran cantidad de repeticiones de leucina) y su estructura es parecida a la de una herradura de caballo (Fig. 6)(Bogatcheva y cols., 2007).



**Figura 6.** Esquema hipotético del receptor *RXFP2*, conformado por un péptido señal, dominio extracelular, siete dominios transmembranales y un dominio intracelular. Modificado de Bogatcheva y cols., 2007.

Actualmente es poco lo que se conoce en relación a *INSL3* como ligando y *RXFP2* como receptor, pues fueron descritos recientemente, sin embargo, el



fenotipo es similar entre ratones *knock out* para ambos genes (Nef y Parada, 1999; Zimmermann y cols.1999; Overbeek y cols. 2001; Gorlov y cols. 2002), por lo que se ha demostrado que el sistema *INSL3-RXFP2* está involucrado en el desarrollo y crecimiento del gubernáculo, por lo que al presentar una falla en este sistema, el proceso de descenso testicular se ve afectado. La expresión de *RXFP2* es restringida al testículo, cerebro y músculo esquelético, con alto nivel de expresión en el gubernáculo (Overbeek y cols., 2001; Hsu y cols., 2002).

Varios polimorfismos en el gen *RXFP2* también han sido reportados; Gorlov y cols., (2002) analizaron el gen *RXFP2* en 60 pacientes con CO idiopática, detectando un paciente heterocigoto para la variante c.664A>C, la cual provoca el cambio de una treonina por una prolina en la posición 222 del dominio extracelular de la proteína (p.T222P).

En el 2003, Canto y cols., estudiaron 150 pacientes con CO idiopática, en uno de ellos se detectó la variante p.N86K, presente también en la madre, ambos en estado heterocigoto, en tanto que el padre fue homocigoto normal. Así los autores concluyen que las alteraciones en *RXFP2* están frecuentemente asociadas con la CO y que además son heredadas vía materna.

El grupo de Ferlin y cols. (2003), han encontrado una incidencia de variantes en *INSL3-RXFP2* del 9.2% en población italiana, mostrando una vez más que la consecuencia clínica de las alteraciones parece provocar una falla del testículo para descender al escroto correctamente, aparentemente sin afectar los componentes endócrinos y espermatogénicos del testículo.

Ese mismo año, el mismo grupo de investigadores secuenció ambos genes en 87 pacientes con CO y 80 individuos control, detectando la variante p.T222P en *RXFP2* en 4 pacientes con CO; los cuales mostraron diferentes fenotipos, desde normospermia hasta una completa azoospermia, además de CO bilateral hasta testículos retráctiles; sin embargo, en todos los sujetos la función endocrina de los testículos fue aparentemente normal, aunque al analizar la funcionalidad de la proteína resultante de esta alteración, disminuye la fuerza de unión entre *INSL3* y



RXFP2, concluyendo que la CO frecuentemente está asociada con alteraciones tanto en *INSL3* y *RXFP2*, los cuales son importantes tanto en el descenso testicular como en la correcta función endócrina dentro del testículo.

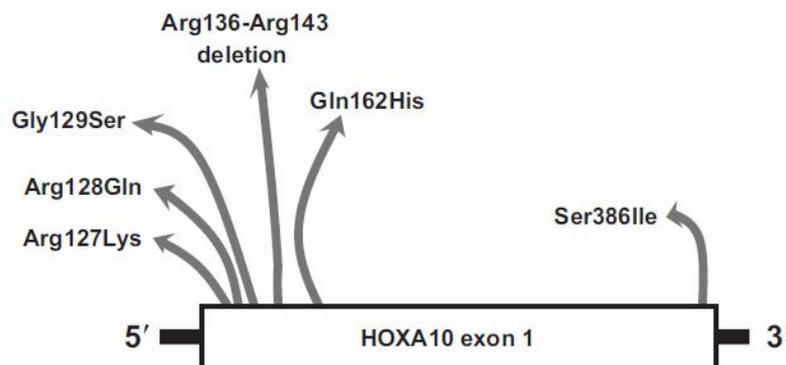
## **GEN *HOXA10*.**

La familia de genes *homeobox* codifican para un grupo de factores de transcripción responsables de regular la morfogénesis de estructuras segmentales a lo largo del eje anteroposterior corporal. Estos genes tienen en común una secuencia de ADN conocida como caja homeótica, la cual está constituida por 180 pares de nucleótidos que guarda homología con cajas homeóticas de vertebrados, mamíferos y humanos, a pesar de estar evolutivamente relacionados a genes homeóticos de *Drosophila*; especie en la que fue identificado por primera vez (Botas, 1993; Krumlauf, 1994; Kmita y cols., 2005).

El gen *HOXA10* actúa como factor de transcripción que controla el crecimiento y diferenciación de células relacionadas por posición. Es expresado en la parte posterior del embrión de ratón, incluyendo el mesodermo intermedio, el cual da origen a las gónadas y el tracto genitourinario. Recientes estudios en murinos *knock out* para *HOXA10* han mostrado machos mutantes con criptorquidismo unilateral o bilateral, así como anomalías en nervios lumbares espinales, gubernáculo y nervio genitofemoral, resultando una espermatogénesis anormal y esterilidad (Satokata y cols., 1995; Rijli y cols., 1995).

En el humano, el gen *HOXA10* se localiza en el brazo corto del cromosoma 7, en la región p15-p14.2, está conformado por 9,667pb. Se expresa en muchos tipos celulares incluyendo el sistema genitourinario, siendo el gubernáculo y el riñón los que muestran mayor expresión. Se han reportado varios puntos a lo largo del gen que muestran alteraciones, aunque las variantes en el exón 1 de este gen son las que han sido detectadas en pacientes con CO (Fig. 7) (Kolon y cols., 1999); sin embargo, se han reportado resultados contrastantes en dos estudios con pacientes con CO. Uno de ellos describe un estudio inicial de casos y controles, conformado por 45 niños criptorquídicos estadounidenses, 30 de ellos presentaban las variantes

p.R136, p.R143, p.R127K, p.R128Q, p.G129S, p.Q162H y p.S386I en el exón 1 del gen *HOXA10*, al realizar la búsqueda de estas alteraciones en individuos control, estos no presentaron ninguna de ellas; sin embargo el estudio posterior (Kolon y cols., 1999), sugiere la existencia de alteraciones tanto en pacientes CO como en casos control; por otro lado interesantemente, Bertini y cols., (2004) han reportado un polimorfismo silencioso c.1203G>A detectado hasta en 10% de los pacientes CO aunque también se encontró en el grupo control.



**Figura 7.** Esquema del exón 1 del gen *HOXA10* donde se muestran algunas variantes reportadas. Tomado de Massart y Saggese 2010.



## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En México, hasta la fecha no se cuenta con datos epidemiológicos sobre la CO, por lo que no se conoce su incidencia, sin embargo considerando que el INEGI reporta en el 2010 cerca de 1,257,165 varones nacidos vivos al año en nuestro país y asumiendo que la frecuencia de CO a nivel mundial es de 1 a 2%, es probable que en la población mexicana la frecuencia oscile entre 12,571 y 25,143 casos nuevos de CO al año. Por su parte, anualmente en el Instituto Nacional de Pediatría se cuenta con 110 registros de niños con CO idiopática, lo cual resulta una cifra importante en nuestra población pediátrica que podría repercutir en un futuro en un alto índice de malignidad testicular e infertilidad.

Por otro lado, el proceso completo de regulación del descenso testicular en humanos aún es desconocido. Sin embargo, gracias a estudios en modelos animales y estudios familiares, se ha sugerido la presencia determinante de factores genéticos o genes candidato asociados a la CO; uno de ellos es *INSL3*, que además se expresa como una hormona de gran importancia para la sobrevivencia de las células germinales.

Estudios realizados en poblaciones distintas a la mexicana, revelan que ciertas variantes alélicas del gen *INSL3* pueden asociarse con la susceptibilidad o riesgo de presentar CO, incluso con una baja expresión de *INSL3*. (Massart y Saggese, 2010; Nef y Parada, 1999; Zimmermann y cols., 1999; Kawamura y cols., 2004; Anand-Ivell y cols. 2006; Ferlin y cols., 2006; Foresta y cols., 2008). Así mismo se ha observado que los pacientes con CO muestran concentraciones persistentemente bajas de *INSL3* (Bay y cols. 2007), por lo anterior resulta imprescindible realizar un estudio de correlación con el genotipo de los pacientes y concentración sérica de *INSL3* en nuestros pacientes mexicanos con CO idiopática.



## JUSTIFICACIÓN.

En la población mexicana es indispensable el estudio a nivel molecular de este padecimiento, el cual no ha sido ampliamente estudiado en poblaciones latinas (Canto y cols., 2003), por lo que consideramos importante el estudio de los genes involucrados en el descenso testicular, como el gen *INSL3*. Por lo que las variantes alélicas analizadas y caracterizadas de este gen, ayudarían a establecer su asociación con la CO idiopática y nos permitiría entender mejor la fisiopatología de la enfermedad, para así en un futuro diseñar estrategias utilizando estas variantes alélicas como marcadores y otorgar un asesoramiento genético oportuno a las familias afectadas.

Tomando en consideración que la población mexicana presenta una alta heterogeneidad genética, es importante implementar una variedad de metodologías para mejorar la tasa de detección de variantes alélicas relacionadas con enfermedades complejas como la CO.

## HIPÓTESIS.

Hipótesis Nula: No hay asociación entre variantes alélicas del gen *INSL3* con la Criptorquidia idiopática.

Hipótesis Alternativa: Existe asociación entre variantes alélicas del gen *INSL3* con la Criptorquidia idiopática

## OBJETIVOS.

Identificar las variantes alélicas del gen *INSL3* asociadas con la criptorquidia idiopática en una muestra de niños mexicanos, atendidos en el Instituto Nacional de Pediatría



## OBJETIVOS PARTICULARES.

- a. Identificar cuatro variantes alélicas del gen *INSL3* previamente descritas en otras poblaciones involucradas con la criptorquidia idiopática.
- b. Identificar las posibles variantes desconocidas del gen *INSL3* asociadas con la criptorquidia idiopática.
- c. Determinar la frecuencia de cada una de las variantes analizadas, asociadas a criptorquidia y en niños sanos.
- d. Determinar la asociación entre esas variantes y el cuadro clínico en los pacientes con criptorquidia.
- e. Cuantificar la concentración sérica de *INSL3*, como medición indirecta de la expresión de la proteína.

## MATERIAL Y MÉTODO.

### 1. CLASIFICACIÓN DEL ESTUDIO.

El estudio fue de tipo observacional ya que no se aplicó ningún tipo de intervención en los pacientes; es un trabajo comparativo de casos y controles; sólo se realizó una medición en el tiempo y por lo tanto es transversal.

Por otro lado, es un estudio ambispectivo, pues se obtuvieron los datos clínicos y las muestras de ADN de los pacientes que acudieron al servicio de urología del Instituto Nacional de Pediatría y además se realizó una revisión de casos y expedientes de pacientes que fueron diagnosticados cuatro años atrás.

Además este trabajo se considera translacional, ya que se realizó un estudio tanto en el área clínica, para la valoración y el manejo de los pacientes como en el área básica en el análisis molecular del gen *INSL3* (Argimon y Jiménez, 2006).



## 2. POBLACIÓN DE ESTUDIO.

### a) POBLACIÓN OBJETIVO:

Pacientes mexicanos con diagnóstico de criptorquidia idiopática.

### b) POBLACIÓN ELEGIBLE:

Pacientes con diagnóstico de criptorquidia idiopática que acudieron a recibir atención en el servicio de Urología del Instituto Nacional de Pediatría.

## 3. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE PACIENTES.

### a) CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE PACIENTES.

En el estudio se incluyeron 184 individuos de edad pediátrica (desde un mes hasta 18 años de edad), de estos, 85 fueron pacientes con CO idiopática y 99 conformaron el grupo control, provenientes de la república mexicana con ascendencia mexicana mínima de 2 generaciones. Los pacientes fueron referidos del servicio de Urología del Instituto Nacional de Pediatría, en tanto que el grupo control o de niños sanos fueron captados del servicio de cirugía del mismo Instituto; estos últimos se consideran niños sanos por no presentar criptorquidia y ninguna afección del aparato genitourinario. El diagnóstico de criptorquidia idiopática se realizó clínicamente por 2 médicos en 2 consultas distintas.

### b) CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

Se excluyeron temporalmente pacientes transfundidos en los últimos tres meses, pacientes con criptorquidia secundaria a procedimientos quirúrgicos previos o a lesiones anatómicas que pudieran ocasionar la regresión testicular a la cavidad abdominal; además se descartaron de este estudio aquellos pacientes que presentaron testículo retráctil.



#### 4. CONSIDERACIONES ÉTICAS

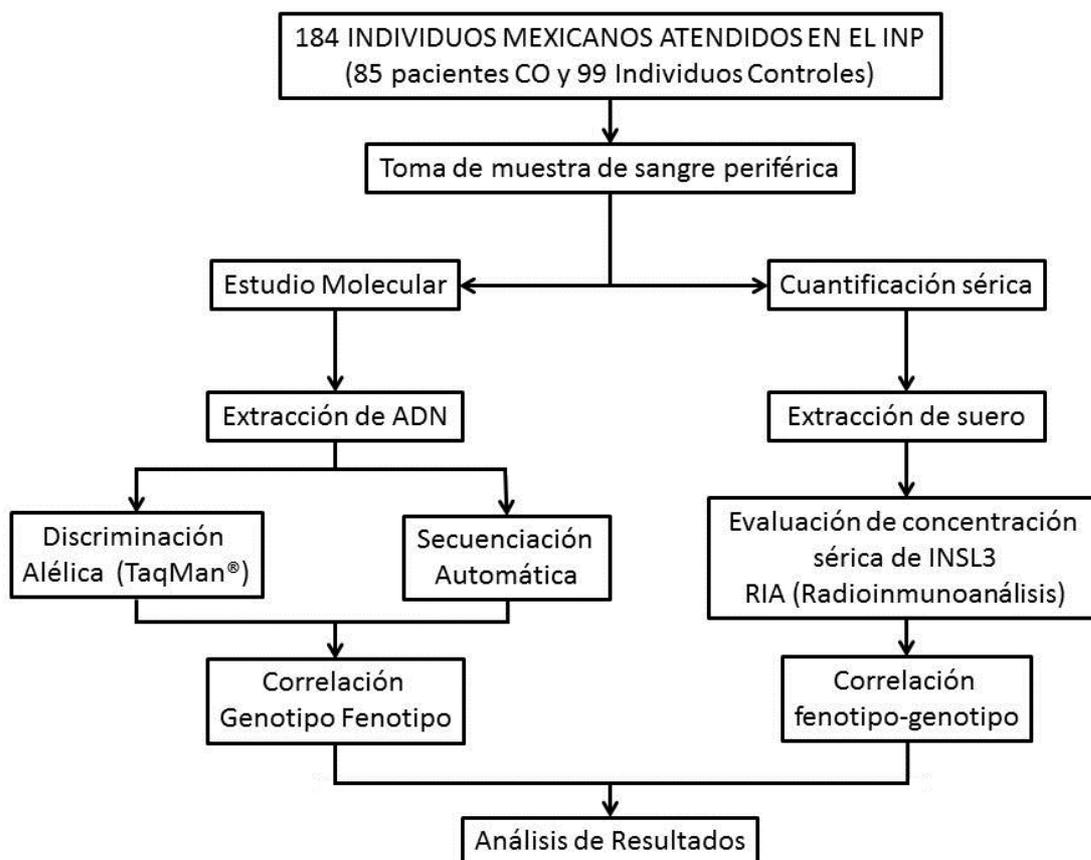
El presente estudio cumplió con lo estipulado en el título segundo del Reglamento de La Ley General de Salud en materia de investigación para la salud, según esta ley vigente en nuestro país el estudio corresponde a la categoría II, es decir, investigación con riesgo mínimo, ya que además de la exploración, se tomó una muestra única de 5-10 ml de sangre 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 y mantendrá 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.

#### 5. ESTRATEGIA GENERAL.

Se incluyeron 184 individuos de edad pediátrica, conformados en 2 grupos (Pacientes CO y grupo Control). El estudio molecular partió de la obtención de ADN de sangre periférica y la búsqueda de alteraciones o variantes alélicas en el gen *INSL3* mediante la combinación de estrategias: discriminación alélica de las variantes conocidas (p.R102C, p.R102H, p.R105H y c.3334T>C) y secuenciación automática para la búsqueda de variantes desconocidas. Las secuencias se compararon con los datos del GenBank para este gen y las variantes se correlacionaron con el fenotipo. El análisis de los niveles séricos de la proteína se llevó a cabo en pacientes de 8 a 18 años, cuantificando la cantidad de proteína presente en sangre periférica de los pacientes con CO así como en el grupo control.

### Algoritmo metodológico.



## 6. DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO.

### I. EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA.

A cada paciente y niño control se le tomaron 10 ml de sangre periférica, 5 ml de esta muestra se colocaron en un tubo vacutainer, usando ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante. Para la extracción de ADN de las muestras se utilizó el Kit QUIAGEN Puregene Blood Core Kit C. La muestra de sangre se centrifugó durante 30 min a 3500 rpm con la intención de separar la fase de leucocitos, la cual se aisló en un tubo limpio y se le agregó 6 ml de solución para lisis de eritrocitos (RCBL), se agitó vigorosamente para homogeneizar la solución y se centrifugó a 3500 rpm por 10 min, eliminando el sobrenadante y obteniendo un pequeño botón de leucocitos. Este paso se repitió hasta eliminar toda la hemoglobina de la muestra. Posteriormente, se agregó 1



ml de solución para lisis de leucocitos (Cell Lysis Solution), se agitó suavemente durante 10 segundos (s) y se incubó toda la noche a 42°C.

Al hidrolizado resultante se le agregó 1 ml de solución para precipitación de proteínas (Protein Precipitation Solution), se agitó y centrifugó nuevamente a 3500 rpm durante 10 min, después la fase superior se pasó a un tubo limpio y se agregaron 5 ml de isopropanol grado molecular, se agitó suavemente hasta que el ADN precipitó y se le extrajo de la solución con una pipeta Pasteur sellada. Se secó por unos minutos a temperatura ambiente, se enjuago con etanol al 70%, se dejó secar nuevamente, se resuspendió en 200  $\mu$ l de agua estéril y se dejó en refrigeración a 4°C.

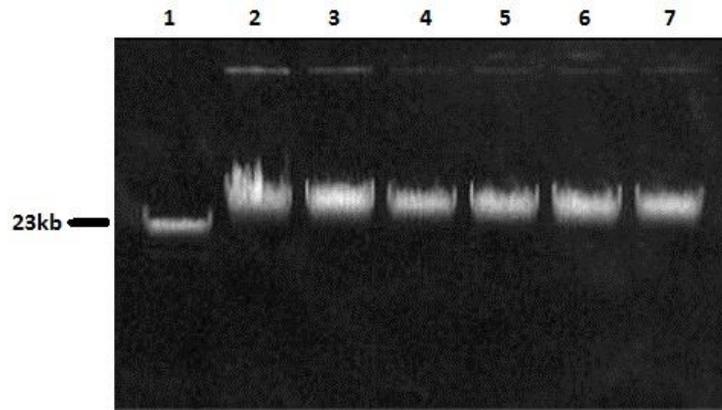
## II. CUANTIFICACIÓN DE ADN EXTRAÍDO.

Para cuantificar el ADN se utilizó 1  $\mu$ l de muestra, que se colocó en el lector de un espectrofotómetro (NanoDrop ND-1000), la cuantificación se realizó a través de una longitud de onda de 260 nm y el software específico del equipo (nd-1000); la cantidad de ADN resultante se expresó en ng/ $\mu$ l.

Una vez hecha la cuantificación de cada muestra se realizó la dilución de trabajo a una concentración promedio de 100 ng/ $\mu$ l, creando así un banco de ADN de solución Stock y solución de trabajo.

## III. EVALUACIÓN DE INTEGRIDAD DEL ADN.

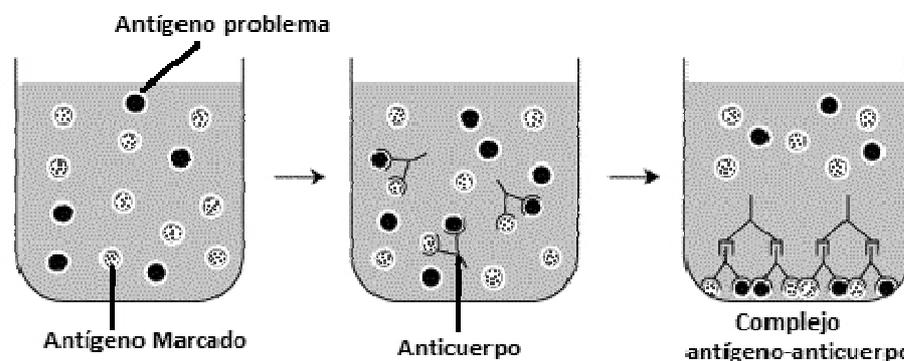
Después de la extracción del ADN se comprobó su integridad por medio de una electroforesis, mediante un gel de agarosa al 0.8% teñido con Bromuro de etidio. Una vez preparado el gel, se realizó una mezcla 1  $\mu$ l de muestra con 2  $\mu$ l de buffer acarreador (colorante azul de bromofenol-xilencianol (0.05%: 0.05%). El gel se corrió por 40 min a 70 volts y finalmente se visualizó en un transiluminador (Benchtop UV Transilluminator UVP) (Fig. 8).



**Figura 8.** Gel de agarosa al 0.8% muestra la presencia de ADN íntegro. Carril 1 marcador de peso molecular  $\lambda$ -Hind III; los carriles 2-7 muestran la presencia de ADN íntegro.

#### IV. CUANTIFICACIÓN SÉRICA DE INSL3.

La determinación de los niveles séricos de INSL3 se realizó en el Departamento de Biología de la Reproducción del INNSZ; tomando 5 ml de sangre periférica que fueron contenidos en un tubo vacutainer (sangre total) tanto en pacientes como controles. Las muestras se centrifugaron por 30 min, para la separación de las fases y facilitar así la recuperación del suero, tomando 3 alícuotas de 100  $\mu$ l de suero para cada individuo colocándolas a temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso; los pacientes incluidos se seleccionaron por edad (entre 8 y 18 años de edad) incluyendo así 21 pacientes con CO idiopática y 20 niños controles. Los niveles de INSL3 se determinaron mediante radioinmunoanálisis (RIA); técnica inmunológica en la que se utilizan radioisótopos radioactivos para detectar antígenos o anticuerpos en líquidos biológicos (Fig.9).



**Figura 9.** Complejo antígeno marcado-anticuerpo y antígeno problema-anticuerpo en la reacción de Radioinmunoanálisis.

La cuantificación sérica de INSL3 se realizó mediante el KIT (RIA) de radioinmunoanálisis Phoenix pharmaceuticals Inc., Belmont CA, RK035-27 de



acuerdo a las instrucciones del fabricante. La preparación de los reactivos para el RIA consistió primeramente en diluir el buffer concentrado del RIA con 150 ml de agua destilada, cuya finalidad es la de reconstituir todos los demás compuestos que integran el KIT y diluir las muestras de suero provenientes de los pacientes; además, se reconstituyó el péptido estándar y el anticuerpo con 200  $\mu$ l y 13 ml respectivamente de buffer. Después de esto se comenzó la reacción de RIA en tubos de poliestireno agregando el anticuerpo y el buffer de RIA, se agitó vigorosamente y se dejó incubar toda la noche a 4°C.

Posteriormente, se reconstruyó el péptido 125 con 13 ml de buffer, se mezcló y se agregaron 100  $\mu$ l de la solución trazadora en cada tubo, se agitaron e incubaron todos los tubos a 4°C durante una noche. Posteriormente se adicionaron 100  $\mu$ l de anticuerpo a cada tubo, al igual que 100  $\mu$ l de suero, se agitaron en un vortex y se incubaron todos los tubos a temperatura ambiente durante 90 min, se añadieron 500  $\mu$ l de buffer RIA a cada tubo y se agitaron nuevamente. Se centrifugaron todos los tubos a 3000 rpm durante 20 min, se aspiró el sobrenadante y se utilizó un espectrofotómetro para detectar las absorbancias de yodo 125 (péptido 125), las cuales fueron correlacionadas con la curva de calibración con diferentes concentraciones de suero de conejo integradas dentro del KIT.

## V. BÚSQUEDA DE VARIANTES ALÉLICAS CONOCIDAS DEL GEN *INSL3*.

### ▪ Análisis de discriminación alélica.

Tanto a los pacientes como individuos control se les realizó el análisis de discriminación alélica 5´exonucleasa TaqMan® (Applied Biosystems), esta técnica se utilizó para la búsqueda de polimorfismos con cambio en una base (SNP): p.R102C, p.R102H, p.R105H y c.3334T>C. Para 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, FAM para el alelo 1 (sonda 1) y VIC para el alelo 2 (sonda 2), además ambas tuvieron en el extremo 3´ un inhibidor de fluorescencia,

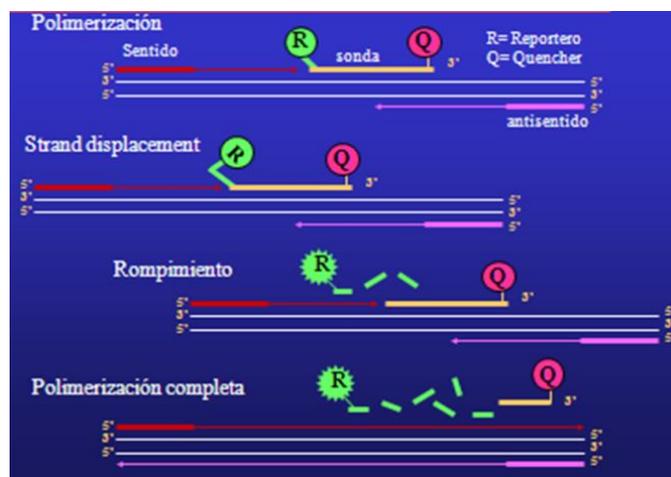
llamado quencher (TAMRA) el cual mientras la sonda permanece intacta, inhibe la emisión de fluorescencia.

Las sondas se colocaron en una mezcla de reacción a 5  $\mu$ l como se indica en la tabla 3 utilizando un termociclador Step One Real-Time PCR System de Applied Biosystems.

**Tabla 3.** Condiciones de la mezcla para discriminación alélica de las variantes alélicas a analizar.

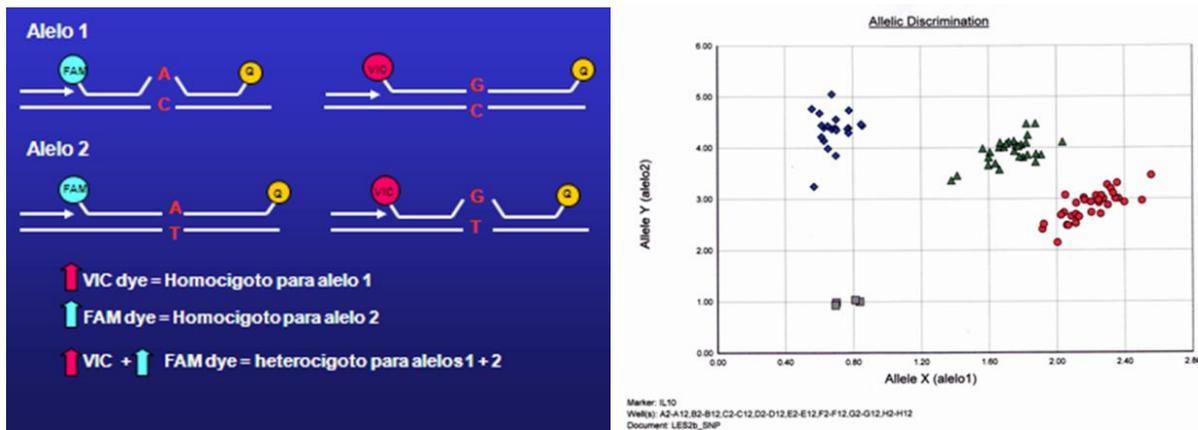
REACTIVO	VOLUMEN
U. PCR MASTER MIX	2.5 $\mu$ l
SONDA	0.625 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	0.4375 $\mu$ l
ADN	2.0 $\mu$ l=200 ng/ $\mu$ l
Volumen Final	5.0 $\mu$ l

El reactivo TaqMan® Universal Master Mix de Applied Biosystems, contiene la enzima AmpliTaq Gold® ADNpolimerasa necesaria para la detección de los polimorfismos, ya que esta enzima tiene actividad tanto de ADNpolimerasa 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 inhibidora de fluorescencia que realiza el quencher sobre la sonda (Fig. 10).



**Figura 10.** Método de fluorescencia de 5' exonucleasa (TaqMan®) para determinación de polimorfismos por discriminación alélica.

De tal manera que dadas las condiciones de astringencia utilizada 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 en 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) (Fig. 11).



**Figura 11.** Hibridación de la sonda y liberación de fluorocromo debido a la acción de la enzima AmpliTaq Gold® ADNpolimerasa, y detección de las emisiones de las fluorescencias de los alelos de cada una de las muestras.

## VI. SECUENCIACIÓN.

### ▪ Amplificación del Exón 1 y 2 del gen *INSL3* por PCR punto final.

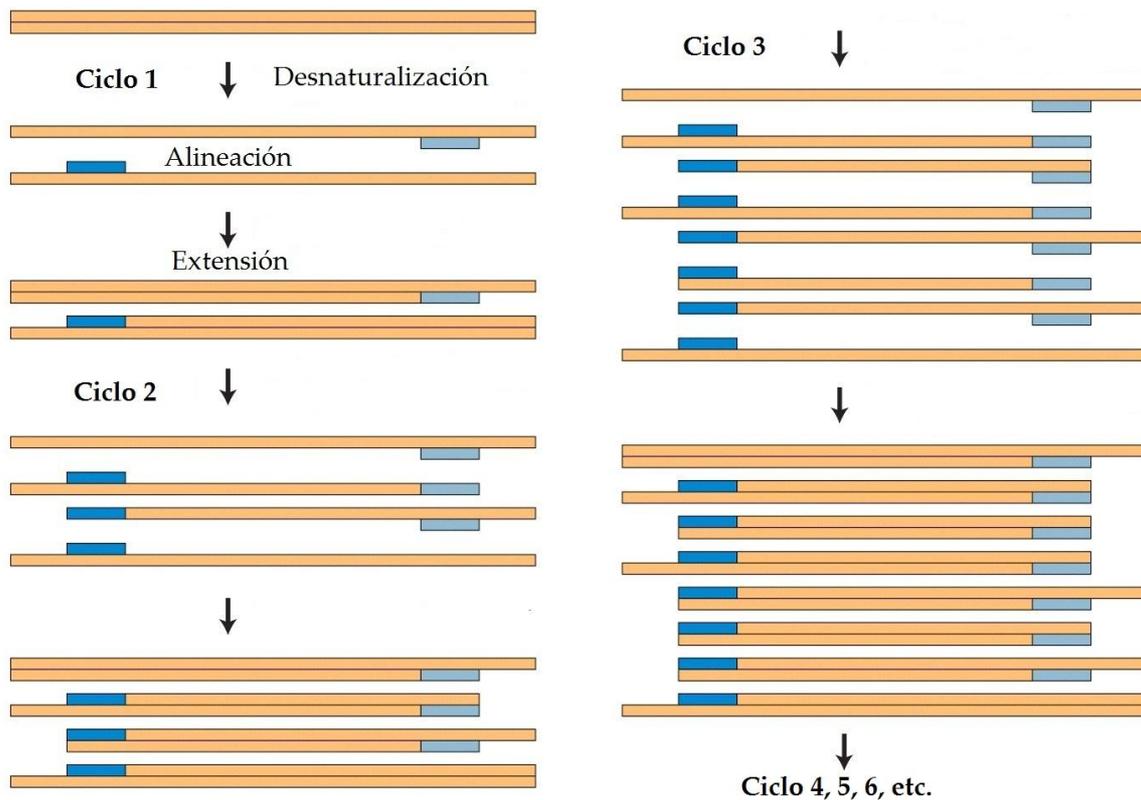
Después de analizar las cuatro variantes alélicas se realizó la amplificación de los exones 1 y 2 del gen *INSL3* mediante PCR punto final. Para lo cual se sintetizaron un par de oligonucleótidos para la amplificación de cada exón; estos fueron diseñados de acuerdo a las secuencias del gen *INSL3* (Tomboc y cols., 2000). Sin embargo para llevar a cabo la reacción fue necesario además de los cebadores (oligonucleótidos), el ADN molde (correspondiente a cada muestra), enzima polimerasa (Taq Gold ADNpolimerasa), Cloruro de magnesio ( $MgCl^{++}$ ) que actúa como un cofactor de la polimerasa y su concentración ayuda a dar especificidad a la reacción, deoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) y un Buffer de reacción específico para que la enzima realice adecuadamente su función. El proceso de amplificación para ambos exones se llevó a cabo con un volumen final de mezcla de reacción de 25  $\mu$ l como se indica en la tabla 4.



**Tabla 4.** Condiciones de la mezcla de reacción de PCR para los exones 1 y 2 del gen *INSL3*.

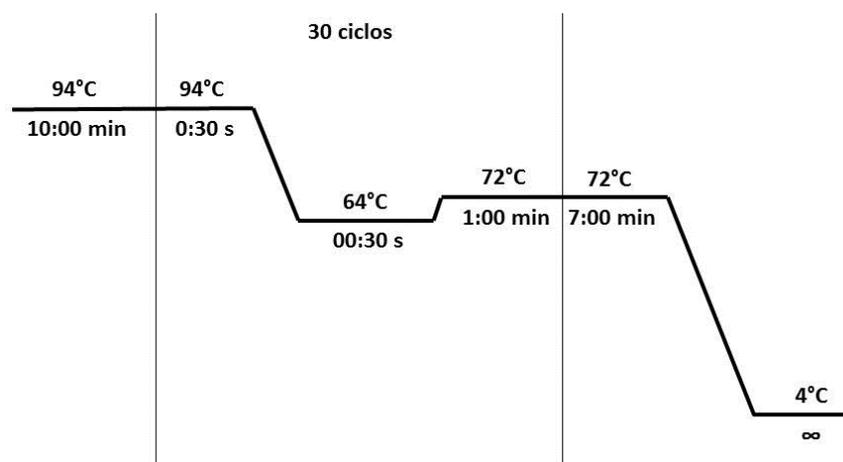
REACTIVO	VOLUMEN
Buffer	2.5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	2.5 $\mu$ l
dNTPs (Nucleótidos)	1.0 $\mu$ l
Primer Sentido	1.0 $\mu$ l
Primer Anti sentido	1.0 $\mu$ l
Taq Polimerasa	0.5 $\mu$ l
DMSO	1.5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	15.0 $\mu$ l
Volumen Final	25.0 $\mu$ l

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. Este consiste en su forma más simple en la realización de tres pasos o etapas sucesivas llevadas a cabo a distintas temperaturas; cada una de estas tres etapas se repiten cíclicamente entre veinte y cuarenta veces (Fig. 12). La primera etapa, denominada desnaturalización, donde se eleva la temperatura a 95°C para separar las cadenas del ADN molde de ADN y así lograr la “desnaturalización” del ADN. En la segunda etapa se disminuye la temperatura a 60°C para permitir la “hibridación” o “alineación” de los cebadores con cada una de las hebras separadas del ADN molde. Por último se eleva la temperatura a 72°C para que la enzima ADN polimerasa sintetice la cadena de novo, de acuerdo con las secuencias complementarias de las hebras del ADN molde. Al cabo del primer ciclo (desnaturalización, alineación, extensión) el fragmento de ADN de interés se ha duplicado y el doble de su cantidad original se encuentra disponible para ser nuevamente replicado en un segundo ciclo. El resultado de la aplicación de numerosos ciclos "en cadena" da lugar a la amplificación exponencial del segmento de ADN delimitado por los cebadores.



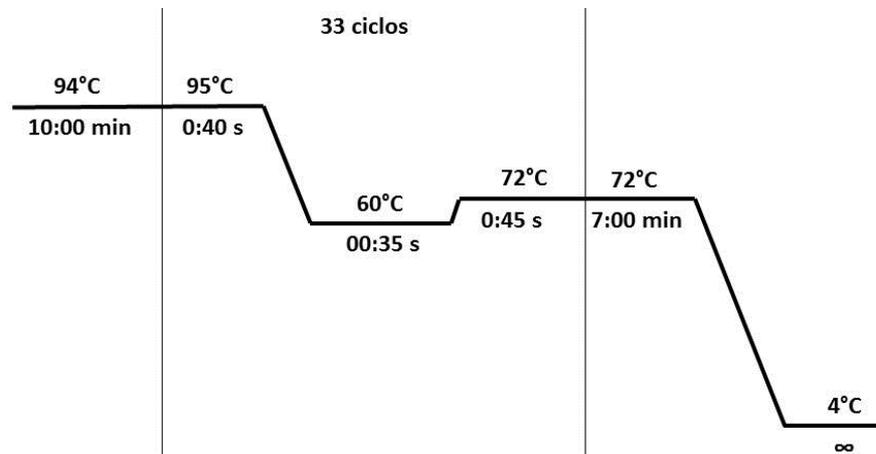
**Figura 12.** Esquema del PCR punto final en el cual se pueden observar las tres etapas o pasos del primer ciclo y en seguida se muestra la manera en la que exponencialmente van aumentando los amplificados, Modificado de Lodish y cols., 2005.

La amplificación del exón 1 se realizó bajo el siguiente protocolo (Fig. 13), utilizando un termociclador GeneAmp® PCR System 2700 de Applied Biosystems.



**Figura 13.** Diagrama del programa de PCR punto final para la amplificación del exón 1 de *INSL3*.

Debido a las características de la secuencia del exón 2, fueron necesarias condiciones de amplificación diferente, como se indica en la Fig. 14.



**Figura 14.** Diagrama del programa de PCR punto final para la amplificación del exón 2 de *INSL3*.

El tamaño de los amplificados fueron corroborados mediante una electroforesis a 85 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 específicos de cada exón, de acuerdo a las secuencias de los cebadores (primers) para el exón 1 se obtuvo un amplificado con un peso de 448pb y para el exón 2 un peso de 326pb.

▪ **Purificación de los exones amplificados del gen *INSL3*.**

Después de amplificar es indispensable la purificación de los productos de PCR antes de someterlos a la reacción de secuenciación, con el fin de eliminar la presencia de contaminantes que pudieran inhibir la reacción de secuenciación del ADN que se requiere analizar. Para esto, se tomaron 20  $\mu$ l del producto de PCR y se colocaron en un tubo cónico de plástico de 0.5 ml estéril, donde se realizó una mezcla con 20  $\mu$ l de agua libre de ADNsas, 60  $\mu$ l de isopropanol grado molecular, se agitó durante 2 s y se dejó a temperatura ambiente durante 12 min; posteriormente la mezcla se centrifugó a 13000 rpm por 12 min desechando el sobrenadante, se lavó el micro pellet con 200  $\mu$ 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 diluyo el micropellet en 10



µl de agua estéril y se corroboró la purificación a través de una electroforesis con un gel de agarosa al 2.5%, en el cual visualizamos nuevamente los amplificados.

▪ **Reacciones para secuenciación.**

Las reacción de secuenciación se realizaron en el Laboratorio de Genética Molecular y Farmacogenética del INCAN (Instituto Nacional de Cancerología), empleando 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. Basado 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 les falta un grupo hidroxilo 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, 1977). La mezcla de reacción para la secuenciación fue como se indica en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Condiciones de la mezcla de reacción para la secuenciación de los exones 1 y 2 del gen *INSL3*.

Reactivo	Cantidad
Big Dye Sequencing Buffer (5X)	0.75 µl
Big Dye Ready Reaction Mix*	0.5 µl
ADN (Producto purificado de PCR)	1 µl (3-10 ng/µl)
Primer (Sense o Antisense)	0.5 µl
H <sub>2</sub> O desionizada	7.25 µl
Volumen Final	10 µl

Donde el Big Dye Ready Reaction Mix\* contiene: dNTPs, ddNTPs (ddG, ddT, ddA y ddC), y el Big Dye Sequencing Buffer (5X) contiene; AmpliTaq ADN Polimerasa, MgCl<sub>2</sub> y Buffer Tris-HCl.

El programa que se empleó para la reacción en el termociclador 9600 de Perkin Elmer fue el siguiente (Fig. 15):

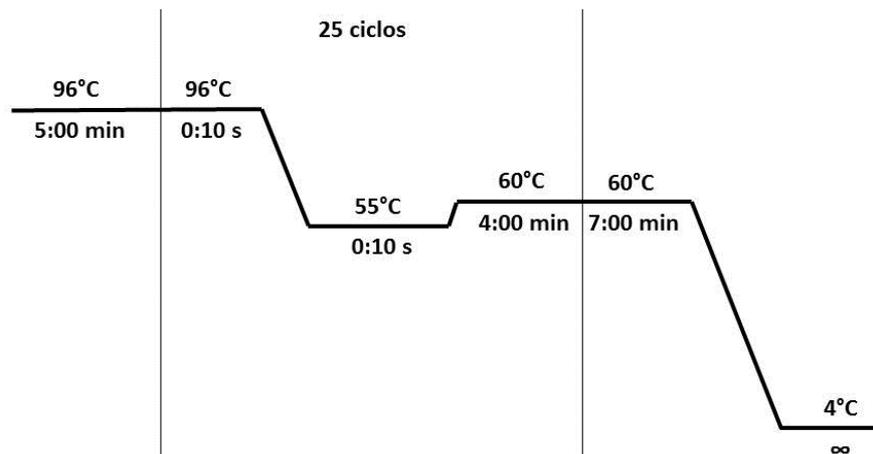


Figura 15. Programa utilizado para el termociclador 9600 de Perkin Elmer.

Las muestras resultantes de la reacción de secuenciación se purifican de la misma manera en que se purifican los productos de PCR (isopropanol grado molecular y etanol 70%), se resuspendieron en 21  $\mu$ l de formamida y se llevaron a 95°C durante 8 min, finalmente se preparó la placa y se colocó en el equipo para su secuenciación.

Las secuencias obtenidas de la amplificación de ambos exones fueron comparadas con la secuencia del gen *INSL3* registrada en BLAST 2 SEQUENCES RESULTS VERSIÓN 2.2.2. ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) y con los datos de la secuencia del gen *INSL3* de tipo silvestre registrados en el GenBank para la determinación de polimorfismos o variantes alélicas en cada exón.

## VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados obtenidos en la cuantificación sérica de *INSL3* en pacientes CO y controles, se llevó a cabo a través de la comparación de medias de ambos grupos y mediante la prueba estadística T-student se corroboró la significancia estadística entre ellos.

Por otro lado, dentro del análisis de discriminación alélica de las variantes p.R102C, p.R102H, p.R105H, se analizaron por presencia o ausencia del SNP en la población CO y control, sin embargo, la variante c.3334T>C que mostró alta heterogeneidad en ambos grupos, fue analizado mediante el estadístico de  $X^2$



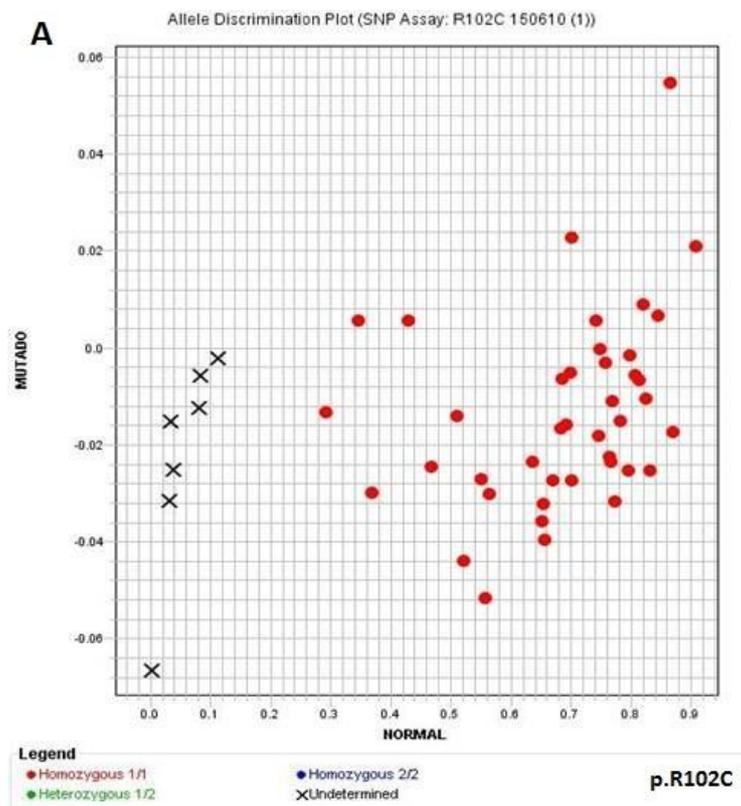
Pearson para determinar la significancia de los datos obtenidos; además al ser una variante con una alta presencia a nivel mundial, nos permitió la comparación de nuestra población con otras poblaciones del mundo como la europea, africana, japonesa y china mediante los datos proporcionados por el Hap Map. Todo el análisis estadístico se asumió bajo un índice de confianza (IC) de 95%; todos los datos fueron analizados con el software estadístico IBM SPSS Statistics 19<sup>®</sup> y en cada prueba se consideró como significativo un valor de  $p < 0.05$ .

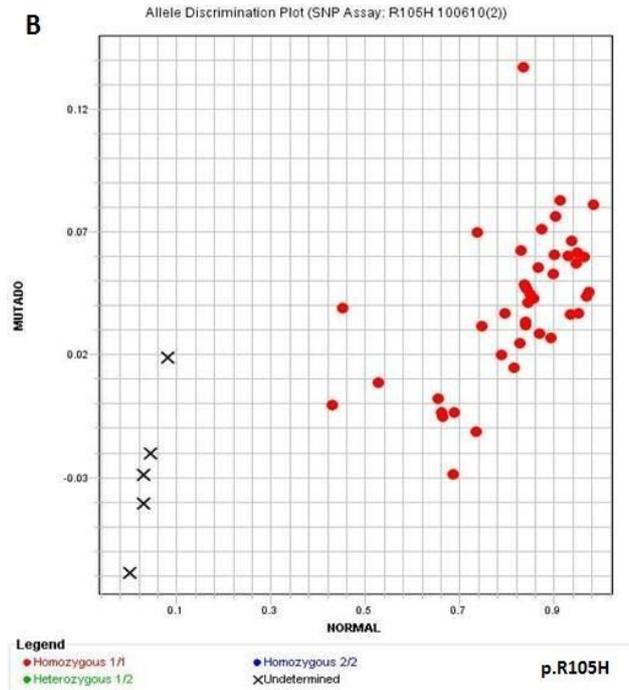
## RESULTADOS.

### BÚSQUEDA DE VARIANTES ALÉLICAS CONOCIDAS DEL GEN *INSL3*.

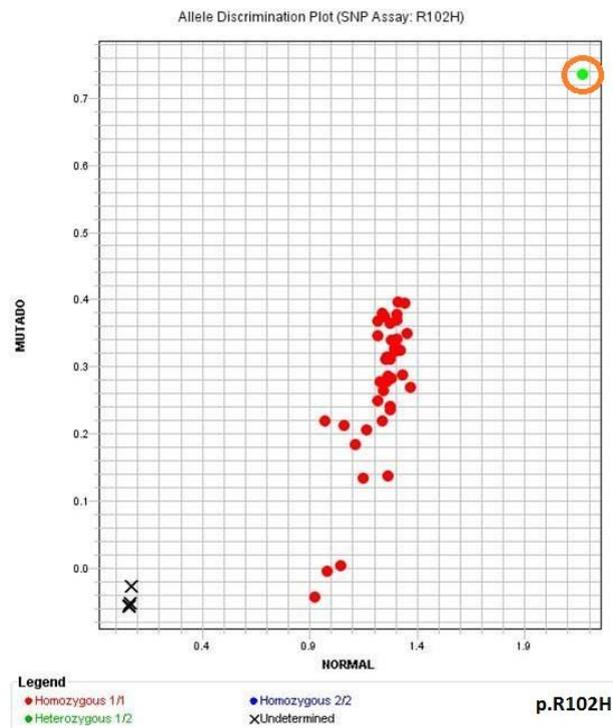
En este trabajo se incluyeron 184 niños mexicanos, de estos 85 son pacientes pediátricos que cuentan con un diagnóstico de CO idiopática abdominal, el 45.8% (39/85) de ellos presentaron la forma bilateral, considerada como el fenotipo grave, mientras que el otro 55.2% (47/85) de los pacientes manifestaron CO unilateral, es importante mencionar que únicamente el 10.6% (9/85) de los pacientes presentaron antecedentes familiares de CO. Además en este estudio se captaron 99 niños sanos que conformaron el grupo control, caracterizado por no presentar anomalías genitourinarias.

Con el análisis inicial de las 3 variantes alélicas conocidas o SNPs en el gen *INSL3* (p.R102C, p.R102H y p.R105H) se pudo observar que las variantes p.R102C y p.R105H no fueron identificadas en nuestro estudio, tanto los pacientes CO como el grupo control resultaron homocigotos normales para estas variantes (p.R102C y p.R105H) (Fig. 16).





**Figura 16.** Análisis de discriminación alélicas para las variantes: A. p.R102C. B. p.R105H en el que se muestra que el 100% de los individuos resultaron homocigotos normales.



**Figura 17.** Análisis de discriminación alélica para el SNP p.R102H que muestra uno de los pacientes CO como heterocigoto.

En tanto que la variante p.R102H se identificó en el 1.17% (1/85), detectándose en un solo paciente con CO bilateral, presentando el testículo izquierdo fuera de la vía normal de descenso y el derecho en la región abdominal,



este paciente resultó heterocigoto, es decir, presentó sólo en uno de sus alelos la variante alélica p.R102H y sin antecedentes familiares. (Fig. 17). Estos datos concuerdan con estudios realizados en otras poblaciones, donde la proporción de variantes identificadas es similar a la nuestra, con una frecuencia relativamente baja.

En el caso del análisis del SNP c.3334T>C ubicado en la región intrónica del gen *INSL3* y que se presenta en alta frecuencia en la población general a nivel mundial, mostró una mayor heterogeneidad alélica tanto en pacientes CO como en controles, que aunque no se muestran diferencias significativas en ambos grupos, el estado heterocigoto predomina en los pacientes con CO (51.8%). Incluso al realizar la correlación del genotipo con el fenotipo, agrupando a los pacientes de acuerdo al tipo de CO, unilateral o bilateral, ambos grupos muestran una frecuencia alta del estado heterocigoto con un 30% y 25% respectivamente (Tabla 6 y 7). Por otra parte al comparar estas frecuencias alélicas de nuestros pacientes con otras poblaciones como la africana, europea, japonesa y china, se puede observar que la frecuencia del alelo alterado (C) de los pacientes con CO mexicanos se encuentra muy parecida a la población Europea, lo cual puede deberse a la influencia genética de nuestra población con algunas poblaciones del oeste de Europa, como la española (Tabla 8).

**Tabla 6.** Frecuencia alélica y genotípica del SNP c.3334T>C en pacientes mexicanos con CO idiopática.

SNP	Genotipos de Pacientes CO	Frecuencia Alélica	Genotipos de Controles	Frecuencia Alélica	Valor de P
c. 3334 T>C	TT= 15.3%	T= 42.2%	TT= 17.2%	T= 36.7%	0.081
Alelo	CC= 30.6%	C= 57.8%	CC= 42.4%	C= 63.3%	
ancestral: T	TC= 51.8%		TC= 35.4%		

**Tabla 7.** Correlación del fenotipo con el genotipo de la variante c.3334T>C en pacientes mexicanos con CO idiopática.

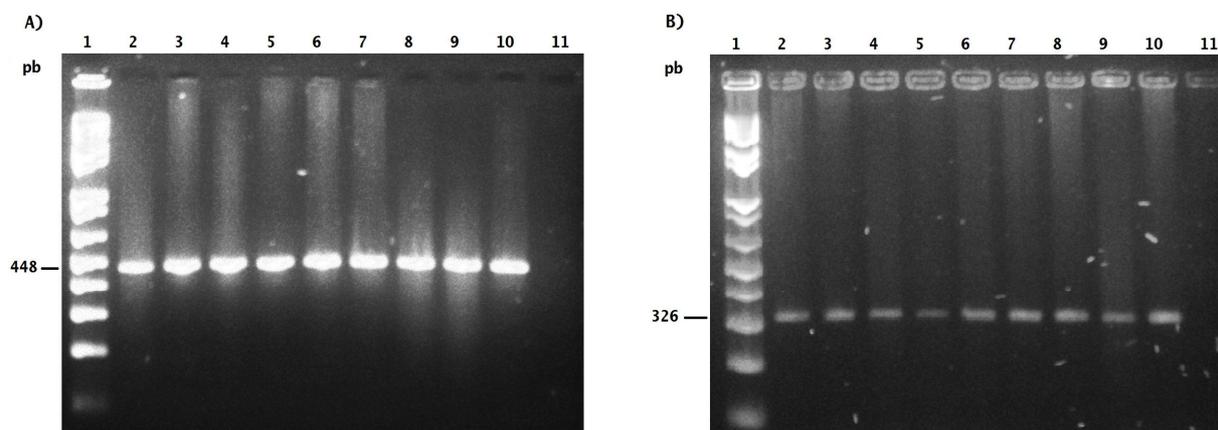
SNP	Unilateral	Bilateral	Valor de P
c. 3334 T>C	TT= 8.75%	TT= 6.25%	0.660
Alelo ancestral: T	CC= 13.75%	CC= 16.25%	
	TC= 30%	TC= 25%	

**Tabla 8.** Comparación de las frecuencias alélicas del SNP c.3334T>C en la población mexicana y otras poblaciones del mundo.

SNP	Alelos involucrados	Población mexicana		África	Europa	Asia Japón	Asia China
		CO	Control				
c. 3334T>C	T	42.2%	36.7%	17.8%	40.4%	38.6%	35.9%
	C	57.8%	63.3%	82.2%	59.6%	61.4%	64.1%

### BÚSQUEDA DE VARIANTES ALÉLICAS DESCONOCIDAS DEL GEN *INSL3* MEDIANTE EL MÉTODO DE SECUENCIACIÓN.

Después del rastreo dirigido de alteraciones conocidas que nos reflejó un índice de detección bajo para las variantes analizadas, nos propusimos buscar alteraciones desconocidas en la región codificante del gen *INSL3*, mediante el método de secuenciación automática, esto fue factible gracias a que se trata de un gen relativamente pequeño (4,999 pb), constituido sólo por dos exones y un intrón; con base a esto se llevó a cabo la estandarización de la reacción de amplificación por PCR punto final de las regiones codificantes (Fig. 18).

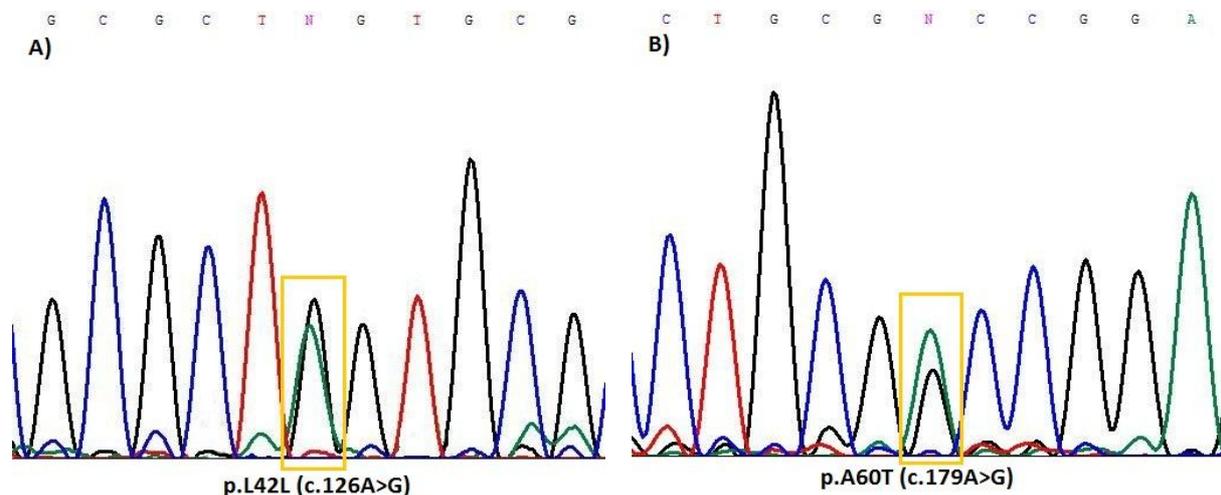


**Figura 18.** Amplificados del gen *INSL3* A) Carril 1 marcador de pesos, del carril 2 al 10 amplificados de 448pb correspondiente al exón 1 en pacientes CO, carril 11 control negativo B) Carril 1 marcador de pesos; del carril 2 al 10 amplificados de 326pb correspondiente al exón 2 en pacientes CO ,carril 11 control negativo.

Estos amplificados fueron purificados y secuenciados, empleando un secuenciador automático de Applied Biosystems modelo 310, versión 3.0, ABI-CE1, con el KIT Big Dye Terminators v3.1 Cycle Sequencing Kit de Applied Biosystems;

las secuencias resultantes fueron comparadas con los datos obtenidos a partir del GenBank., detectando así cuatro variantes alélicas diferentes: p.L42L, p.A60T, p.R105R y p.T86M.

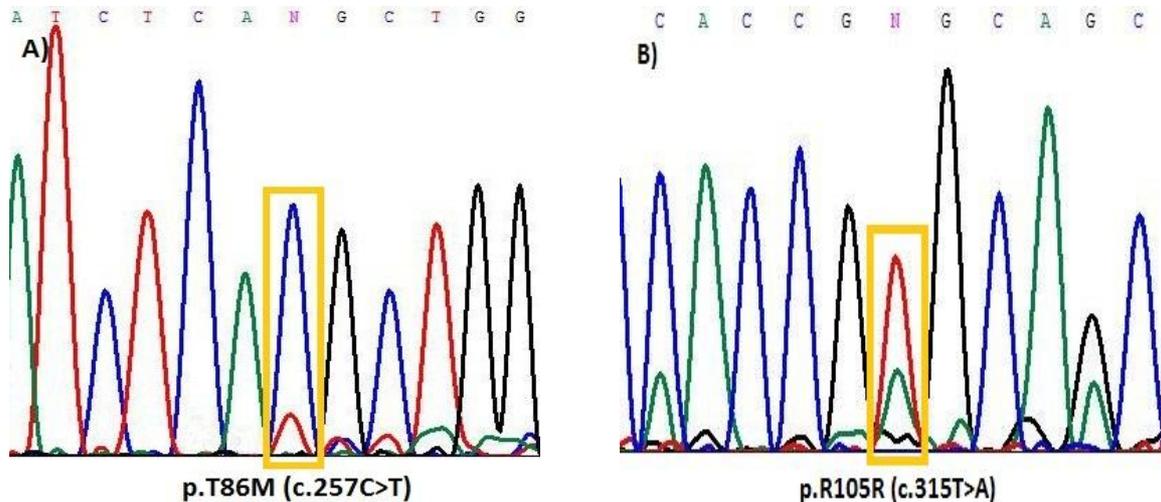
Las dos primeras variantes están ubicadas en el exón 1 (p.L42L [c.126G>A] y p.A60T [c.178G>A]); estas variantes se ubican en la cadena B y péptido-C respectivamente de la preprohormona, la primera alteración detectada es de suma importancia, al ubicarse en el sitio que une al dominio extracelular del receptor (RXFP2). El SNP p.L42L se identificó en 4 pacientes con CO idiopática, dos de ellos presentaron un fenotipo grave, es decir una CO abdominal bilateral, en tanto que los otros pacientes fueron diagnosticados con CO abdominal unilateral, todos ellos en estado heterocigoto. Es importante mencionar que uno de estos pacientes presentó antecedentes heredofamiliares, donde el padre presentó CO unilateral izquierda. En cuanto a la variante p.A60T, se detectó en dos pacientes con CO idiopática abdominal bilateral, uno de ellos homocigoto (ambos alelos presentaban la alteración) y el otro paciente heterocigoto (con un solo alelo afectado), estos pacientes no presentaron antecedentes heredofamiliares de CO (Fig. 19).



**Figura 19.** Espectroferogramas que muestran la secuenciación del exón 1 del gen *INSL3* de dos pacientes CO heterocigotos, cada uno con una variante alélica diferente A) p.L42L y B) p.A60T.

En el exón 2 se encontraron las alteraciones c.315T>A (p.R105R) y c.257C>T (p.T86M); dichas alteraciones se ubican en el péptido C, lo que puede mostrar un impacto crucial para la maduración de *INSL3* y verse reflejado en un fenotipo grave

en los pacientes, pues en ambos casos los pacientes presentan CO idiopática bilateral sin antecedentes familiares (Fig. 20).



**Figura 20.** Espectroferogramas de las secuencias alteradas del exón 2 del gen *INSL3* correspondientes al SNP A) p.T86M y B) p.R105R.

Finalmente en nuestro estudio identificamos cinco alteraciones, una de ellas detectada a partir del análisis de búsqueda de variantes alélicas conocidas (R102H) y las otras cuatro p.L42L, p.A60T, p.R105R y p.T86M las logramos caracterizar por el método de secuenciación. Se sugiere que la mayoría de las alteraciones se asocian a un fenotipo grave (criptorquidia bilateral), tres de ellas descritas en otras poblaciones (p.L42L, p.A60T y R102H) y dos variantes alélicas no reportadas previamente en la literatura (p.T86M y p.R105R). Con todo este análisis molecular se logró un índice de detección de alteraciones genéticas de 5.88% en 170 alelos analizados de nuestros 85 pacientes con CO idiopática.

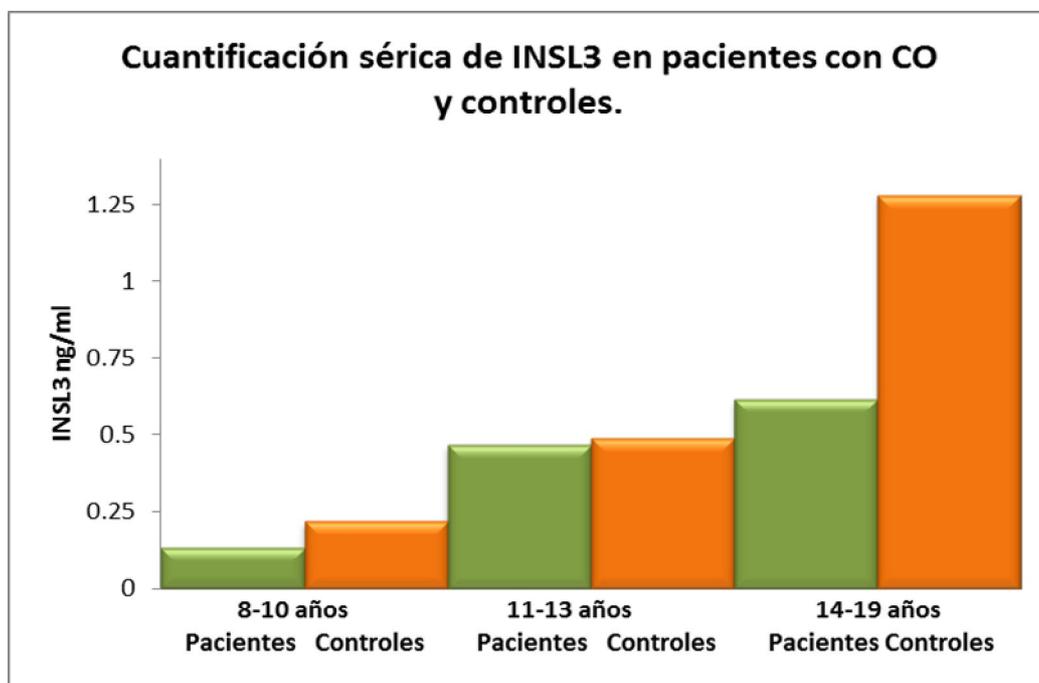
### CUANTIFICACIÓN SÉRICA DE *INSL3*.

La determinación de los niveles séricos de *INSL3* se llevó a cabo en pacientes mayores de ocho años, edades que se especifica en la literatura presentan mayor expresión de *INSL3*, esto con la finalidad de correlacionar los niveles de esta hormona con el fenotipo y el genotipo de los pacientes con CO. Así fueron seleccionados 41 individuos: 21 pacientes con CO y 20 niños controles. Los resultados obtenidos en relación a la cuantificación sérica mostraron una media de 0.306 ng/ml en la concentración de *INSL3* en los pacientes con CO idiopática, lo cual

está por debajo de la media mostrada por el grupo control (0.555 ng/ml) (Tabla 9) (Fig. 21). De ahí la necesidad de buscar alteraciones dentro de este gen. Sin embargo es importante hacer notar que el tamaño de muestra que incluimos en esta parte fue reducida.

**Tabla 9.** Concentraciones séricas de INSL3 (Media  $\pm$  EE) en pacientes CO y controles.

Grupo	Número de Muestras	Cuantificación Sérica de INSL3 (ng/ml)	Valor de P
Pacientes CO	21	0.305 $\pm$ 0.055	0.044
Control	20	>0.555 $\pm$ 0.101	



**Figura 21.** Comparación de las concentraciones séricas de INSL3 en pacientes CO (columnas verdes) vs grupo control (columnas naranjas) mostrando bajas concentraciones desde los 8 años de edad, y haciéndose más evidentes después de los 14 años.



## DISCUSIÓN.

La criptorquidia o no descenso testicular es un padecimiento que mantiene una correlación con el CT, debido a que el testículo no descendido muestra cambios histológicos en su epitelio germinal, que en estado adulto favorecen la infertilidad; varios reportes a nivel mundial refieren que un paciente con CO presenta un riesgo de 7.3 a 9.7 veces mayor de padecer CT que un individuo sano (Cortes, 2003; Ferlin y cols., 2008; Bay y Andersson, 2010). A pesar de ser un padecimiento frecuente con serias secuelas tanto de tipo oncológico como de fertilidad, no existe una herramienta diagnóstica específica que oriente al clínico al diagnóstico oportuno y se otorgue así un tratamiento adecuado evitando las repercusiones en la salud del varón afectado.

En este estudio, al analizar el fenotipo de nuestra población de pacientes pediátricos mexicanos con diagnóstico de CO idiopática se observa un porcentaje de 45.8% de pacientes CO bilaterales, en contraste a lo que reporta el grupo de Ferlin en el 2008 (39.6%) en pacientes italianos, esto es de gran importancia debido a que se ha documentado que el estado de bilateralidad en esta patología causa un riesgo de cuatro veces mayor de presentar CT que la población en general (2%-3%) (Foresta y cols., 2008).

Otro aspecto de suma importancia es la fertilidad pues se reporta que uno de cada tres pacientes con CO suele presentar problemas de infertilidad, esto ha sido comprobado a partir de estudios histológicos, observando que el número de células germinales y células de Leydig en los testículos criptorquídicos se encuentran dentro del rango normal, sin embargo el número total de espermatogonias es bajo y muchas células germinales permanecen indiferenciadas, lo que a su vez aumenta hasta 10 veces el riesgo de desarrollar algún tumor testicular específicamente seminoma en los pacientes que presentan esta patología (Cortes y cols., 2001; Cortes y cols., 2003; Ashley y cols., 2010).

La calidad anormal seminal es común en los pacientes con CO, presentando conteos espermáticos reducidos y pocos espermatozoides morfológicamente



normales en varones con CO bilateral (71% a 100%) y en hombres con CO unilateral (18% a 43%) (Ashley y cols., 2010); inclusive, se ha reportado que cerca del 20% de los individuos que presentan azoospermia corresponden a pacientes que tienen o tuvieron CO. Es de gran relevancia destacar que los problemas de infertilidad se reducen en cerca del 76% de los casos si se realiza la orquidopexia (procedimiento quirúrgico que corrige la criptorquidia) antes de los 10 meses de edad en los pacientes con CO (Hadziselimovic y cols., 2006; Kurpisz y cols., 2010; Park y Choi, 2010).

A pesar de que el proceso de descenso testicular no está totalmente elucidado, sabemos que *INSL3* participa dentro de la fase transabdominal del descenso testicular y se ha propuesto que puede participar de manera importante dentro de la fase inguinoescrotal del descenso, así como de un buen mantenimiento de las células germinales (Kurpisz y cols., 2010). Se expresa en células de Leydig de testículos fetales y adultos, y es considerada como un excelente marcador del estado funcional de las células de Leydig (Joensen y cols., 2008); por esta razón cualquier error dentro de la secuencia del gen *INSL3* podría generar una hormona disfuncional que repercuta en el no descenso de los testículos.

Este análisis molecular intenta definir como están involucradas las alteraciones en la secuencia del gen *INSL3* con el descenso testicular, lo que podría ser de gran utilidad para establecer un diagnóstico oportuno de esta enfermedad, aún más, en un futuro la posibilidad de identificar portadores en nuestra población y otorgar a esas familias un asesoramiento genético certero.

Existen estudios realizados en varias poblaciones distintas a la mexicana, que revelan que ciertas variantes alélicas pueden asociarse a la CO idiopática (Nef y Parada, 1999; Zimmermann y cols., 1999; Kawamura y cols., 2004; Ferlin y cols., 2006; Foresta y cols., 2008); sin embargo, existe gran variación en cuanto a la frecuencia y tipos de alteraciones en las diferentes poblaciones del mundo; de hecho, se sabe que en poblaciones con un alto grado de mestizaje puede existir una mayor diversidad de alteraciones o variantes alélicas, en comparación de aquellas



poblaciones con menor mestizaje o carácter endogámico, donde predominan un menor número de alteraciones a nivel génico (Lisker y cols., 1990).

Hasta la fecha se conocen cerca de 160 polimorfismos en el gen *INSL3* descritas en diferentes poblaciones a nivel mundial entre ellas se encuentran: p.P49S, p.P93L, p.R102C, p.N110K, p.R102H, p.R105H, p.C19G, p.V18M, p.W69R, p.R73X, p.L9L, p.L42L, p.A60T y p.R63X; sin embargo, la mayoría de estas variantes alélicas se han descrito tanto en pacientes como en la población general y se caracterizan por ser poco frecuentes (entre 0.2% a 1%) aun en los pacientes con CO.

Después del análisis de las variantes alélicas p.R102C y p.R105H del gen *INSL3* en nuestra población mestizo mexicana, logramos definir que ninguno de los dos grupos de estudio (pacientes y controles) presentaban el alelo alterado, a diferencia de Ferlin en el 2006 y Foresta en el 2008 que detectaron dos pacientes italianos con fenotipo unilateral y bilateral respectivamente, estos hallazgos en nuestra población podría atribuirse, por un lado, al tamaño de muestra, que hasta el momento puede considerarse todavía pequeño y por otro lado que estas dos alteraciones fueran endémicas de la población Italiana y por tal motivo no son detectadas en nuestros pacientes, por lo tanto posiblemente nuestros pacientes presenten alteraciones distintas a las descritas en otras poblaciones del mundo.

En tanto que la presencia del SNP p.R102H en estado heterocigoto en uno de nuestros pacientes con CO bilateral con testículo derecho abdominal e izquierdo ectópico, permite la comparación de nuestro estudio con otro en la población italiana. Debido a que Foresta y cols., en el 2008 estudiaron un total de 540 pacientes y encontraron que cinco son heterocigotos para esta variante, porcentaje muy similar al nuestro 0.93% y 1.17% respectivamente, cabe aclarar que de estos cinco pacientes italianos, tres de ellos presentaron una CO unilateral, y niveles espermáticos bajos; los otros dos pacientes corresponden al fenotipo bilateral y en uno de ellos su madre fue portadora de este polimorfismo.



En nuestro estudio al paciente positivo para esta variante se le realizó orquidopexia a la edad de siete años, lo que aumenta la probabilidad de presentar problemas de infertilidad o un posible riesgo de CT. Esto se infiere debido a que distintos estudios demuestran que la criptorquidia ocasiona disturbios, principalmente en la espermatogénesis y en el posible desarrollo de CT. Sin embargo, la corrección de la malformación por medio de la orquidopexia realizada antes de los dos años de vida postnatal recupera la fertilidad hasta en un 90%, comparado con el 50% cuando se realiza de los nueve a los doce años de edad (Murphy y cols., 2007).

Las dos variantes localizadas en el codón 102 de la proteína (p.R102C y p.R102H) influyen directamente sobre el desarrollo de la criptorquidia e inclusive se les ha relacionado con infertilidad debido a que en cuatro de seis pacientes que presentan estos polimorfismos se observa un daño considerable en la espermatogénesis reflejada en baja concentración espermática. Esto podría deberse a que la arginina (aminoácido silvestre en la posición 102 de esta proteína) es el cuarto residuo antes del último aminoácido que compone al péptido-C, se sabe que su función es de suma importancia al formar parte del sitio de unión del péptido-C con la cadena A, debido a que esta unión hace posible la maduración del péptido desde una preprohormona inmadura hasta la hormona madura. Por lo cual, el cambio de aminoácido ocasiona problemas en esa unión y por ende en la maduración de esta hormona; sin embargo, se ha prescrito que el cambio de una Arginina (R) por una Histidina (H) en esta posición no altera su proceso de maduración, aunque disminuye su efectividad de unión entre el péptido-C y la cadena A. Por otro lado, el cambio de una Arginina por una Cisteína ocasiona cambios importantes en la carga de esta región y los análisis funcionales han mostrado disminución en la activación del receptor de esta hormona localizado en el gubernáculo (RXFP2) (Ferlin y cols., 2003; El Houate y cols., 2007).

En relación a la variante alélica c.3334T>C localizada en la región no codificante del gen *INSL3*, que seleccionamos por estar presente en una alta frecuencia en la población general de Europa occidental y septentrional, en la población asiática conformada por China y Japón, así como en el norte y centro de



África. Pese a presentarse en alta frecuencia en estas poblaciones, no localizamos reportes respecto a su posible asociación con pacientes con CO idiopática. Al realizar este análisis observamos que el grupo control presentó un genotipo C/C con una frecuencia muy parecida a la población china, en tanto que para el grupo de pacientes con CO idiopática el genotipo T/T presentó una frecuencia muy similar a la europea.

Así al comparar nuestro grupo CO con el grupo control se observa una distribución muy heterogénea tanto en pacientes como en controles y a pesar de no haber diferencia significativa entre la presencia de este polimorfismo en ambos grupos, se observa que el alelo alterado (T/C) se presenta en un 51.8% de los pacientes y parece influir más sobre los pacientes con CO unilateral al presentarse el genotipo T/C en 30% de esos pacientes. Por lo cual inferimos que el polimorfismo c.3334T>C en estado heterocigoto puede inferir un riesgo mayor de heredar CO a su descendencia que el estado homocigoto normal o mutado; esto aunado a que todos los factores indispensables intervengan en el momento preciso dentro del proceso de desarrollo embrionario para desarrollar esta malformación tan frecuente. Para poder inferir lo anterior de manera más convincente es necesario ampliar nuestro número de muestras y así poder observar más claramente el comportamiento de esta variante alélica en la población mexicana tanto en pacientes con diagnóstico de CO idiopática como en el grupo de individuos sanos.

En poblaciones con una alta heterogeneidad, como México, una variedad de metodologías deben ser combinadas para mejorar la tasa de detección de variantes alélicas en múltiples genes relacionados a ciertos padecimientos mendelianos y aún más en enfermedades complejas como la CO. Por esta razón en este trabajo se utilizaron diferentes estrategias para mejorar nuestra tasa de detección en los 85 pacientes pediátricos mexicanos analizados.

Mediante secuenciación automática del gen *INSL3*, logramos caracterizar la presencia de 2 variantes alélicas en el exón 1 y dos en el exón 2, c.126G>A (p.L42L) y c.178G>A (p.A60T) y c.257T>C (p.T86M) y c.315T>A (p.R105R) respectivamente.



La primera alteración p.L42L en el exón 1, se encontró en cuatro pacientes en estado heterocigoto, dos de ellos presentaron criptorquidia bilateral abdominal y dos de ellos la forma unilateral, cabe mencionar que uno de estos pacientes presento antecedentes familiares. La segunda alteración en el exón 1 p.A60T, se presentó en dos pacientes, uno de ellos en estado homocigoto y parece estar relacionada con el fenotipo grave, ya que ambos pacientes presentan CO bilateral abdominal. En la literatura estos polimorfismos han sido descritos en pacientes italianos, sin embargo no se ha estudiado cómo estos polimorfismos influyen dentro del desarrollo de esta patología en relación con la maduración de la hormona *INSL3*, sin embargo la presencia de ambos polimorfismos en una alta frecuencia en los pacientes con CO idiopática y que dichos pacientes presenten el fenotipo grave, refleja la importancia de estas alteraciones afectando el correcto descenso testicular desde etapas de desarrollo embrionario.

Estos polimorfismos se ubican dentro de la preprohormona, en la cadena B (p.L42L) y péptido-C (p.A60T). La primera es de suma importancia a pesar de no generar un cambio de aminoácido, pese a esto, al encontrarse en el sitio de unión de la hormona madura *INSL3* con el dominio extracelular del receptor (RXFP2) que se ubica en células gubernaculares, podemos inferir que podría afectar la efectividad de unión entre ligando y receptor, ocasionando en primer lugar, una producción anormal de *INSL3*, debido a un mal desarrollo de la etapa transabdominal del descenso testicular y como consecuencia la presencia del fenotipo CO.

Por otro lado el SNP p.A60T conlleva a un cambio de aminoácido en el codón 60 donde una alanina (A) es sustituida por una treonina (T). La alanina se encuentra catalogada dentro de los aminoácidos no polares o hidrofóbicos, los cuales son menos solubles en agua que los aminoácidos polares. Sin embargo, se sabe que el miembro menos hidrófobo de esta clase es precisamente la alanina que cuenta con un peso molecular de 89 g/mol y se halla casi en la línea fronteriza entre los aminoácidos no polares y los polares, donde se encuentra la treonina con un peso molecular de 119 g/ml donde su solubilidad se debe a los grupos hidroxilo que presenta, los cuales no son presentados por la alanina (Lehninger, 2006); lo que nos permite inferir que el comportamiento del péptido-C se verá afectado por el cambio



de aminoácido, pues aunque la treonina posea un comportamiento similar a la alanina, su poca solubilidad puede interferir de manera importante en esa región, esto aunado a que la treonina es un aminoácido de mayor longitud y lo que requiere el péptido-C es unir lo más posible la cadena A y la cadena B para llevar a cabo la maduración de la hormona.

En relación a la segunda región codificante (exón 2) analizada, las secuencias mostraron dos alteraciones que hasta el momento no habían sido descritas en la literatura a nivel mundial, los polimorfismos descritos son: c.257C>T y c.315T>A, ambas alteraciones en la secuencia nucleotídica dentro del gen *INSL3* se presentan en un paciente independiente y podrían estar influyendo de manera importante en la patología, debido a que ambos pacientes que presentaron estos polimorfismos, presentan un fenotipo grave, testículos bilaterales abdominales, aunque solo en la primera alteración (c.257T>C) se muestra un cambio de aminoácido de una Treonina (T) a una Metionina (M) en el codón 86 (p.T86M). Dicho cambio es de suma importancia debido a las características fisicoquímicas de ambos aminoácidos. En el caso de la treonina, como se mencionó anteriormente es un aminoácido polar, con solubilidad en agua, mediado a través de sus grupos hidroxilo, sin embargo, la metionina es totalmente insoluble en agua y además contiene azufre (Lehninger, 2006), lo cual nos hace pensar que cambia la polaridad del codón 86 del péptido-C, importante para el inicio de la maduración de *INSL3* (Foresta y cols., 2008).

Por otro lado el SNP c.315T>A (p.R105R) ocasionado por un cambio en la segunda región codificante del gen *INSL3* en el nucleótido 315 cambiando una Timina por una Adenina, puede resultar muy importante a pesar de que no provoca un cambio de aminoácido, sin embargo la localización de este polimorfismo está dentro de los tres últimos aminoácidos del péptido-C, el cual une a la cadena A de la preprohormona, por lo que su presencia ocasiona una alteración importante en el desarrollo normal de *INSL3*, el cambio podría influir en la baja efectividad de la maduración hormonal. De hecho, Foresta y cols., en el 2008, infieren la importancia de las alteraciones encontradas en el péptido-C, relacionadas con el desarrollo de esta patología, estos autores reportan que de diez polimorfismos que han descrito, seis de ellos se encuentran en esta región y el análisis comparativo de las proteínas



traducidas de las variantes alélicas han mostrado una reducción en la efectividad de la maduración a una hormona madura y funcional.

Los estudios moleculares realizados hasta el momento, revelan que existe susceptibilidad genética asociada con la CO idiopática, pero la detección de variantes se vuelve complicada, por el simple hecho de tratarse primeramente de una patología compleja donde se ven fuertemente involucrados desde factores ambientales, hasta genéticos, esto aunado a que la enfermedad es poligénica, y a pesar de los hallazgos en este estudio en la población mexicana que además tiene una alta heterogeneidad genética, es importante destacar la necesidad de ampliar el número de pacientes a analizar, así como el número de variantes a rastrear dirigidamente, aún más, es indispensable hacer una tamizaje de alteraciones en la totalidad del gen *INSL3*, incluyendo la región no codificante, promotora e intrónica del gen, que en caso de estar alterada podría ocasionar o influir en un mal desarrollo, de la hormona, así como del proceso de descenso testicular. Es importante destacar que al tratarse de un padecimiento poligénico es de suma importancia analizar otros genes que junto con el gen *INSL3* podrían estar participando en todo el proceso de descenso testicular y así detectar las alteraciones génicas en los pacientes con diagnóstico de CO idiopática; por otro lado, es imprescindible realizar el estudio en las familias afectadas para identificar portadores en los familiares de primer grado como padres y hermanos.

Sin embargo debemos tomar en cuenta que al tratarse de un padecimiento que interfiere con la fertilidad la gran mayoría de las alteraciones en los pacientes presentan una baja heredabilidad (Massart y Saggese, 2010), debido a esto podemos sugerir una baja tasa de identificación de alteraciones, aunque gracias a estudios hechos por Ferlin y Foresta en el 2006 y 2008 respectivamente, se muestra que algunas de las variantes alélicas presentes en los pacientes con CO, además de presentarse generalmente en una frecuencia baja en múltiples poblaciones, también se ha visto que son heredadas vía materna, por lo que resulta de gran relevancia al proponer estas variantes como marcadores útiles para otorgar un diagnóstico oportuno en la identificación de portadores, incluso de madres portadoras y llegar en determinados casos hasta un diagnóstico prenatal, cuya importancia no es



simplemente detectar las alteraciones o polimorfismos buscados, si no proveer un rango de elecciones y recomendaciones para la pareja en riesgo de tener un hijo con este padecimiento y de esta manera evitar la mayor cantidad de factores que podrían desencadenar la CO (Alvarenga, 2002).

Otra estrategia utilizada para observar la importancia de la hormona INSL3 en el correcto desarrollo de descenso testicular fue el radioinmunoanálisis, a través del cual pudimos comprobar que existe asociación entre la disminución de los niveles de INSL3 en pacientes con CO idiopática a comparación de los individuos controles, así los niveles séricos de nuestros pacientes de edades entre los 8 y 18 años concuerda con lo reportado por Bay y cols. en el 2010.

Cabe mencionar que los paciente en los que encontramos alguna variante alélica no cubrieron los criterios de inclusión para analizar los niveles séricos de INSL3, sin embargo la producción de la hormona en baja o alta cantidad genera problemas dentro del desarrollo de la CO. Se ha observado que los bajos niveles de INSL3 dificulta el descenso testicular y desencadena el fenotipo bilateral abdominal, esto observado en modelos animales; sin embargo recientes hallazgos demuestran que esta hormona induce el desarrollo del gubernáculo de una manera independiente de andrógenos y que la sobreexpresión de INSL3 causa de igual manera una mala diferenciación del gubernáculo y por ende la presencia de CO (Bogatcheva y cols., 2003; Kojima y cols., 2009)

Únicamente un grupo de investigadores en Dinamarca ha reportado la expresión de INSL3 y LH en niños sanos a partir de sangre de cordón y plasma sanguíneo; mostrando una elevada expresión de INSL3 y LH hasta los 3 meses de edad. Sin embargo, los individuos Daneses con CO presentan baja expresión de INSL3 a pesar de haber niveles normales de LH, lo cual sugiere que la CO podría deberse a una disfuncionalidad de las células de Leydig lo cual a su vez fortalece los hallazgos acerca de que los pacientes con CO además de presentar baja producción de INSL3, presentan una reducción importante en la esteroidogénesis y espermatogénesis (Bay y cols 2007; Bay y Andersson, 2010).



Aunado a esto, la concentración sérica de INSL3 ya había sido determinada en otros estudios, en los cuales, se ha mostrado un incremento progresivo de la expresión de esta hormona durante la pubertad, específicamente desde la edad de 10 años, llegando a niveles máximos superiores a los 2 ng/ml en la edad adulta y disminuyendo nuevamente en edades avanzadas (Bay K. y Andersson, 2010). Lo que refleja que esta hormona es crucial en el correcto desarrollo reproductivo del varón.

A su vez, se ha demostrado la importancia de INSL3 dentro de la salud reproductiva, debido a que pacientes con CO presentan concentraciones normales de LH, FSH y testosterona, sin embargo, presentan problemas de fertilidad (Joensen y cols., 2008). Esto concuerda con reportes en individuos adultos tratados con Gonadotropina Coriónica Humana (hCG), lo que estimula el aumento de LH; sin embargo al determinar las concentraciones séricas de testosterona e INSL3, únicamente se observó un aumento en la producción de testosterona y no de secreción de INSL3, mostrando insensibilidad a los efectos esteroideogénicos producidos por la LH. Por lo que INSL3 parece ser un marcador más sensible del estado funcional de las células de Leydig (Ferlin y cols., 2006).

En adición, INSL3 es importante en el mantenimiento de la sobrevivencia de las células germinales, generando un efecto protector de sufrir apoptosis e inclusive los estudios moleculares realizados hasta la fecha han demostrado que las alteraciones en la secuencia de su gen promotor (*INSL3*) pueden tener un papel importante no solo en el desarrollo de CO si no en el desarrollo de tumores en ciertos tipos de cánceres como sucede en el caso de seminoma y carcinoma (Bay y cols., 2011).

Así, la CO es una enfermedad compleja, donde los factores genéticos componen solo una pequeña parte de los factores que intervienen con el desarrollo de esta patología, aunado a esto, *INSL3* solo es uno de los muchos genes que participan en el desarrollo de la CO. Por lo que se hace necesario el estudio no solo de otros genes, si no de cada factor que interviene con el desarrollo del criptorquidismo en la población mexicana; y de esta manera contribuir al conocimiento que se tiene de esta enfermedad en nuestra población.



---

## CONCLUSIONES.

1. La correlación genotipo-fenotipo nos refleja una clara asociación de las alteraciones detectadas y el fenotipo grave de nuestros pacientes con CO idiopática.
2. En este trabajo se detectaron cinco alteraciones o variantes alélicas diferentes que representan el 5.88% de los alelos afectados. De las cuales, dos se reportan por primera vez en la población mexicana.
3. Las alteraciones p.L42L y p.A60T resultaron con una frecuencia alta en los pacientes mexicanos con criptorquidia idiopática.
4. Las alteraciones R102H, p.T86M y p.R105R se detectaron con una frecuencia <1% en nuestra población de pacientes mexicanos con criptorquidia idiopática.
5. Respecto a la variante alélica c.3334T>C se infiere que el genotipo T/C podría estar asociado a la criptorquidia idiopática y el genotipo C/C representar un genotipo de protección a este padecimiento.
6. Los pacientes con CO idiopática presentaron una concentración sérica de *INSL3* baja en relación a los individuos control.



## BIBLIOGRAFÍA.

1. Abney Tom O.; Key B. A. (eds) 1989. The cryptorchid testis. CRC Press; Boca Raton FL pp1-176.
2. Adham I. M.; Burkhardt E.; Benahmed M.; Engel W. 1993. Cloning of a cDNA for a novel insulin-like hormone of the testicular Leydig cells. J. Biol. Chem. 268: 26668-26672.
3. Adham I. M.; Steding G.; Thamm T.; Büllsbach E.E.; Schwabe C.; Paprotta I.; Engel W. 2002. The overexpression of the *Insl3* in female mice causes descent of the ovaries. Mol. Endocrinol. 16:244–252.
4. Alvarenga Ramón H. 2002. Estudios genéticos en el diagnóstico prenatal. Rev. Med. Hond. 70:82-85.
5. Anand-Ivell R.J.; Relan V.; Balvers M.; Coiffec-Dorval I.; Fritsch M.; Bathgate R.A.; Ivell R. 2006. Expression of the insulin-like peptide 3 (*INSL3*) hormonereceptor (*LGR8*) system in the testis. Biol. Reprod. 74:945-954.
6. Anand-Ivell R.; Ivell R.; Driscoll D & Manson J. 2008. Insulin-like factor 3 levels in amniotic fluid of human male fetuses. Hum. Reprod. 23, 1180–1186.
7. Argimon J, Jiménez J. 2006. Métodos de investigación clínica y epidemiológica. 3ra. Ed. Elsevier. España.
8. Arrendo G.; Arreola S.M.A.; Lierse W. 1991. Morphogenesis of the gubernaculum testis in Sprague-Dawley rat. Preliminary Report . Arch. Invest. Med. 22:151-161.
9. Ashley R.; Ashley MD.; Barthold JS.; Thomas F.; Kolon MSD. 2010. Cryptorchidism Pathogenesis, Diagnosis, Treatment and Prognosis. Urol. Clin. N. Am. 37: 183-193.
10. Attah A.A.; Hutson J.M. 1993. The role of intra-abdominal pressure in cryptorchidism. J. Urol. 150:994-996.
11. Backhouse K. M.; Hewer H. R. 1964. Features of reproduction in the grey seal. Med. Biol. Illus. 14:144-150.
12. Bay K.; Virtanen E.H.; HArtung S.; Ivell R.; Main M.K.; Skakkebaek E.N.; Anderson A. 2007. Insuline-like factor 3 levels in cord blood and serum from children: effects of age; postnatal hypothalamic-pituitary-gonadal axis activation and cryptorchidism. J. Clin. Endocrinol. Metab. 92:4020-4027.



13. Bay K. and Andersson A.-M. 2010. Human testicular insulin-like factor 3: in relation to development, reproductive hormones and andrological disorders. *International Journal of Andrology* 34, 97-109.
14. Bay Katrine, Main KM.; Toppari and Skakkebaek. 2011. Testicular descent: *INSL3*, testosterone, genes and the intrauterine milieu. *NATURE REVIEWS/UROLOGY* Volume 8:187-196.
15. Bertini V.; Bertelloni S.; Valetto A.; Lala R.; Foresta C.; Simi P. 2004. Homeobox *HOXA10* gene analysis in cryptorchidism. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 17:41–45.
16. Bogatcheva N.V.; Troung A.; Feng S.; Engel W.; Aham I.M.; Agoulnik A.I. 2003. *GREAT/LGR8* is the only receptor for insuline-like 3 peptide. *Mol. Endocrinol.* 17:2639-2646.
17. Bogatcheva NV.; Ferlin A.; Feng S.; Truong A.; Giancesello L.; Foresta C. & Agoulnik AI. 2007. T222P mutation of the insulin-like 3 hormone receptor *LGR8* is associated with testicular maldescent and hinders receptor expression on the cell surface membrane. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292, E138–E144.
18. Botas J. 1993. Control of morphogenesis and diferentiation by Hom/*HOX* genes. *Curr. Opin. Cell. Bio.* 5:1015.
19. Bullesbach E.E.; Schwabe C. 2002. The primary structure and the disulfide links of the bovine relaxin-like factor (RLF). *Biochemistry* 41:274.
20. Burkhardt E.; Adham I. M.; Brosig B.; Gastmann A.; Mattei M.G.; Engel W. 1994. Structural organization of the porcine and human genes coding for a Leydig cell-specific insulin-like peptide (*LEY I-L*) and chromosomal localization of the human gene (*INSL3*). *Genomics* 20: 13-19.
21. Cain MP.; Kramer SA.; Tindall DJ.; Husmann DA. 1994a. Epidermal growth factor reverses antiandrogen induced cryptorchidism and epididymal development. *J. Urol.* 152:770-773.
22. Cain MP.; Kramer SA.; Tindall DJ.; Husmann DA. 1994b. Alterations in maternal epidermal growth factor and epididymal development. *Urology* 43:375-378.
23. Campbell H.E. 1959. The incidence of malignant growth of the undescended testicle: a reply and reevaluation. *J. Urol.* 81:664.



24. Canto P.; Escudero I.; Soderlund D.; Nishimura E.; Carranza-Lira S.; Gutierrez J.; Nava A.; Mendez J. P. 2003. A novel mutation of the insulin-like 3 gene in patients with cryptorchidism. *J. Hum. Genet.* 48: 86-90.
25. Cortes D.; Thorup J.M.; Visfeldt J. 2001. Cryptorchidism: aspects of fertility and neoplasms. A study including data of 1;335 consecutive boys who underwent testicular biopsy simultaneously with surgery for cryptorchidism. *Horm. Res.* 55:21-27.
26. Cortes D., Thorup J., Lindenberg S., Visfeldt J. 2003. Infertility despite surgery for cryptorchidism in childhood can be classified by patients with normal or elevated follicle-stimulating hormone and identified at orchidopexy. *BJU. Int.* 91:670–674.
27. Czeizel;A.; Eredi E.; Toth J. 1981. Genetics of undescended testis. *J. Urol.* 126: 528-529.
28. Damgaard Ida N.; Jensen TK.; The Nordic Cryptorchidism Study Group; Petersen J; Skakkebaek N; Toppari; Main. 2008. Risk Factors for Congenital Cryptorchidism in a Prospective Birth Cohort Study. *PLoS ONE.* Issue 8, Volume 3.
29. Depue R.H.; Pike M.C.; Henderson B.E. 1983. Estrogen exposure during gestation and risk of testicular cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 71:1151.
30. Elert A., Jahn K., Heidenreich A., Hofmann R. 2003. The familial undescended testis. *Klin. PEDIATR.* 215:40-45.
31. El Houate B.E.; Rouba H.; Sibai H.; Barakat A.; Chafik A.; Chadli E.; Imken L.; Bogatcheva V.N.; Feng S.; AgoulNIK IA. 2007. Novel mutations involving the *INSL3* gene associated with cryptorchidism. *J. Urol.* 177:1947-1951.
32. Farrer J.H.; Walker A.H.; Rajfer J. 1985. Management of the post pubertal cryptorchid testis: A statistical review. *J. Urol.* 134:1071.
33. Feng S.; Cortessis VK.; Hwang A.; Hardy B.; Koh CJ.; Bogatcheva NV.; AgoulNIK AI. 2004. Mutation analysis of *INSL3* and *GREAT/LGR8* genes in familial cryptorchidism. *Urology* 64: 1032–1036.
34. Ferlin A.; Simonato M.; Bartoloni L.; Rizzo G.; Bettella A.; Dottorini T.; Dallapiccola B.; Foresta C. 2003. The *INSL3-LGR8/GREAT* ligand-receptor pair in human cryptorchidism. *J. Clin. Endocr. Metab.* 88: 4273-4279.



35. Ferlin A.; Bogatcheva N.V.; Gianesello L.; Pepe A.; Vinanzi C.; AgoulNIK A.I.; Foresta C. 2006. Insuline-like factor 3 gene mutations in testicular dysgenesis syndrome: clinical and functional characterization. *Mol. Hum. Reprod.* 12:401-406.
36. Ferlin A.; Zucarello D.; Zucarello B.; Chirico MR.; Foresta C. 2008. Genetic Alterations Associated With Cryptorchidism. *JAMA* 300(19):2271-2276.
37. Foresta C.; Ferlin A.; Garolla A.; Milani C.; Oliva G.; Rossato M. 1996. Functional and cytologic features of the contralateral testis in cryptorchidism. *Fertil Steril* 66: 624–629.
38. Foresta C.; Bettella A.; Vinanzi C.; Dabrilli P.; Meriggiola M.C.; Garolla A.; Ferlin A. 2004. Insulin-Like Factor 3: A Novel Circulating Hormone of Testis Origin in Humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89:5952-58.
39. Foresta C., Zucarello D., Garolla A., Ferlin A. 2008. Role of Hormones, Genes, and Environment in Human. *Endocrine Reviews* 29(5):560–580.
40. Gorlov; I. P. P.; Kamat; A.; Bogatcheva; Jones; E.; Lamb; D. J. 2002. Mutations of the LGR8/GREAT gene cause cryptorchidism. *Hum. Molec. Genet.* 11: 2309-2318.
41. Hadziselimovic F. 1983. Embryology of testicular descent and mal-descent. In: Hadziselimovic F (ed) *Cryptorchidism: Management and Implications*. Springer-Verlag; Berlin; PP 11-34.
42. Hadziselimovic F.; Duckett JW; Snyder HM; Schnauffer L; Huff D. 1987. Omphalocele; cryptorchidism; and brain malformations. *J. Pediatr. Surg.* 22(9):854-6.
43. Hadziselimovic F.; Geneto R.; Emmons L.R. 2000. Elevated placental estradiol: a possible etiological factor of human cryptorchidism. *J. Urol.* 164:1694-1695.
44. Hadziselimovic F. 2006. Early successful orchidopexy does not prevent from developing azoospermia. *Int. Braz. J. Urol.* 32:570–573
45. Heyns C.F.; Human H.J.; Werely C.J.; Deklerk D.P. 1990. The glycosaminoglycans of the gubernaculum during testicular descent in the fetus. *J. Urol.* 143: 612-617.
46. Heyns CF.; Hutson JM. 1995. Historical review of theories in testicular descent. *J. Urol.* 153:754-767.



47. Hinman F.; Jr. 1993. Opening remarks: Cryptorchidism. Eur. J. Pediatr. 152 (Suppl 2): 53-55.
48. Hsu; S. Y.; Nakabayashi; K.; Nishi; S.; Kumagai; J.; Kudo; M.; Sherwood; O. D.; Hsueh; A. J. W. 2002. Activation of orphan receptors by the hormone relaxin. Science 295: 671-674.
49. Hughes IA.; Acerini CL. 2008. Factors controlling testis descent. Manuscript EJE-08-0458.
50. Husmann DA.; Levy JB. 1995. Current concepts in the pathophysiology of testicular undescend. Urology 46:267-276.
51. Hutson J.M.; Donahoe P.K. 1986. The hormonal control of testicular descent. Endocr. Rev. 7:270-283.
52. Hutson J.M.; Beasley S.W.; Bryan A.D. 1988. Cryptorchidism in spina bifida and spinal cord transaction: a clue to the mechanism of transinguinal descent of the testis. J. Pediatr. Surg. 23:275-277.
53. Hutson J.M. y Clarke M.C.C. 2007. Current management of the undescended testicle. Seminars in Pediatric Surgery. 16, 64-70.
54. Hutson J.M.; Balic A.; Nation T. and Southwell B. 2010. Cryptorchidism. Seminars in Pediatric Surgery 19,215-224.
55. Ivell R.; Hartung S. 2003. The molecular basis of cryptorchidism. Mol. Hum. Reprod. 9(4):175-81.
56. Ivell R. and Anand-Ivell R. 2009. Biology of insulin-like factor 3 in human reproduction. Vol. 15. No. 4 pp463-476.
57. Joensen Ulla Nordström; Jorgensen N. Rajpert-De Meyts E. and Skakkebaek E. 2008. Testicular Dysgenesis Syndrome and Leydig Cell Function. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. 102, 155-161.
58. Jones Kenneth Lyons. 2006. Smith's Recognizable Patterns of Human Malformation. Sixth Edition. Elsevier Saunders. United States of America.
59. Kaplan LM.; Koyle MA.; Kaplan GW.; Farrer JH.; Rajfer J. 1986. Association between abdominal wall defects and cryptorchidism. J. Urol. 136: 645-647.
60. Kawamura K.; Kumagai J.; Sudo S.; Chun S.Y.; Pisarska M.; Morita H.; Toppari J.; Fu P.; Wade J.D.; Bathgate R.A.; Hsueh AJ. 2004. Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cells survival. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:7323.7328.



61. Kmita M.; Tarchini B.; Zakany J.; Logan M.; Tabin C. J.; Duboule D. 2005. Early developmental arrest of mammalian limbs lacking HoxA/HoxD gene function. *Nature* 435: 1113-1116.
62. Kojima Y.; Mizuno K.; Kohri K. and Hayashi Y. 2009. Advances in Molecular Genetics of Cryptorchidism. *Pediatric Urology* 04:037.
63. Kolon F.T.; Wiener S.J.; Lewitton M.; Roth R.D.; Gonzalez E.T.; Lamb J.D. 1999. Analysis of homeobox gene Hoxa 10 mutations in cryptorchidism. *J. Urol.* 161:275-280.
64. Koivusalo A.; Taskinen S.; Rintala R.J. 1998. Cryptorchidism in boys with congenital abdominal wall defects. *J. Urol.* 13: 143-145.
65. Koskimies P.; Levallet J.; Sipilä P.; Huhtaniemi I.; Poutanen M. 2002. Murine relaxin-like factor promoter: functional characterization and regulation by transcription factors steroidogenic factor 1 and DAX-1. *Endocrinology* 143: 909–919.
66. Krausz C, Quintana-Murci L, Fellous M, Siffroi JP, McElreavey K. 2000. Absence of mutations involving the *INSL3* gene in human idiopathic cryptorchidism. *Mol. Hum. Reprod.* 6:298–302.
67. Kropp K.A.; Voeller K.K.A. 1981. Cryptorchidism in meningomyelocele. *J. Pediatr.* 99:110-113.
68. Krumlauf, R., 1994. Hox genes in vertebrate development. *Cell* 78,191–201.
69. Kurpisz M.; Havryluk A.; Nakonechnyj A.; Chopyak V.; Kamieniczna M. 2010. Cryptorchidism and long-term consequences. *J. Urol.* 11:17:45.
70. Lehninger AL., David L. N., Michael M. C. 2006. *Principios de Bioquímica* 4ª Edición. Ediciones Omega, S. A. Barcelona, España.
71. Lim HN.; Raipert-de Meyts E.; Skakkebaek NE.; Hawkins JR.; Hughes IA. 2001. Genetic analysis of the *INSL3* gene in patients with maldescent of the testis. *Eur. J. Endocrinol.* 144: 129–137.
72. Lisker R, Ramírez E, Pérez-Briceño R, Granados J, Babinsky V. Gene frequencies and admixture estimates in four Mexican urban centers. *Hum. Biol.* 1990; 62: 791-801.
73. Massart F.; Saggese G. 2010. Morphogenetic Targets and Genetics of Undescended Testis. *Sexual Development* 4:326-335.



74. Mc Mahon DR.; Kramer SA.; Husmann DA. 1995. Anti-Androgen induced cryptorchidism in the pig is associated with failed gubernacular regression and epididymal malformations. *J. Urol.* 154: 825-829.
75. Murphy F, Paran TS, Puri P. 2007. Orchidopexy and its impact on fertility. *Pediatric Surgery International* 23 625-632.
76. Nef S.; Parada L.F. 1999. Cryptorchidism in mice mutant for *Insl3*. *Nat Genet* 22:295-299.
77. Overbeek P. A.; Gorlov I. P.; Sutherland R. W.; Houston J. B.; Harrison W. R. Boettger-Tong H. L.; Bishop C. E., Agoulnik A. I. 2001. A transgenic insertion causing cryptorchidism in mice. *Genesis* 30: 26-35.
78. Pardo-Mindan F. J.; Vargas Torcal F.; Garcia Julian F.; Virto Ruiz M. T. 1975. Familial cryptorchidism. (Letter) *Pediatrics* 56: 616.
79. Park K. y Choi Hwang. 2010. An Evolution of Orchiopexy: Historical Aspect. *Korean Journal Urology.* 51.3.155.
80. Park-II Jae; Semyonov J.; Chang C.L.; et al. 2008. Origin of *INSL3*-mediated testicular descent in therian mammals. *Genome Res.* 18:974-85.
81. Rijli F.M.; Matyas R.; Pellegrini M.; Dierich A.; Gross P.; Dolle P.; Chambon P. 1995. Cryptorchidism and homeotic transformations of spinal nerves and vertebrae in *Hoxa 10* mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:8185-8189.
82. Sadeghian H.; Anand-Ivell R.; Balvers M.; Relan V.; Ivell R.; 2005 Constitutive regulation of the *Insl3* gene in rat Leydig cells. *Mol. Cell Endocrinol.* 241(1-2):10-20.
83. Sanger F.R.; Nicken S.; Coulson A. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74:5463-5467.
84. Satokata I.; Benson G.; Maas R. 1995. Sexually dimorphic sterility phenotypes in *Hoxa 10* deficient mice. *Nature.* 374:460-463.
85. Shono T.; Ramm- Anderson S.; Hutson J.M. 1994. Transabdominal testicular descent. *Science*; 211.1278.
86. Skinner MK.; Anway MD. 2005. Seminiferous cord formation and germ-cell programming: epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1061:18–32.



87. Tomboc M.; Lee P. E.; Mitwally M. F.; Schneck F. X.; Bellinger M.; Witchel S. F. 2000. Insulin-like 3/relaxin-like factor gene mutations are associated with cryptorchidism. *J. Clin. Endocr. Metab.* 85: 4013-4018.
88. Vigueras V.R.M.; Moreno M.N.; Reyes T.G.; Merchant L.H. 2003. Androgen receptor and calcitonin gene related peptide in neurons of the genitofemoral nerve during testicular descent induced with hCG. *Archives of the Medical Research* 34:166-170.
89. Vigueras V.R.M.; Moreno M.N.A.; Reyes T.G.; Merchant L.H. 2004. Gubernacular fibroblasts express the androgen receptor during testis descent in cryptorchid rats treated with hCG. *Urological Research* 32:386-390.
90. Vigueras V.R.M.; Molina O.D.; Reyes T.G.; Santamaría del Angel D.; Moreno M.N.A.; García C.M.E; Cuevas A.O.; Rojas C.J.C. 2008. Effect of allopurinol on damage caused by free radicals to cryptorchid testes. *Acta histochemica* 111 127-137.
91. Vigueras V.R.M.; Ojeda I.; Gutiérrez P.O.; Chávez S.A.; Cuevas O.; Santamaría D.; Rojas C.J.C. 2010. Protective effect of  $\alpha$ -tocopherol on damage to rat testes by experimental cryptorchidism. *International Journal of Experimental Pathology.* 1365-2613.
92. Virtanen H.E. and Toppari J. 2008. Epidemiology and pathogenesis of cryptorchidism. *Human Reproduction* Vol. 14, No.1 pp49-58.
93. Wang Y.; Barthold J.; Figueroa E.; et al. 2008. Analysis of five single nucleotide polymorphisms in the ESR1 gene in cryptorchidism. *Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol.* 82:482-485.
94. Weil C.; Ueber den. 1885. Descensus testicularum; nebst Bemerkungen ueber die Entwicklung der Scheidenhaupte and des akrotums. *Z. Heilk* 5:225.
95. Wensing C.J.G. 1973. Testicular descent in some domestic mammals. II The nature of the gubernacular change during the process of testicular descent in the pig. *Proc. K. Ned. Akad. Wet. Ser. C. Biol. Med. Sci.* 76:190-195.
96. Wensing C.J.G. 1986. Testicular descents in the rat and a comparison of this process in the rat with that in the pig. *Anat. Rec.* 214:154-160.
97. Whitaker R.H. 1988. Neoplasia in cryptorchid men. *Sem. Urol.* 6:107.



98. Wikstrom A.M; Bay K.; Hero M.; Andersson A.M.; Dunkel L. 2006. Serum insuline-like factors 3 levels during puberty in healthy boys and boys with klinefelter syndrome J. Clin. Endocrinol. Metab. 91:4705-4705.
99. Yamazawa K., Wada Y., Sasagawa I., Aoki K., Ueoka K., Ogata T. 2006. Mutation and polymorphism analyses of *INSL3* and *LGR8/GREAT* in 62 japanese patients with cryptorchidism. Horm. Res. 67:73-76.
100. Yoshida R.; Fukami M.; Sasagawa I.; et al. 2005. Association of cryptorchidism with a specific haplotype of the estrogen receptor alpha gene: implication for the susceptibility to estrogenic environmental endocrine disruptors. J. Clin. Endocrinol. Metab. 90:4716-4721.
101. Zimmermann S.; Steding G.; Emmen J.M.N.; Brinkmann A.O.; Nayernia K.; Holstein A.F. 1999. Targeted disruption of the *Insl3* gene causes bilateral cryptorchidism. Mol. Endocrinol. 13; 681.



**ANEXO.**

**TABLAS DE SÍNDROMES EN LOS QUE SE PRESENTA LA CRIPTORQUIDIA.**

**Síndromes en los que frecuentemente se presenta la CO.**

S. Aarskog	S. Fraser	Focomelia Roberts-SC
Acrodisostosis	S. Freeman-Sheldon	S. Robinow
S. Börjeson-Förssman-Lehmann	S. Displasia Frontometafisial	S. Rubinstein-Taybi
S. Carpenter	S. Fryns	S. Seckel
Microgastria Congénita-reducción de las extremidades	S. Johanson-Blizzard	S. Senter-KID
S. Delección 4p	S. Hiperostosis Lenz-Majewski	S. Shprintzen-Goldberg
S. Delección 5p	S. Pterygium letal múltiple	S. Simpson-Golabi-Behmel
S. Delección 9p	S. Meckel-Gruber	S. Smith-Lemli-Opitz
S. Delección 11q	S. Meier-Gorlin	S. Toriello-Carey
S. Delección 13q	S. Miller-Diker	S. Triploidia
S. Delección 18q	S. Mowat-Wilson	S. Mosaico Trisomía 9
Artrogriposis distal	S. Lentigos múltiples	S. Trisomía 13
S. Duplicación 3q	S. Noonan	S. Trisomía 18
S. Duplicación 10q	S. Opitz G/BBB	S. Ulnar-Mammary
S. Duplicación 15q	S. Oto-Palato-Digital, Tipo II	S. Weaver
Obstrucción Uretral temprana	Fenotipo Pena-Shokeir	S. $\alpha$ -Thalasemia/Retraso mental ligado al cromosoma X
S. Escobar	S. de Peters'-Plus	S. XXXXY
Extrofia de la cloaca	S. Pfeiffer	S. Pterygium Popliteal

**Síndromes en los que ocasionalmente se presenta la CO.**

S. Acrocallosal	S. Gorlin
S. Adams-Oliver	S. Cefalopolisindactilia Greig
Secuencia Disruptiva de la Amioplasi Congénita	S. Hallermann-Streiff
Asociación al tumor Aniridia-Wilms	S. Jarcho-Levin
S. Apert	S. Langer-Giedion
Condrodisplasia Punctata Autosómica Recesiva	S. Larsen



Estudio Molecular del gen *INSL3* en  
Pacientes Mexicanos con Criptorquidia Idiopática.



S. Beckwith-Wiedemann	S. Marden-Walker
S. Cardio-Facio-Cutáneo (CFC)	S. Marshall
S. Catel-Manzke	S. MacKusick-Kaufman
Displasia Condroectodermal	S. Miller
S. Cockayne	S. Distrofia Miotónica
S. Coffin-Siris	S. Neu-Laxova
S. de Lange	S. Delección 1p36
S. Delección 3p	Espectro de Hipogenesia de Extremidades Oromandibulares
S. Delección 22q11.2	S. Pfeiffer
Displasia Diastrófica	S. Pterygium Popliteal
S. Artrogriposis distal	S. Prader-Willi
S. Distichiasis-Lymphedema	S. Rothmund-Thomson
S. Down	S. Saethre-Chotzen
S. Dubowitz	S. Smith-Magenis
S. Duplicación 9p	S. Treacher Collins
S. Ectrodactilia-Displasia Ectodermal-Clefting	S. Trisomia 8
S. Pancitopenia Fanconi	S. XXY
S. Hipoplasia Femoral-Facias inusuales	S. XYY
S. Hidantoína Fetal	S. Zellweger

Tablas realizadas en base a Jones, 2006.