



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
INSITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA**

**ESTUDIO MOLECULAR DE LA CRIPTORQUIDIA
IDIOPATICA EN PACIENTES MEXICANOS**

T E S I S

**PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
ESPECIALIDAD EN:**

CIRUGIA PEDIATRICA

P R E S E N T A:

DRA. KARLA ALEJANDRA SANTOS JASSO

TUTORA:

**M. EN C. MARGARITA D. CHAVEZ
SALDAÑA**



MEXICO, D.F. 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**ESTUDIO MOLECULAR DE LA CRIPTORQUIDIA IDIOPATICA
EN PACIENTES MEXICANOS**

DR. JOSÉ N. REYNES MANZUR
DIRECTOR DE ENSEÑANZA

DRA MIRELLA VAZQUEZ RIVERA
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PRE Y POSGRADO

DR. JOSE FRANCISCO GONZALEZ ZAMORA
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE CIRUGIA GENERAL.
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE CIRUGIA PEDIATRICA

TUTOR DE TESIS
M. EN C. MARGARITA D. CHAVEZ SALDAÑA
LABORATORIO DE BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION.

CO-TUTOR.
DR. JUAN O. CUEVAS ALPUCHE.
JEFE DEL SERVICIO DE UROLOGIA.
DRA ROSA M. VIGUERAS VILLASEÑOR
LABORATORIO DE BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION.

ASESOR METODOLOGICO.
DR. IGNACIO DE LA MORA MAGAÑA
DEPARTAMENTO DE METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION.

ÍNDICE

	Página
1. Resumen.....	3
2. Marco teórico.....	5
3. Pregunta de Investigación.....	16
4. Planteamiento del Problema.....	17
5. Justificación.....	17
6. Objetivos.....	18
7. Hipótesis.....	18
8. Tipo de Diseño de la investigación..	18
9. Material y Métodos.....	19
10. Definiciones.....	23
11. Instrumento de recolección de datos.....	24
12. Consideraciones éticas.....	25
13. Resultados.....	27
14. Discusión.....	29
15. Bibliografía.....	32
Anexos.	

1. RESUMEN.

INTRODUCCIÓN. El descenso testicular es un proceso embrionario complejo, que involucra la interacción de factores genéticos, neurológicos, hormonales y anatómicos. Una falla en cualquiera de estos procesos tiene como resultado la falta de descenso testicular o criptorquidia. Los testículos criptorquídicos tienen mayor riesgo de infertilidad y malignidad que los normales. Se ha identificado la presencia de genes que influyen en los mecanismos del descenso y en el mantenimiento de una adecuada espermatogénesis; específicamente, los genes *INSL3*, *LGR8/GREAT* y *HOXA10*. El *INSL3* es una hormona con gran importancia para la supervivencia de las células germinales. En pacientes con criptorquidia, se ha demostrado bajos niveles de *INSL3* en comparación con pacientes sanos, observando una relación entre esta enfermedad y variantes alélicas de éste gen. Hasta la fecha, éste gen no han sido ampliamente investigados en poblaciones latinas, incluyendo la mexicana. Pretendemos determinar la presencia de variantes alélicas: R102C, R105H, R102H del gen *INSL3* en niños mexicanos con criptorquidia idiopática, para así conocer la fisiopatología, y planear proyectos futuros con objetivos en nuevas estrategias de tratamiento individualizado (en relación a la infertilidad y el cáncer testicular). **OBJETIVO GENERAL:** Identificar tres variantes alélicas: R102C, R105H, R102H del gen *INSL3*, que se asocian con la criptorquidia idiopática en una muestra de pacientes mexicanos, atendidos en el Instituto Nacional de Pediatría del periodo noviembre del 2008 a junio del 2010. **MATERIAL Y MÉTODOS.** Se incluyeron un total de 162 individuos; 75 niños criptorquídicos idiopáticos y 87 niños sanos control (no criptorquídicos). Los pacientes con criptorquidia idiopática abdominal o inguinal (alta), unilateral o bilateral, referidos de los Servicios de Urología y Cirugía General del Instituto Nacional de Pediatría, en un periodo de 19 meses (noviembre 2008 a Junio del 2010). El estudio molecular se realizó a partir de la obtención de DNA de linfocitos de sangre periférica y el análisis correspondiente de cada una de las variantes alélicas antes citadas, mediante el método fluorescente de 5' exonucleasa (TaqMan) de discriminación alélica. La determinación sérica de *INSL3* se llevó a cabo mediante RIA. **RESULTADOS.** Todos resultaron homocigotos para el alelo normal o ancestral, ningún paciente presentó el alelo alterado en ninguna de las variantes alélicas analizadas del gen *INSL3*. Los resultados fueron analizados con t-student. La comparación de medias, de la cuantificación sérica de *INSL3* en los pacientes criptorquídicos vs no criptorquídicos, se realizó en 47 pacientes (41 pacientes mayores de 8 años, y 6 pacientes menores de 8 años); y mostraron significancia estadística en pacientes mayores de 8 años ($p=0.044$). **CONCLUSIONES.** El análisis de las variantes alélicas mostró que en nuestra población de pacientes con criptorquidia idiopática, no se presentó el alelo alterado o de riesgo; estos hallazgos se consideran todavía preliminares, dado el tamaño de muestra, y además considerando a la población mexicana que presenta una alta heterogeneidad genética, debemos hacer una búsqueda dirigida exhaustiva (incrementando el número de variantes) y considerar otras estrategias metodológicas de búsqueda de mutaciones desconocidas o poco frecuentes, pues quizá existan alteraciones endémicas de nuestra población que permitan establecer asociaciones etio-patogénicas. Por otro lado la cuantificación sérica de *INSL3* en pacientes criptorquídicos puede ser determinada como parte de su abordaje clínico y con ello evaluar el funcionamiento de las células de Leydig y por tanto el pronóstico en función de fertilidad.

2. MARCO TEÓRICO.

La criptorquidia, o testículo no descendido, es una patología que consiste en la falla del testículo para descender hacia el escroto. Es una anomalía común del tracto genital masculino que afecta del 2-4% del total de varones recién nacidos a término (1). Dicha patología es de gran trascendencia en la edad pediátrica, debido a su frecuencia y su asociación con cáncer testicular y fertilidad en estado adulto. Su incidencia a nivel mundial es del 2.6% al nacimiento. En niños prematuros se incrementa hasta el 30%. Estas cifras disminuyen a causa del descenso espontáneo, alrededor del 1% al año de edad (2).

El escroto proporciona un ambiente que es 4°C menos que la temperatura corporal, una falla en la localización testicular en el escroto después del nacimiento conlleva a anomalías progresivas bioquímicas y fisiológicas.

Durante el primer año de vida en el humano, es un periodo en el cual antes se pensaba que correspondía a un periodo inactivo, es actualmente considerado un periodo crucial en el que se experimenta importante desarrollo en las células gonadales. Después de los tres meses post-natales los gonocitos, que son células que originalmente fueron formadas por la diferenciación de las células germinales primordiales in útero, experimentan diferenciación y son convertidas a espermatogonias tipo A. Ésta transformación se acompaña por el incremento en la producción de hormona luteinizante (LH), testosterona y sustancia inhibidora de Müller; y se completa hasta la edad de 12 meses. Las espermatogonias tipo A son convertidas lentamente en espermatogonias tipo B (de los 3-4 años), antes de la diferenciación final a espermatocitos primarios, permaneciendo en esta forma dentro de los túbulos espermáticos hasta que se inicia la pubertad, periodo en el cual aparece el proceso de espermatogénesis.

Se piensa que la falla del descenso testicular interfiere con el proceso inicial de transformación de los gonocitos en espermatogonias tipo A. Esta falla en la diferenciación ha sido considerada la causa del incremento de la incidencia de infertilidad y malignidad vista en los pacientes con testículos no descendidos (sobrevida anormal de los gonocitos, convirtiéndose en carcinoma in situ). (3, 4)

Estudios previos han mostrado que la orquidopexia (tratamiento quirúrgico de la criptorquidia) realizada antes de los 2 años, puede predecir fertilidad en cifras cercanas a 87.5%, sin embargo si la intervención es realizada después de la pubertad cae dramáticamente a 14%. Actualmente es aconsejado que la intervención quirúrgica deba ser realizada en cualquier tiempo después de los 3 a 6 meses si los testículos permanecen no descendidos. Esta recomendación se basa en que las anomalías de las células germinales son potencialmente prevenibles y reversibles si hay recolocación del testículo en un ambiente correcto (escrotal). Así también el riesgo subsecuente de infertilidad se asocia en el tipo de criptorquidia (uni o bilateral) (3).

Los testículos criptorquídicos tienen mucho mayor riesgo de malignidad que los normalmente descendidos con una probabilidad de desarrollar un tumor testicular de 7.3 a 9.7 veces mayor que la población masculina general (5)

La ausencia de los testículos dentro del escroto también predispone a otros problemas. Es generalmente aceptado que los testículos criptorquídicos tienen mayor riesgo de experimentar torsión testicular, esto puede ser debido a una pobre aposición del epidídimo en relación al testículo, creando una configuración anatómica que predispone a la torsión. Así también los beneficios psicológicos de tener la apariencia de los dos testículos intra-escrotales no deberían de ser subestimados. (3)

El diagnóstico de criptorquidia se hace mediante la exploración física y con base a la localización del testículo, la criptorquidia se clasifica en: 1) abdominal (por arriba del canal inguinal); 2) canalicular, (en el canal inguinal) y 3) ectópico, (fuera de la vía normal del descenso)(6). Sin embargo se estima que aproximadamente 20% de los testículos criptorquídicos son no palpables. Por tanto, el beneficio de los estudios de imagen en este grupo de pacientes es necesario. Las opciones de imagen incluyen ultrasonido, resonancia magnética, y tomografía computada (la cual es raramente utilizada debido a la modalidad de estudios de imagen libres de radiación que ahora son disponibles)(3).

Descenso testicular. El testículo está ubicado en etapas embrionarias en el abdomen y posteriormente se desplaza hacia el escroto. En posición abdominal está suspendido por dos ligamentos: uno que une el riñón a la gónada, llamado ligamento suspensor craneal (LSC) en humanos y el otro que conecta el testículo y el epidídimo al piso del escroto denominado gubernáculo.

El descenso de los testículos es un evento complejo, mediado por factores tanto anatómicos, genéticos, endocrinos, que se relacionan con el desarrollo del gubernáculo, el proceso vaginal, el canal inguinal, los vasos espermáticos y el escroto (7).

Hutson y Donahoe (1986) propusieron que el descenso testicular se presenta en dos fases denominadas trans-abdominal e inguino-escrotal. (8) Durante la primera, el testículo se desplaza hacia la zona inguinal y en la segunda fase hacia el escroto. La primera fase del descenso testicular se presenta en el ser humano entre la semana 8 a la 15 de la gestación. La segunda fase entre la semana 25 a la 35 de gestación (3, 8).

Se ha propuesto que una de las estructuras con mayor participación en el descenso de los testículos es el gubernáculo. (Fig. 1) Este fue descrito por primera vez por John Hunter (1786) como una estructura fibrosa que une el testículo al escroto. (9) La formación y diferenciación de esta estructura es crucial para el descenso exitoso del testículo.

Para que el descenso testicular se lleve a cabo es necesario que el gubernáculo presente cambios morfológicos de crecimiento (fase trans-abdominal) y de regresión (fase inguino-escrotal). Ambos procesos parecen estar bajo diferentes mecanismos de regulación.

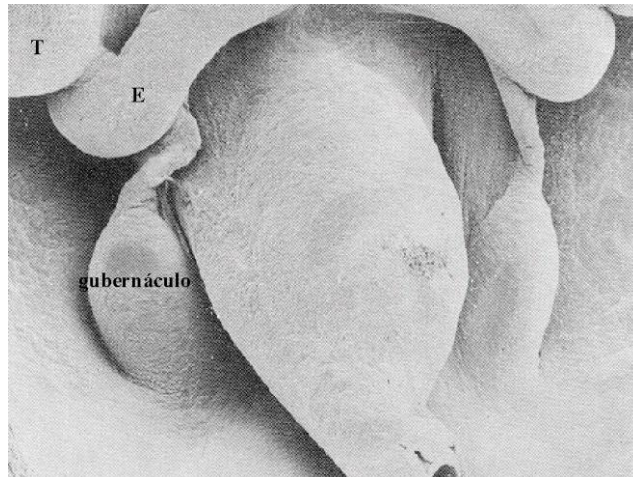


Figura 1. Micrografía en donde se muestra el gubernáculo, estructura que participa en el descenso testicular. Testículo (T), epididimo (E). Tomado de Arredondo y cols., 1991.

El crecimiento gubernacular (ligamento genito-inguinal) se presenta durante la fase trans-abdominal, justo antes del descenso testicular (10,11); con aumento en el tamaño de esta estructura, dado por proliferación celular, síntesis de glicosaminoglicanos y de ácido hialurónico. Este proceso es indispensable ya que produce dilatación del canal inguinal y del escroto, permitiendo el libre paso del testículo a través de ellos.(11). Así también en esta primera fase del descenso existe concomitantemente regresión del ligamento suspensorio craneal.(3)

Se cree que el descenso trans-abdominal se lleva a cabo por la participación de los siguientes factores: 1) factor asociado a la insulina-3 (INSL3) (que estimula al gubernáculo distal para el crecimiento). 2) El receptor de INSL 3 (LGR8) o Great, (receptor que es alterado en las mutaciones en ratas con consecuente criptorquidia); 3) la sustancia inhibidora de Müller estimulando la reacción inflamatoria y crecimiento del gubernáculo (1, 3, 11; 12, 13) y 4) HOXA 10 (14, 15, 16). Los andrógenos no tienen una participación directa, aunque se dice que controlan la regresión del ligamento suspensor craneal (17).

Durante el descenso testicular inguino-escrotal en el gubernáculo se remueve la matriz extracelular y este culmina como un tejido fibroso que mantiene pegado el testículo con el escroto, después del descenso (18,19). El ligamento del gubernáculo tiende a acortarse y se incorpora al bulbo (1). La falla en la regresión gubernacular puede impedir el descenso normal del testículo (18).

El descenso inguino-escrotal está bajo el control de la testosterona en donde también se ha propuesto que participa la presión abdominal (8,21,22) (Fig.2).

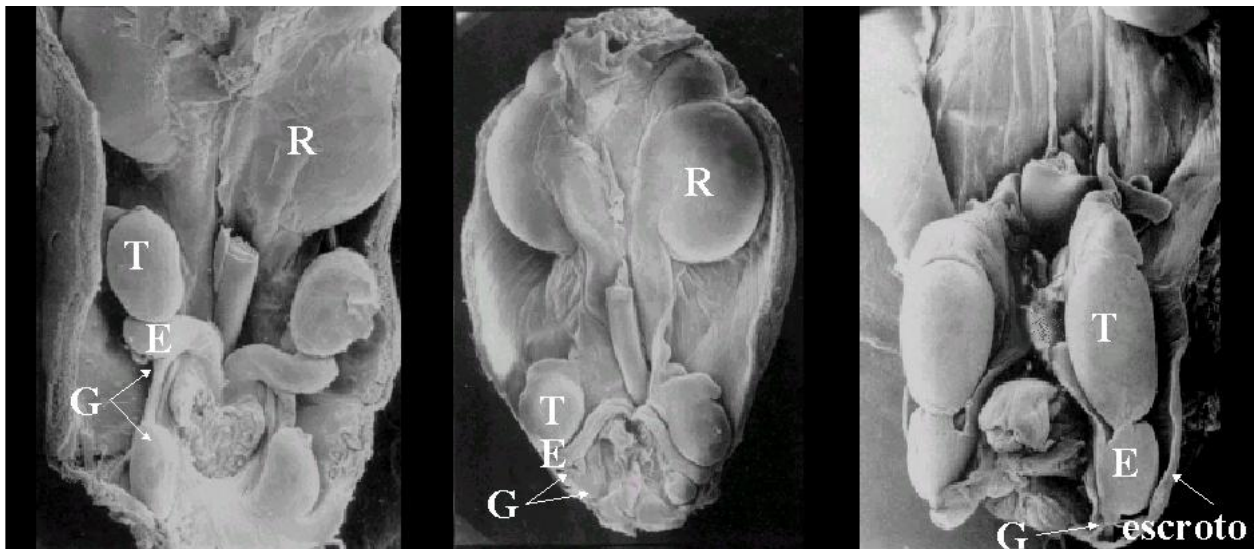
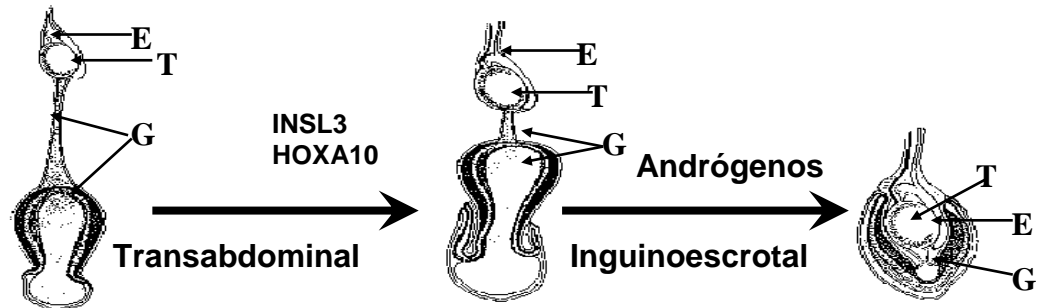


Figura 2. Fases del descenso testicular. En el esquema superior se aprecian las diferentes posiciones del testículo. En la primera columna se observa al testículo en posición abdominal, en la segunda inguinal y en la tercera escrotal. Es clara la participación del gubernáculo para este proceso. Las micrografías inferiores se correlacionan con la posición esquemática de los testículos. Epididimo (E), testículo (T), gubernáculo (G) y riñón (R). Tomado de Shono y cols., 1994.

Durante el descenso testicular inguino-escrotal, el gubernáculo permite el desplazamiento del testículo y eversión del bulbo gubernacular. Se ha aceptado que esta fase depende de los andrógenos (23,24) y no se presenta en animales con deficiencia experimental de esta hormona (25, 26). En seres humanos con completa resistencia a los andrógenos, el gubernáculo permanece alargado y no ocurre este proceso de migración (1,8, 27). También se ha demostrado que la regresión del gubernáculo se bloquea al administrar, en etapas prenatales el

antiandrógeno flutamida (28, 29).

Considerando que el descenso testicular depende de complejas interacciones endocrinas y mecánicas, un defecto o anomalía estructural en el eje hipotálamo-hipófisis-testículo puede inducir criptorquidia (1).

ETIOLOGÍA

Actualmente se conocen parte de los mecanismos que regulan el descenso testicular y demuestran que la etiología de la criptorquidia es multifactorial y se genera por alguna anomalía que interrumpe el descenso normal de los testículos.

Se proponen diferentes orígenes de la criptorquidia:

- 1) Endócrinos
- 2) Factores mecánicos
- 3) Factores genéticos: cromosomopatías y genes asociados

Factores Endocrinos.

Una de las causas más comunes son por defecto en la secreción de andrógenos prenatales secundarios a la deficiencia de la estimulación de gonadotropinas hipofisarias o baja producción de gonadotropinas por la placenta (2, 24, 30). Las pruebas endocrinas de los bebés recién nacidos con testículo no descendido han mostrado, en algunos niños, anomalías (31, 32). Se ha reportado que únicamente durante los primeros meses postnatales se presenta deficiencia en la producción de andrógenos (2 a 4 meses) o en la producción de la sustancia inhibidora de los conductos de Müller (MIS) (4 a 12 meses) (33, 34, 35,36).

Por otro lado, altos niveles de estrógenos maternos durante la gestación están involucrados en la etiología del criptorquidismo en humanos (37, 38, 39). Se ha considerado que este esteroide inhibe la producción de andrógenos por actuar directamente en las células de Leydig (40). También se ha sugerido que la criptorquidia inducida por la administración de estradiol es provocada por un bloqueo de la testosterona vía el eje hipotálamo-hipófisis-testículo (12).

El Dietiltilbestrol (DES), un fuerte estrógeno sintético, se ha asociado al incremento de criptorquidismo, hipoplasia testicular y pobre calidad del semen (41). Se ha demostrado que el DES tiene la habilidad de suprimir la producción de testosterona (42), la expresión de receptores de andrógenos (43) y la expresión de INSL3 (44).

Recientemente se ha reportado un incremento en la incidencia de la criptorquidia y se ha asociado a la exposición de fetos varones a niveles supranormales de estradiol ya que algunos contaminantes medioambientales y productos naturales poseen actividad estrogénica (45).

Factores mecánicos.

Dentro de los factores mecánicos que se sugieren originan la criptorquidia se proponen los siguientes:

Masiva obstrucción del tracto urinario prenatal o defecto mesodérmico.

Alteración en la presión abdominal (46).

Daño traumático al gubernáculo (47, 48).

Alteración en el proceso vaginal, esta estructura es importante ya que protruye a través del anillo interno y transmite la presión intra-abdominal al gubernáculo. El gubernáculo a su vez ejerce tracción en el testículo para iniciar el descenso testicular. El patente proceso vaginal continúa produciendo presión en el testículo durante la migración inguinal a través de la transmisión de la presión intrabdominal producido por el esfuerzo respiratorio (2).

Factores genéticos:

Cromosomopatías: Existe una variedad de síndromes caracterizados por defectos en la producción de gonadotropinas, en la síntesis de andrógenos o en la acción androgénica, en los cuales la criptorquidia es común (Anexo I). Por ejemplo la microcefalia es un factor común el cual se asocia a una mala función hipotalámica o hipofisaria (23).

A pesar de la gran cantidad de padecimientos en donde la criptorquidia se presenta como un síntoma sumado a muchos otros para conformar un síndrome específico, actualmente también se conoce una gran cantidad de casos de

carácter idiopático, es decir que no se sabe con exactitud la causa, aunque se sugiere que existen componentes genéticos, ya que el 6% de los padres de varones con testículos no descendidos también sufrieron el trastorno (49).

Así mismo, los estudios en familias muestran que tanto factores ambientales como genéticos están involucrados en esta entidad. Corbus y O'Conor (1992) describieron varias familias con generaciones afectadas. (50). Además Perrett y O' Rourke (1969) reportaron la presencia de 8 varones con criptorquidia unilateral en 4 generaciones de una familia(51). En tanto que Pardo Mindan y cols., (1975) reportaron 2 familias sugiriendo una herencia autosómica dominante o como una herencia ligada al cromosoma Y (52). Bishop y cols., (1979) precisaron que las anomalías renales tales como agenesia renal están asociadas a menudo a la forma familiar de criptorquidia. El criptorquidismo (más severo) bilateral, fue asociado a un riesgo mayor en la presentación de la enfermedad para los hermanos (53).

GENES ASOCIADOS

La secuencia de DNA de dos individuos no relacionados es aproximadamente 99.9% idéntico. El 0.1% restante contiene variaciones (polimorfismos) que pueden influir en el comportamiento o gravedad de una enfermedad, así como afectar la respuesta a fármacos. El término de polimorfismo se refiere a variantes genéticas comunes en la población general, ocurriendo en más del 1% de la población. En estas se incluyen variantes como deleciones o inserciones multi-base (polimorfismo inserción deleción), variaciones de repetidos (repetidos cortos en tandem) o con el cambio de un solo nucleótido (polimorfismo de un solo nucleótido o SNP), que recientemente han recibido una mayor atención por su alta prevalencia en el genoma y su relación en diversas patologías (54).

La etiopatología de la criptorquidia es aún incierta a pesar de conocer algunos de los mecanismos que regulan del descenso testicular, desde la región abdominal hasta el escroto, durante el desarrollo embrionario. Gracias a un sin número de estudios de casos familiares, y más recientemente modelos animales, se ha sugerido la presencia determinante de factores genéticos, genes candidatos para la criptorquidia, que influyen en las manifestaciones clínicas de esta entidad. En años recientes, se ha dado particular atención a los genes como: el factor

asociado a la insulina 3 (*INSL3*), receptor para *INSL3* (*LGR8/GREAT*) y *HOXA10*; (TABLA 1); los dos primeros son proteínas que actúan como sistema ligando y receptor respectivamente y el tercero con un papel clave en la morfogénesis, estos genes hasta la fecha no han sido estudiados ampliamente en nuestra población e incluso en la población latinoamericana que presentan este padecimiento.

TABLA 1.- GENES INVOLUCRADOS EN LA CRIPTORQUIDIA.

Gen candidato	Efecto en el fenotipo	Referencia
<i>INSL3</i>	En el descenso testicular en la fase transabdominal, actúa induciendo la diferenciación del gubernáculo. Reduce la apoptosis y favorece la proliferación de células germinales. Su mutación se asociado al seminoma.	Nef y Parada, 1999; Zimmermann y cols.,1999 Anad-Ivell y cols., 2006, Kawamura y cols., 2006
<i>LGR8/GREAT</i>	Receptor del <i>INSL3</i> que participa en la diferenciación del gubernáculo durante la fase transabdominal. Contribuye al mantenimiento de la espermatogénesis	Nef y Parada, 1999; Zimmermann y cols.,1999, Overbeek y cols., 2001 y Gorlov y cols., 2002
<i>HOXA10</i>	Papel clave en la morfogénesis gubernacular embrionaria. Necesario para mantener una adecuada espermatogénesis.	Satokata y cols., 1995; Rijli y cols., 1995; Kolon y cols., 1999

FACTOR ASOCIADO A LA INSULINA 3 (*INSL3*)

El gen *INSL3* inicialmente denominado insulina asociada a Leydig (Ley I-L) (55), también conocido como factor asociado a la relaxina, (miembro de la familia hormonal relacionada con la relaxina). El *INSL3* es producido como una pre-prohormona inmadura, compuesta de la cadena A y B conectadas por un

péptido C, un péptido señal que cuando se enciende da lugar a la prohormona. La conexión del péptido C es removida durante el procesamiento de la inactivación hormonal, en tanto que en la activación las dos intercadenas se mantienen unidas por enlaces disulfuro. El gen se localiza en el cromosoma 19 y comprende dos exones y un intrón, se localiza en el último intrón del gen kinasa Janus (JAK3) (56, 57, 58). El papel de este péptido es durante el descenso testicular en la fase transabdominal, induciendo la diferenciación del Gubernáculo (12,13). Aunque también tiene un papel importante en el mantenimiento de una adecuada espermatogénesis (59, 60). Los niveles séricos varían durante el desarrollo, presentando un incremento a partir de la pubertad (61, 62, 63).

Se ha demostrado criptorquidia bilateral en ratones macho con ausencia del *INSL3*, debido a un mal desarrollo del gubernáculo (12, 13). Zimmermann y cols. crearon por recombinación homóloga de células *stem* embrionarias, un ratón *knockout* del *INSL3*, encontrando que las hembras con *INSL3* mutado eran fértiles y producían críos de tamaño normal, sin embargo todos los ratones machos *knockout* presentaban testículos criptorquídicos bilaterales, localizados en el abdomen. Los testículos y el tracto genital podían moverse libremente en la cavidad abdominal, indicando una falta de pegado caudal. Empleando técnicas de microscopía electrónica e histología, encontraron un mal desarrollo del gubernáculo en los embriones de 17 días de gestación. Estos hallazgos claramente demostraron el papel del factor *INSL3* en el proceso del descenso testicular. Esta observación y el hecho de que el este gen no se expresa en el ovario durante los días 8 a 17 de la gestación, apoyan el papel tan importante de este factor en el sobrecrecimiento y diferenciación del primordio gubernacular en ratones macho.

Así considerando que la ausencia del *INSL3* en ratones genera criptorquidia bilateral debido a un mal desarrollo del gubernáculo es lógico pensar que los paciente criptorquídicos podrán presentar ausencia del gen o alteraciones que conllevan a una inhibición parcial o total en la acción de la proteína.

Las mutaciones en el gen *INSL3* han sido reconocidas como causas de criptorquidia en algunos casos. En el análisis de la literatura se sugieren que las mutaciones A24G, V43L y A60T en *INSL3* representan polimorfismos, y

consideran 10 mutaciones para *INSL3* (C-19, V18M, P49S, W69R, R73X, P93L, R102C, R102H, R105H y N110K) que fueron encontradas en niños y adultos con historia de criptorquidia. La parte más variable de *INSL3* es representada por el péptido C, donde 6 de las 10 mutaciones han sido encontradas. (Figura 3) (64).

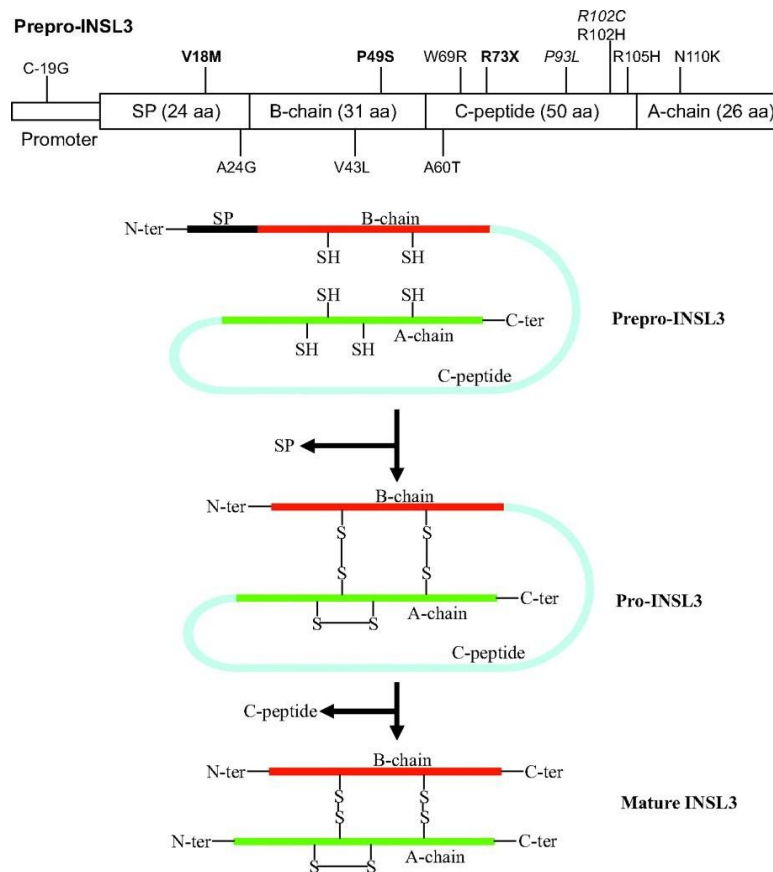


Figura. 3 Foresta y cols. 2008.

Canto y cols., (2003) reporta en un estudio de 150 pacientes con CO idiopática en mestizo-mexicanos, la mutación N86K, del gen *INSL3* que provoca el cambio de una aspargina por una lisina en el codón 86 y fue localizada en el exón 2 de uno de los casos índice y su madre. Esta mutación esta relacionada con un cambio de un aminoácido polar por un aminoácido básico y esta localizada en la cadena A de la proteína *INSL3*. (65)

Tomboc y cols., (2000) utilizando el análisis de SSCP (del inglés *single strand conformation polymorphism*) para tamizar las regiones codificantes del gen *INSL3*, en 145 muestras de DNA genómico de pacientes criptorquídicos y 36

hombres adultos control, identificaron dos mutaciones: la primera mutación R63X (cambio de una arginina por un codón de paro en la posición 63 que fue relacionada de una forma patogénica, pues fue detectada en un niño con criptorquidia unilateral derecha e historia de hernia inguinal) la segunda mutación fue la P93L (cambio de una prolina por una leucina en la posición 93) detectada en un bebe de 8 meses de edad con testículo no palpable, intrabdominal derecho, así como se han detectado mutaciones relacionadas con la criptorquidia también se han identificado polimorfismos (66) (TABLA 2).

Houate y cols., (2007) tienen reportada una frecuencia del 2.72% de variables alélicas para el INSL3 (C-19G, V18M, R105H) y ninguna en pacientes sanos. La mutación V18M en el péptido señal fue detectado en condición herterocigota en un niño con criptorquidia unilateral y su efecto patogénico demostró una reducida habilidad para activar el receptor. La variante alélica R105H la cual se ha localizado en la parte final del péptido C de INSL3 se encontró en un muchacho con criptorquidia bilateral.(67)

Ferlini y cols., en el 2003 identificó 3 polimorfismos comunes tanto en sujetos control como en niños criptorquídicos: L9L (27G-A), en el 3% de los niños criptorquídicos. La A60T (178G-A) en 42.5% de niños con criptorquidia y la L42L (126 G-A) en el 57 % de niños criptorquídicos.(68)

Ferlin y cols., (2006) al estudiar a 540 pacientes Italianos describió en el 1.9% de ellos las mutaciones R4H, W69R y R72K. R4H se encontró en pacientes con severa hipoespermatogénesis por una deleción en la región A^oFc del cromosoma Y; y el procesado de la pre-prohormona puede ser afectada por esta mutación. Posiblemente la mutación W69R se asocia a seminoma y puede afectar el procesado de la hormona y reducir la cantidad de la hormona activa. Basándose en el fenotipo de pacientes con esta mutación un papel de R72K se asocio al seminoma. También describieron las mutaciones P93L, R102C y R102H. De estas parece que únicamente la mutación R102C puede tener un papel patogénico.(61)

Bogatcheva y cols., 2003 describen que las mutaciones P49S severamente reduce la habilidad para activar el LGR8/GREAT. Un residuo de aminoácidos mutado esta localizado en la Terminal C de la cadena B en una región altamente conservada del INSL3. La prolina 49 está en dos residuos del triptofano 51, crítico para la unión al receptor (69, 70).

Cabe mencionar que en estos estudios los pacientes controles no presentaron ninguna de estas mutaciones (61, 66, 69)

TABLA 2. VARIANTES ALÉLICAS ASOCIADAS A LA CRIPTORQUIDIA IDIOPATICA

Gen candidato	Variantes	Efecto de la variante	Referencia
INSL3	P49S P93L R102C N110K R102H C19G V18M W69R R73X R105H L9L (27G-A) L42L (126G-A) A60T R63X	BAJAN LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR Y CAMBIAN LA HABILIDAD DE INSL3 PARA ACTIVAR AL RECEPTOR	Bogatcheva y cols., 2003; Tomboc y cols.,(2000; Houate y cols., 2007; Ferlin y cols., 2006. Canto y cols., 2003

4. PREGUNTA DE INVESTIGACION.

¿Existen variantes alélicas de los genes INSL3, de su receptor Lgr8/GREAT y HOXA 10 que se asocian con la criptorquidia idiopática en niños mexicanos?

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha demostrado que el gen *INSL3*, está involucrado en el desarrollo de los mecanismos de descenso testicular normal. La expresión del gen *INSL3* es una hormona considerada de gran importancia para la supervivencia de las células germinales (59, 60). Los niveles séricos están elevados al nacimiento, en la adolescencia y la etapa adulta (63, 71), considerándose en la actualidad un marcador del estado funcional de las células de Leyding (72). Los niños con criptorquidia muestran niveles persistentemente bajos de *INSL3*, comparados con niños sanos (63).

Existen reportes de variantes alélicas del gen *INSL3*, en pacientes con criptorquidia, sin embargo, la prevalencia de mutaciones ha mostrado gran variabilidad en diferentes poblaciones, probablemente como resultado de diferencias étnicas o criterios de selección de pacientes. Estos genes no han sido estudiados ampliamente en poblaciones latinas, incluyendo la mexicana, por lo que consideramos que analizar y caracterizar las variantes alélicas asociadas a la criptorquidia nos permitiría entender mejor la fisiopatología de la enfermedad, su pronóstico y posiblemente su papel en el desarrollo del cáncer testicular y la infertilidad, así como el diseño de estrategias de asesoría genética poblacional y el desarrollo e investigación de nuevos fármacos para estos padecimientos.

6. JUSTIFICACION

En México no se conoce la incidencia de la criptorquidia, no obstante, por diversos reportes de instituciones nacionales podemos asumir que es similar a otras poblaciones del mundo. El INEGI reporta 2,000,000 de nacimientos al año en nuestro País; considerando una incidencia mundial de 0.8%, es probable que cada año nazcan 16,000 casos nuevos de criptorquidia en la población mexicana, lo que constituye una cifra alarmante de una población en riesgo de desarrollar cáncer testicular e infertilidad, asociada en altos porcentajes a esta enfermedad. En el Instituto Nacional de pediatría se atienden aproximadamente 110 casos por año de niños con criptorquidia, (93 casos de criptorquidia idiopática), lo que nos permite contar con una población considerable para efectuar estudios clínicos como el que aquí se pone a consideración.

7. OBJETIVO GENERAL:

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

OBJETIVOS PARTICULARES:

1.- Identificar las variantes alélicas: R102C, R105H, R102H del gen *INSL3* involucrados con la criptorquidia idiopática.

2.- Determinar la frecuencia de cada una de las variantes del gen *INSL3* asociado a criptorquidia idiopática y en niños sanos.

3.-Determinar la asociación del gen *INSL3*, (variantes alélicas) y el cuadro clínico en los pacientes con criptorquidia idiopática.

4.-Determinar los niveles séricos de *INSL3*, como medición indirecta de la expresión de la proteína.

8 . HIPOTESIS

Hipótesis alterna: Existe una asociación entre variantes alélicas del gen *INSL3* y criptorquidia idiopática.

Hipótesis nula: No hay asociación entre variantes alélicas del gen *INSL3*, con la criptorquidia idiopática.

9. CLASIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.

Diseño del estudio: Transversal.

Clasificación de acuerdo a los ejes de trabajo: Analítica, transversal, observacional, prospectivo.

Factibilidad: El Instituto Nacional de Pediatría cuenta con la infraestructura necesaria para la atención de los pacientes. En esta institución se atienden 110 pacientes con criptorquidia por año en promedio (86 casos de criptorquidia idiopática). El reclutamiento de los pacientes con criptorquidia, la elaboración de la historia clínica, estudios de gabinete programados en el protocolo, la toma de una muestra de sangre periférica de 5-7 ml para la extracción de DNA y los niveles séricos de INSL3 fue efectuados. Se conto con la infraestructura

tecnológica para desarrollar las técnicas de biología molecular. Y para la cuantificación de los niveles séricos de INSL3, nos apoyamos con el Departamento de Reproducción del INNSZ.

10. MATERIAL Y MÉTODOS

Población objetivo. Se estudiaron niños mexicanos con edades entre 0 y 18 años de edad, referidos de la consulta externa de los departamentos de Cirugía general y Urología, del Instituto Nacional de Pediatría, del periodo comprendido entre noviembre 2008, a junio del 2010; los pacientes fueron distribuidos en 2 grupos: El grupo 1, conformado por niños con criptorquidia idiopática uni o bilateral, inguinal (testículo ubicado en el tercio proximal del canal inguinal) o abdominal. El grupo 2, (control) niños mexicanos sanos, sin criptorquidia ni alteración genitourinaria o inguinal.

En todos los casos se efectuó historia clínica completa, edad al momento del diagnóstico, talla, peso, estado nutricional, árbol genealógico de 2 generaciones, estudio molecular del DNA de linfocitos de sangre periférica, determinación de las variantes alélicas del gen INSL3, y determinación sérica del INSL3.

Criterios de Inclusión.

Grupo 1.

1.- Pacientes provenientes de la República Mexicana con ascendencia mexicana mínima de 2 generaciones.

2.- Con criptorquidia idiopática diagnosticada clínicamente por 2 médicos Urólogos, tomando como base la ubicación testículos: abdominal o en el tercio proximal del canal inguinal, mediante exploración física pre y trans-quirúrgico, así como estudio de gabinete: ultrasonido.

3.- Ausencia de alguna otra anomalía genital que pudiera indicar alteraciones o ausencia en la producción de testosterona, dihidrotestosterona y en la 5 α reductasa. La deficiencia de estas hormonas y su enzima desencadena genitales ambiguos que pueden ser detectados mediante el examen clínico,

considerando la presencia de genitales no bien diferenciados, fusiones parciales del rafe perineoescrotal, hipospadias, micropene. Es decir alteraciones de los genitales externos que hacen imposible asignar inequívocamente el sexo a un paciente, pudiendo corresponder a una niña virilizada, un varón con virilización incompleta o con mucho menor frecuencia a un hemafroditismo verdadero (73).

4.- Cariotipo 46XY.

Grupo 2.

1.- Pacientes provenientes de la República Mexicana con ascendencia mexicana mínima de 2 generaciones.

2.- Pacientes sin criptorquidia ni alteración genitourinaria o inguinal.

Criterios de Exclusión. Con base a estudios previos de gabinete, cariotipo y clínicos se excluirán:

Grupo 1.

1.- Pacientes transfundidos.

2.- Con criptorquidia secundaria a procedimientos quirúrgicos previos

3.- Con testículo retráctil o dudosamente criptorquídico

4.- Con antecedente de cirugía inguinal.

5.- Con síndromes con síndromes asociados a criptorquidia (anexo 1).

Grupo 2.

1.- Pacientes transfundidos.

Muestras Biológicas. El estudio molecular se realizará en linfocitos que se aislarán a partir de 7 ml de sangre periférica, empleando EDTA como anticoagulante.

Extracción del DNA. El DNA fue extraído a partir de los linfocitos obtenidos de sangre periférica, utilizando la técnica convencional de fenol-cloroformo ó KIT de extracción QUIAGEN. Se realizará análisis cuantitativo y cualitativo para verificar

concentración de DNA por espectrofotometría y calidad electroforética de material.

Estudio Molecular.

ANÁLISIS DE SNPs DEL GEN: *INSL3*

Identificación de SNP's por el método fluorescente de 5' exonucleasa (TAQMAN®)

Los SNPs o variantes alélicas: R102C, R105H, R102H del gen *INSL3*, fueron analizados mediante por el método fluorescente de 5' exonucleasa (la técnica de TaqMan®). Esta técnica se utilizará para el análisis de polimorfismos con cambios en una base (SNPs). Para cada ensayo de discriminación alélica se diseñaran 2 sondas específicas marcadas en el extremo 5' con fluorocromos diferentes, FAM para el alelo 1 y VIC para el alelo 2, además ambas sondas tendrán en el extremo 3' un "quencher" (TAMRA) el cual mientras la sonda permanece intacta, inhibe la emisión de fluorescencia. Durante la reacción de PCR los primers hibridan una secuencia específica del templado de DNA. Si éste contiene la secuencia polimórfica, la sonda de Taqman también híbrida con su secuencia homóloga. Durante la PCR, la AmpliTaq Gold, que tiene actividad tanto de DNA polimerasa como de exonucleasa 5'-3', es capaz de digerir la sonda marcada durante la amplificación y liberar el colorante fluorescente de la acción del "quencher", de tal manera que dadas las condiciones de astringencia utilizada durante la reacción, sólo la sonda específica para el polimorfismo presente sería capaz de hibridar. Por lo tanto es posible diferenciar un alelo del otro en base al tipo de fluorescencia emitida (figura 3).

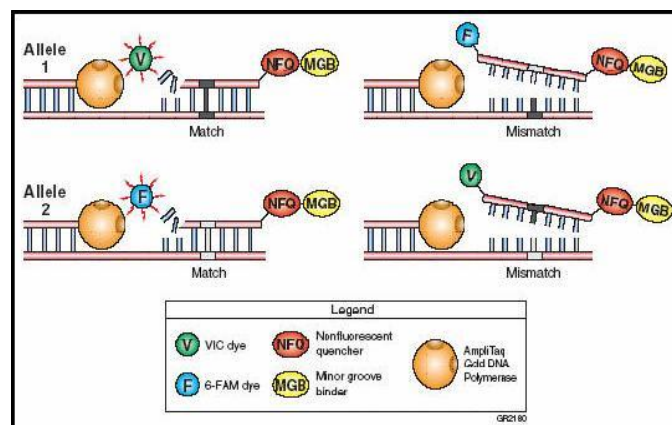


FIGURA 3. Método de fluorescencia de 5' exonucleasa (TaqMan®) para determinación de polimorfismos por discriminación alélica.

Determinación sérica de INSL3. Se llevó a cabo mediante KIT`s de radioinmunoanálisis (Phoenix pharmaceuticals Inc., Belmont CA, RK035-27) y apegado a las instrucciones de los fabricantes en el Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubiran. La sangre obtenida se dejara a temperatura ambiente durante 2 hrs y se eliminará el coagulo. El suero obtenido se centrifugará para eliminar células sanguíneas, para esta técnica requerimos de 100µl de suero por paciente y con el duplicado será necesario un total de 200µl, por lo tanto con 1 ml de sangre es suficiente.

Técnica:

- 1.- Dilución del buffer del RIA (concentrado) con 150ml de agua destilada. Este buffer se utilizará para reconstituir todos los demás compuestos en el KIT y deberá ser utilizado para la dilución de las muestras.
- 2.- Reconstituir el péptido estándar con 200µl de buffer del RIA, mezclar y almacenar en hielo.
- 3.- Reconstituir el anticuerpo con 13ml de RIA-buffer, mezclar y almacenar en hielo.
- 4.- Reconstituir las muestras con RIA-Buffer.
- 5.- Preparar las soluciones del péptido estándar.
- 6.- Comenzar la reacción de RIA en tubos de poliestireno agregando el anticuerpo y el buffer del RIA, y agitar en vortex.
Incubar toda la noche durante 16 a 24 hrs a 4°C.
- 7.- Reconstituir el péptido 125 con 13ml de RIA buffer y mezclar.
- 8.- Agregar 100µl de la solución trazadora en cada tubo y agitar en vortex incubar todos los tubos de 16 a 24 hrs a 4°C.
- 9.- Reconstituir el anticuerpo con 13ml de buffer de RIA.
- 10.- Reconstituir el suero de normal de conejo con 13ml de buffer de RIA.
- 11.- Adicionar 100µl del anticuerpo a cada tubo.
- 12.- Adicionar 100µl de suero de conejo normal a cada tubo.
- 13.- Agitar en vortex e incubar todos los tubos a temperatura ambiente durante 90 minutos.

- 14.- Adicionar 500µl de buffer de RIA a cada tubo y agitar en vortex.
- 16.- Centrifugar todos los tubos a 3000 rpm (1700 x g) durante 20 minutos.
- 17.- Aspirar el sobrenadante.
- 18.- Utilizar un contador de gamma para la cuantificación y calcular los resultados.

11.. DEFINICIONES.

1. El término idiopático se define como la afección o enfermedad de la cual se desconoce su causa (esto no quiere decir que no la tenga, sino que no ha podido ser identificada).
- 2 Criptorquidia: testículo permanentemente por arriba del anillo inguinal externo, no descendible al escroto con maniobras bimanuales, o no palpable (detectado mediante US abdominal).
- 3 Grupo control: individuos sanos, sin criptorquidia ni alteración genitourinaria, inguinal o con cualquier otra patología referida en los criterios de exclusión.
- 4 Variante alélica o polimorfismo: Cambios genéticos comunes en la población general, ocurriendo en más del 1% de la población y que no son capaces de producir enfermedad.
- 5 Paciente mexicano: Nacido en la República Mexicana con al menos 2 generaciones (padres y abuelos), igualmente nacidos en México, por rama paterna y materna.
- 6 Genotipificación: Caracterización de ambos alelos de los genes *INSL3* , *Lgr8/GRAT* y *HOXA10* para posteriormente asociarlos con la criptorquidia como se describe en la metodología.

12. INSTRUMENTO DE RECOLECCION DE DATOS.

		INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA DIRECCION MEDICA "HISTORIA CLINICA" DEPARTAMENTO Y/O SERVICIO: PROCEDENCIA:	
		DELEGACION: DIA MES AÑO	CODIGO POSTAL: DIA MES AÑO
INFORMANTE:	MA PA AS OT	FECHA ACTUAL:	
DOMICILIO:			
TELEFONOS:		SEXO: 1 MASCULINO 2 FEMENINO	
ORIGEN DE:	ABUELO MATERNO:	MADRE:	
	ABUELO PATERNO:	PADRE:	
	ABUELA MATERNA:	PACIENTE:	
	ABUELA PATERNA:		

INTERROGATORIO

I. MOTIVO DE LA CONSULTA
 CRIPTORQUIDIA EN ESTUDIO(SI) [] NO [] CRIPTORQUIDIA TRATADA SOLO PROTOCOLO(SI) [] NO []

II. PADRECIMIENTO ACTUAL
 EDAD DEL INICIO DE SINTOMAS O SIGNOS
 EDAD DE DIAGNOSTICO DE CRIPTORQUIDIA
 TRATAMIENTO RECIBIDO PARA LA CRIPTORQUIDIA (SI fue quirurgico, fechas y resultados en cada lado)
 SI FUERON HORMONAS, POR CUANTO TIEMPO Y DOSIS
 LA ULTIMA FECHA QUE LAS USO
 SI SE LE QUITO UN TESTICULO, PORQUE?
 COMENTARIOS SI FUERAN NECESARIOS
 ¿HA RECIBIDO TRAT. O PRUEBAS CON HORMONAS ANTES DE 3 MESES?

III. SINTOMAS Y SIGNOS PRINCIPALES

IV. ANTECEDENTES PATOLOGICOS
 TRANSFUSIONES PREVIAS
 ANTECEDENTES DE QUIMIO O RADIOTERAPIA

V. ANTECEDENTES PERSONALES NO PATOLOGICOS
 1.- EMBARAZO Y PARTO
 2.- INECNATO INMEDIATO PESO [] [] [] [] GS TALLA [] [] CM

3.- ALIMENTACION, CRECIMIENTO Y DESARROLLO

4.- MEDICINA PREVENTIVA

VI. ANTECEDENTES FAMILIARES
 ¿TIENE OTRO FAMILIAR ATENDIDO EN ESTE INSTITUTO?
 ¿QUE PARENTESCO TIENE?
 TIENE CRIPTORQUIDIA O ALTERACION DE GENITALES EXTERNOS

GENETICA
ARBOL GENEALOGICO

EXPLORACION FISICA

I. SIGNOS VITALES Y SOMATOMETRIA
 PESO [] GR PERC [] TALLA [] PERC [] COEFALICA [] PERC []
 PULSO [] TENSION ART. [] F. RESP. [] TEMP. []

II. INSPECCION GENERAL

III. CABEZA Y CUELLO

IV. TORAX

V. ABDOMEN

VI. GENITALES
 UNILATERAL
 BILATERAL

VII. MUSCULO ESQUELETICO

VIII. PIEL Y ANEXOS

IX. SISTEMA NERVIOSO ORGANOS DE LOS SENTIDOS

X. DIAGNOSTICOS

XI. PLAN DE ESTUDIO Y TRATAMIENTO

ELABORADO POR: NOMBRE CLAVE CATEGORIA FIRMA
 SUPERVISADO POR: NOMBRE CLAVE CATEGORIA FIRMA

13. 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 tomo una muestra única de 5-10ml de sangre por punción venosa, la cual será realizada bajo principios de asepsia; 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 mantendrá con estricta confidencialidad. Se debe destacar que la planeación, el desarrollo, el manejo de resultados y la interacción entre investigadores y pacientes fue con estricto apego a la Declaración Universal sobre el genoma humano y los derechos humanos promulgada por la UNESCO.

Los pacientes llenaron una carta de asentimiento y los padres de consentimiento.

CARTA DE CONSENTIMIENTO

Paciente No. _____ Expediente No. _____ México, D. F. a _____ de _____ de 20__

El Instituto Nacional de Pediatría a través del servicio de Urología y el Laboratorio Histomorfología me han invitado a participar en un estudio experimental cuyo título es:

ESTUDIO MOLECULAR DE LA CRIPTORQUIDIA IDIOPATICA EN PACIENTES MEXICANOS

El medico urólogo colaborador de este estudio me ha explicado que:

- 1) La criptorquidia (CO) es un trastorno que se observa en los recién nacidos cuando uno o ambos testículos no descendieron a la bolsa escrotal. El carácter hereditario de la misma en algunos casos predispone a otros miembros de la familia a desarrollar la enfermedad o bien a ser portadores de la misma con la posibilidad de heredario a otras generaciones. Si no es corregida puede desarrollar infertilidad y cáncer testicular.
2) Se trata de un estudio clínico experimental cuyo objetivo es conocer aspectos genéticos importantes relacionados con la enfermedad que actualmente padece mi hijo (a) como son la forma de presentación de la enfermedad.
3) El procedimiento a efectuar solo requiere de la obtención de una sola muestra de 5 a 7ml de sangre periférica del niño (a), con riesgo mínimo de daño físico y nulo de daño irreversible. El material que se utilizara es nuevo y desechable, y los procedimientos efectuados, como los materiales utilizados en el estudio, no tendrán costo alguno agregado a otros tratamientos necesarios de mi atención y prescripciones por otros médicos.
4) En este estudio participarán 256 pacientes y toda la información obtenida será confidencial.
5) Podré abandonar voluntariamente el estudio en cualquier momento que yo decida y las muestras serán desechadas siguiendo los procedimientos debidos, sin que ello repercuta en la atención que se le brinde a mi hijo (a) por parte del Instituto Nacional de Pediatría.
6) En caso de continuar hasta el final en el estudio, y sólo de ser necesario, se solicitará mi consentimiento para donar las muestras obtenidas al Instituto, para futuras investigaciones, sin que exista ningún compromiso de mi parte en ello, ni del Instituto Nacional de Pediatría, sobre remuneración de cualquier tipo a cambio.

7) Tengo derecho a solicitar cualquier tipo de información necesaria, a comentar dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio con el Dr. Juan Osvaldo Cuevas Alpuche, Investigador colaborador de este proyecto. Declaro que he leído y entendido la hoja de consentimiento, que se me han aclarado las dudas y respondido a entera satisfacción mis preguntas y que acepto voluntariamente participar en el estudio.

Form fields for signatures: Nombre del (la) menor, Nombre y firma del padre, Nombre y firma de la madre, Nombre y firma del investigador responsable

ORIGINAL PARA ARCHIVO

HOJA DE ASENTIMIENTO DEL MENOR (HOJA EN DONDE EL NIÑO MENCIONA SI ESTA O NO DE ACUERDO CON EL ESTUDIO) para niños de 7 a 13 años de edad.

Investigadores responsables: En el Instituto Nacional de Pediatría: M. en C. Margarita Chávez Saldarña (Tel: 1084 0900 ext: 1453), Dr. Osvaldo Cuevas Alpuche (Tel: 1084 0900 ext. 1272) ante CONACYT Dra. Rosa Ma. Viguera Villaseñor (Tel: 1084 0900 ext: 1453).

Paciente No. _____ TITULO: ESTUDIO MOLECULAR DE LA CRIPTORQUIDIA IDIOPATICA EN PACIENTES MEXICANOS No. de registro: INP-63/2008, CONACYT: Proyecto 2008-87101

¿PARA QUÉ QUIEREN QUE PARTICIPE EN ESTE PROYECTO? ¿PARA QUÉ VAN A HACER ESTE ESTUDIO? Este estudio nos puede servir para conocer por que se origina la enfermedad llamada criptorquidia, que se refiere a cuando uno o los dos testículos no están dentro de sus bolsitas del escroto. Esto no ayudará a conocer en otros estudios si el paciente puede desarrollar otras enfermedades. ¿QUÉ ME VAN A HACER? Si deseas estar en este estudio, esto es lo que te van a hacer: ¿ME VA A DOLER? Cuando te meten la aguja y ponen el tubo de plástico para tomar sangre se siente como cuando te entierras algo filoso. Solo duele cuando ponen la aguja. No duele cuando la sangre sale o después de que se seca la aguja. ¿EL ESTUDIO LES COSTARÁ A MIS PAPÁS? No. ¿ME VAN A PAGAR POR ESTAR EN ESTE ESTUDIO? No.

¿CUANDO TENGA DUDAS SOBRE EL ESTUDIO A QUIEN LE PREGUNTO? Le puedes preguntar a cualquiera de los doctores responsables del proyecto que te atienden o a los mismos doctores a los teléfonos que aparecen en la primera hoja. ¿SI NO PARTICIPO EN EL ESTUDIO SE ENOJARÁN CONMIGO O YA NO ME QUERRÁN ATENDER? No tienes que estar en este estudio si no lo deseas. Nadie se va a enojar contigo si no quieres estar en este estudio. Tu doctor seguirá atendéndote. Puedes decir que sí ahora y después decir que no. No hay problema si cambias de opinión. DECLARACION DEL NIÑO (A)

El medico urólogo colaborador de este estudio me ha solicitado autorización para tomarme una muestra de sangre o células de la mucosa oral (boca) con un cepillo, sin causar dolor ni molestia alguna, para estudiar aspectos importantes a nivel genético relacionados con la criptorquidia que es una enfermedad en donde uno o ambos testículos no descendieron a la bolsita del escroto. Hice preguntas y respondieron a todas. Me dijeron que puedo hacer preguntas cuando quiera y puedo dejar de estar en el estudio en cualquier momento. Voy a recibir una copia de esta forma de aceptación firmada.

Con esta información yo he decidido:

- Voy a estar en el estudio. No quiero estar en el estudio.

Por favor firma con tu nombre aquí:

Nombre del paciente en letra de molde Fecha (dd-mm-aaaa)

Fecha de nacimiento y edad del paciente

PERSONAL DEL ESTUDIO

Nombre de la persona que obtiene la aceptación en letra de molde

Firma de la persona que obtiene la aceptación Fecha (dd-mm-aaaa)

DECLARACION DE LOS TESTIGOS (obligatoria la firma de 2 testigos)

La información en esta forma de consentimiento informado se explicó al paciente, el progenitor o tutor del paciente, quienes al parecer la comprendieron.

Firma del primer testigo Fecha (dd-mm-aaaa)

Nombre del primer testigo Relación con el paciente

Domicilio del primer testigo

Firma del segundo testigo Fecha (dd-mm-aaaa)

Nombre del segundo testigo Relación con el paciente

14. RESULTADOS

Un total de 162 individuos pediátricos fueron incluidos en el estudio, N= 75 criptorquídicos idiopáticos y N=87 controles sanos, no criptorquídicos.

En el análisis de discriminación alélicas de las variantes analizadas, todos los individuos resultaron homocigotos para el alelo normal o ancestral, ninguno presentó el alelo alterado o de riesgo de las variantes estudiadas: R102C, R105H, R102H del gen *INSL3*.

La comparación de medias, de la cuantificación sérica de INSL3 en los pacientes criptorquídicos idiopáticos vs grupo control, no criptorquídicos, fue factible realizarla en 47 pacientes (41 pacientes mayores de 8 años, y 6 pacientes menores de 8 años); los resultados fueron analizados con t-student y mostraron significancia estadística en pacientes mayores de 8 años ($p=0.044$). (Tabla 3 y 4)

TABLA No. 3. Cuantificación sérica de INSL3. Sólo mayores de 8 años.

Prueba T.

GRUPO	N	INSL3 /MEDIA	P	I DE C 95%
CRIPTORQUIDIA	21	306.16 ± 261.86	0.044	-491.40; -6.83
NO CRIPTORQUIDIA	20	555.28 ± 464.66		

TABLA No. 4, Cuantificación sérica de INSL3. Sólo menores de 8 años. **Prueba**

T.

GRUPO	N	INSL3 /MEDIA	P	I DE C 95%
CRIPTORQUIDIA	2	19.699±0.4249	0.211	-94.6584; 31.68
NO CRIPTORQUIDIA	4	51.185 ± 39.70		

Así mismo comparamos los resultados de las medias de los niveles séricos de INSL3 en pacientes criptorquídicos vs no criptorquídicos (mayores de 8 años) con los reportados por la literatura en pacientes no criptorquídicos (9.5-17.5 años) (74). (TABLA 5)

TABLA 5: CUANTIFICACIÓN DE INSL3: CLASIFICACIÓN TANNER

PACIENTES CON CRIPTORQUIDIA MAYORES DE 8 AÑOS

Estadio Tanner	INSL3 (pg/ml)	Rangos
		23.206-
tanner I	111.830643	246.2675
Tanner II	247.854167	14.87-699.47
Tanner III	450.581	207.95-887.02
Tanner IV	602.51	481.6-723.42
Tanner IV	701.525	701.525

n= 21 pacientes

PACIENTES CONTROLES (SIN CRIPTORQUIDIA) MAYORES DE 8 AÑOS

Estadio Tanner	INSL3 (pg/ml)	Rangos
Tanner I	59.5975	32.961-86.234
Tanner II	225.874571	12.43-484.99
Tanner III	648.195	204.165-1280
Tanner IV	924.164	549.51- 1280
Tanner V	946.63	453.59-1280

n= 20 pacientes

PACIENTES MASCULINOS SANOS 9.5-17.5 AÑOS. Ferlin y col (73)

Estadio Tanner	INSL3 (pg/ml)	Rangos
Tanner I	151.1	103-198
Tanner II	392	306-437
Tanner III	810	743-928
Tanner IV	1100	855-1500
Tanner V	1340	1001-1458

n=75
pacientes

15. DISCUSION.

La población mexicana mestiza es considerada una población heterogénea, con una estructura genética compleja donde los genes nativos americanos representan el 51%, los genes europeos el 45.4% y los genes africanos el 3.7%, esto se ve reflejado en el gran espectro de variantes alélicas en determinados padecimientos monogénicos, por supuesto que en el caso de padecimientos como la criptorquidia, considerada una entidad multifactorial la distribución de frecuencias de ciertas alteraciones génicas puede verse reflejada con una diferencia significativa, como lo muestran diversos estudios moleculares en diferentes poblaciones tratando, en primera instancia de identificar variantes alélicas en diversos genes, para así mismo correlacionarlas con un fenotipo específico, la criptorquidia.

En el caso del presente estudio se analizaron tres diferentes alteraciones o SNPs en el gen *INSL3*: R102C, R105H, R102H y en ninguno de los dos grupos pediátricos de estudio (pacientes y controles) detectamos el alelo alterado o de riesgo para este padecimiento, lo cual podría atribuirse al tamaño de muestra, que hasta el momento puede considerarse todavía bajo y por otro lado al tipo de alteraciones que podría mostrar una población como la nuestra, con una alta heterogeneidad genética, y que posiblemente presente alteraciones distintas a las otras poblaciones estudiadas. (61, 65, 66, 67, 68, 69, 70)

Ferlin y cols 2006, en un estudio de 967 pacientes italianos se detectaron seis mutaciones del gen *INSL3*, tres mutaciones conocidas previamente (P93L, R102C y R102H) y tres mutaciones nuevas (R4H, W69R, y R72K), en 18 pacientes (1.9%) asociadas a síndrome de disgenesia testicular (criptorquidismo, hipoespermatogénesis, azoospermia, cáncer testicular). Observando que las mutaciones R102C y R102H analizadas en este estudio se detectaron en un 0.62% (6/967). Los seis pacientes con diagnóstico clínico de criptorquidia idiopática. Ambas mutaciones describen un cambio de una arginina en la posición 102 de la proteína por una citocina y una histidina respectivamente. La arginina es el cuarto aminoácido antes del péptido C; estudios en bovinos sugieren un rol crítico de este sitio para el procesamiento de la proteína, el cual está localizado

cerca de la hendidura de la endopeptidasa (sitio entre el péptido C y la cadena A) (figura 3), y es posible que un cambio en la secuencia de aminoácidos alrededor de esta hendidura pueda alterar el procesamiento del péptido C y que este no pueda ser suprimido posteriormente, con su concordante trastorno funcional (expresión proteica) que es reducción en la activación del receptor de INSL3 (LGR8)(61).

Por otro lado en relación a la variante R105H, Houate y cols en el 2007, reportaron tres nuevas mutaciones en el gen *INSL3* (19G, V18M, y **R105H**) asociadas a criptorquidia, en una población marroquí de 184 pacientes con síndrome de disgenesia testicular (criptorquidia, hipospadias, y micropene). Las mutaciones fueron analizadas secuenciación directa y análisis con enzimas de restricción. Observando una frecuencia para las tres mutaciones estudiadas de (2.75%), lo cual refleja un índice elevado para la mutación R105H que en nuestra población no fue detectada y por tanto podemos inferir que nuestra población estudiada muestra una variabilidad genética distinta a la de otras poblaciones, además su estudio incluyó una población de pacientes con alteraciones genitales y no fue un grupo único de pacientes con criptorquidia idiopática, como en el caso de nuestro estudio (67).

Por lo anterior es necesario implementar metodologías que nos ayuden a la búsqueda o tamizaje de mutaciones desconocidas o poco frecuentes en nuestra población. En el caso del gen *INSL3*, que es considerado uno de los genes más pequeños con 12,000 pb puede realizarse secuenciación automática, primeramente de las regiones codificantes, en los 2 exones que conforman este gen y posteriormente en las regiones intrónicas.

Por otro lado en este estudio pudimos comprobar que existe asociación entre la disminución de los niveles de INSL3 en pacientes con criptorquidia probablemente como indicador directo del funcionamiento de células de Leydig, lo cual fue significativo estadísticamente en nuestros pacientes criptorquídicos mayores de 8 años de edad. Los cambios en los niveles séricos de INSL3 normales medidos en pacientes no criptorquídicos puberales ya se habían determinado en otros estudios demostrando un incremento progresivo durante la

pubertad que dependía de la acción de LH (hormona luteinizante), en las células de Leydig (74); sin embargo no existía evidencia de que los niveles de *INSL3*, sean comparablemente bajos respecto a los pacientes controles (no criptorquídicos) lo que apoya a que los niveles séricos de *INSL3* puedan ser determinados en pacientes criptorquídicos como parte de su abordaje clínico y con ello evaluar el funcionamiento de las células de Leydig de una manera indirecta y por tanto el pronóstico en función de fertilidad (75). Se ha sugerido que durante el desarrollo puberal y en la edad adulta los niveles de testosterona y de *INSL3* proporcionan diferente información del estado de las células de Leydig. La testosterona refleja la actividad esteroidogénica que es sensible a la elevación aguda de LH, considerando que *INSL3* no responde a la estimulación aguda de la esteroidogénesis, refleja mejor el estado de diferenciación de las células de Leydig. Esto concuerda con encontrar en el adulto solamente testosterona y no secreción de *INSL3* en respuesta a la LH en el tratamiento con Gonadotropina Coriónica humana (hCG). Estos datos apoyan fuertemente a que *INSL3* es un marcador mas sensible del estado de diferenciación de las células de Leydig que la testosterona (74). Y podría convertirse en un marcador del estado funcional testicular que sirva para decidir tratamiento quirúrgico en pacientes en los cuales la corrección de criptorquidia es realizada tardíamente (orquidopexia vs orquiectomía).

Correcciones tempranas quirúrgicas pueden hacer que el daño a las células: espermatozonias sea reversible, evitando consecuente problemas de infertilidad.

Así mismo, caracterizar las variantes alélicas en estos genes asociados a esta patología en nuestros pacientes pensando en alguna mutación de aparición epidemiológica, permitiría entender mejor la fisiopatología de la criptorquidia y probablemente del cáncer testicular, así como, diseñar y establecer en un futuro, nuevas estrategias de tratamiento individualizado con base en el genotipo de cada paciente con estos padecimientos.

16. BIBLIOGRAFIA.

1. Hutson JM, Balic A, Nation T, Southwell B; Cryptorchidism. *Seminars in Pediatric Surgery.* (2010) 19, 215-224.
2. Hussman D.A.; Levy J.B. 1995 Current concepts in the pathophysiology of testicular descent. *Urology* 46:267-276.
3. Hutson JM, Clarke MC; Current management of the undescended testicle. *Seminars in Pediatric Surgery.* (2007) 16, 76-70.
4. 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.
5. Farrer J.H.; Walker A.H.; Rajfer J. 1985 Management of the post pubertal cryptorchid testis: A statistical review *J Urol* 134:1071.
6. Elder J.S. The undescended testis: hormonal and surgical management. *Surgical Clinics of North America.* 1998. 68:983.
7. Heyns C.F.; Hutson J.M 1995 Historical review of theories in testicular descent. *J Urol* 153:754-767.
8. Hutson J.M.; Donahoe P.K. 1986 The hormonal control of testicular descent. *Endocr Rev* 7:270-283.
9. Hunter J. 1786 A description of the situation of the testis in the foetus with its descent into the scrotum. In Hunter J (ed) *Observations certain parts of the animal oocony.* 13 castle St. London; PP; 1-26.
10. Weil C.; Ueber den. 1885 Descensus testiculorum; nebst Bemerkungen ueber die Entwicklung der Scheidenhaveute and des akrotums. *Z Heilk* 5:225.
11. McMahon D.R.; Kramer S.A.; Tindall D.J.; Husmann D.A. 1995 Antiandrogen induced cryptorchidism in the pig is associated with failed gubernacular regression and epididimal malformations. *J Urol* 154; 553-557.
12. Nef S.; Parada L.F. 1999 Cryptorchidism in mice mutant for *Insl3*. *Nat Genet* 22:295-299.
13. 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.
14. Ivell R, AnandIvell R; Biology of insulin-like factor 3 in human reproduction. *Human Reproduction Update* 2009; (15) 463-476.
 15. Satokata I.; Benson G.; Maas R. 1995 Sexually dimorphic sterility phenotypes in *Hoxa 10* deficient mice *Nature* 374:460-463.
 16. 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.
 17. 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.
 18. 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.
 19. 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.
 20. Van der Schoot P.; Elger W. 1996 Development; structure and function of the cranial suspensory ligament of the mammalian gonads in a Cross-Speciesperspective: their possible role in affecting disturbed testicular descent. *Hum Reprod Update* 2; 339-419.
 21. Viguera 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.
 22. Viguera 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
 23. Hadziselimovic F.; Duckett JW; Snyder HM; Schnauffer L; Huff D.1987 Omphalocele; cryptorchidism; and brain malformations. *J Pediatr Surg*. 22(9):854-6.
 24. Abney T.O.; Key B.A. (eds) 1989 *The criptorchid testis*. CRC Press; Boca Raton FL pp1-176.

25. Hutson J.M. 1986 Testicular feminization: a model for testicular descent in mice and men. *J Pediatr Surg* 21:195-198.
26. Grocock C.A.; Charlton H.M.; Pike M.C. 1988 Role of the fetal pituitary in cryptorchidism induced by exogenous maternal oestrogen during pregnancy in mice. *J Reprod Fertil* 83:295-300.
27. Radhakrishnan J.; Donahoe P.K. 1981 The gubernaculum and testicular descent. In: Fonkalsrud E.W.; Menguel W. (eds) *The Undescent Testis*. Year Book Medical Publishers; Chicago; PP 30-41.
28. Spenser J.R.; Torrado T.; Sanchez R.S.; Vaughan Jr. ED; Imperato-Mcginley J. 1991 Effects of flutamide and finasteride on rat testicular descent. *Endocrinology*; 129:741.
29. Shono T.; Ramm-Anderson S.; Hutson J.M. 1994 Transabdominal testicular descent. *Science*; 211:1278.
30. Hadziselimovic F. 1983 Embryology of testicular descent and mal-descent. In: Hadziselimovic F (ed) *Cryptorchidism: Management and Implications*. Springer-Verlag; Berlin; PP 11-34.
31. Gendrel D.; Roger M.; Job J.C. 1980 Plasma gonadotrophin and testosterone values in infants with cryptorchidism. *J Pediatr* 97; 217-220.
32. Yamanaka J.; Baker M.L.; Metcalfe S.A.; Hutson J.M. 1991 Serum levels of Müllerian inhibiting substance in boys with cryptorchidism. *J Pediatr Surg* 26:621-623.
33. Baker M.L.; Metcalfe S.A.; Hutson J.M. 1990 Serum levels of Müllerian inhibiting substance in boys from birth to 18 years as determined by enzyme immunoassay. *J Clin Endocrinol Metab* 70:11-18.
34. Baker M.L.; Hutson J.M. 1993 Serum levels of Müllerian inhibiting substance in boys throughout puberty and in the first 2 years of life. *J Clin Endocrinol Metab* 76:245-247.
35. Josso N.; Cate R.L. Picard J.Y.; Vigier B.; Di Clemente N.; Wilson C.; Imbreaud S.; Pepinsky R.B.; Guerrier D.; Boussin L.; Lageai L.; Carre-Eusebe D. 1993 Anti Müllerian hormone: the host factor. *Recent Prog Horm Res* 49:1-59.
36. Lee M.M.; Donahoe P.K. 1993 Müllerian inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions. *Endocr rev* 14:152-164.

37. Cosgrove M.D.; Benton B.; Henderson B.E. 1977 Male genitourinary abnormalities and maternal diethylstilbestrol. *J Urol* 117:220.
38. 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.
39. Hadziselimovic F.; Geneto R.; Emmons L.R. 2000 Elevated placental estradiol: a possible etiological factor of human cryptorchidism. *J Urol* 164:1694-1695
40. Hadziselimovic F.; Thommen L.; Girard J.; Herzog B. 1986 The significance of postnatal gonadotropin surge for testicular development in normal and cryptorchid testes *J Urol* 136:274-276.
41. McLachlan J.A.; ed. Estrogens in the environment II. Amsterdam: Elsevier; 1985.
42. Haavisto T.; Nurmela K.; Pohjanvirta R.; Huuskonen H.; El-Gehani F.; Paranko J. 2001 Prenatal testosterone and luteinizing hormone levels in male rats exposed during pregnancy to 2;3;7;8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and diethylstilbestrol. *Mol Cell Endocrinol.* 178:169-79.
43. McKinnell C; Atanassova N; Williams K; Fisher JS; Walker M; Turner KJ; Saunders T.K.; Sharpe RM.; 2001 Suppression of androgen action and the induction of gross abnormalities of the reproductive tract in male rats treated neonatally with diethylstilbestrol. *J Androl.* 22(2):323-38
44. Emmen J.M.; McLuskey A.; Adham I.M.; Engel W.; Verhoef-Post M.; Themmen A.P.; Grootegoed J.A.; Brinkmann A.O. 2000 Involvement of insulin-like factor 3 (Insl3) in diethylstilbestrol-induced cryptorchidism. *Endocrinology* 141:846-9.
45. Toppari J.; Larsen C.J.; Christiansen P.; Giwercman A.; Grandjean P.; Guillette J.L.; Jégou B.; Jensen K.T.; Jouannet P.; Keiding N.; Leffers H.; McLachlan A.J.; Meyer O.; Muller J.; De Meyts R.E.; Scheike T.; Sharpe R.; Sumpter J.; Skakkebaek E.N. 1996 Male reproductive health and environmental xenoestrogens *Environmental Health Perspectives* 104:Suppl 4 741-803.
46. Attah A.A.; Hutson J.M. 1993 The role of intra-abdominal pressure in cryptorchidism. *J Urol* 150:994-996.
47. Kropp K.A.; Voeller K.K.A. 1981 Cryptorchidism in meningomyelomale. *J Pediatr* 99:110-113.

48. 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.
49. Czeizel A.; Erodi E.; Toth J. 1981 Genetics of undescended testis. *J Urol* 126: 528-529;.
50. Corbus B. C.; O'Connor V. J. 1922 The familial occurrence of undescended testes. Report of six brothers with testicular anomalies. *Surg Gynec Obstet* 34: 237-240.
51. Perrett; L. J.; O'Rourke D. A. 1969 Hereditary cryptorchidism. *Med. J. Aust.* 1: 1289-1290.
52. Pardo-Mindan F. J.; Vargas Torcal F.; Garcia Julian F.; Virto Ruiz M. T. 1975 Familial cryptorchidism. (Letter) *Pediatrics* 56: 616 only.
53. Bishop M. C.; Whitaker R. H.; Sherwood T. 1979 Associated renal anomalies in familial cryptorchidism. (Letter) *Lancet* II: 249 only.
54. Levy S.; Sutton G.C.; Ng P.; Feuk L.; Halpern A.L.; Walenz B.P.; Axelrod N.; Huan Kirkness E. E.; Denisov G.; Lin Y.; MacDonald J.R.; Pang A.W. 2007 The diploid genome sequence of an individual human. *PLoS Biol* 5(10):e254.
55. 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.
56. 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.
57. Ivell R.; Bathgate R.A. 2002 Reproductive biology of the relaxin-like factor (RLF/INSL3). *Biol Reprod* 67(3):699-705.
58. 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.
59. 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.

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. 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.
62. 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.
63. 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.
64. Foresta C, Zuccarello D, Garolla A, Ferlin A. Role of Hormones, Genes, and Environment in Human Cryptorchidism. *Endocrine Reviews*, August 2008, 29 (5): 560-580.
65. 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.
66. 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.
67. 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.
68. 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.
69. 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.
70. Bullesbach E.E.; Schwabe C. 2002 The primary structure and the disulfide

- links of the bovine relaxin-like factor (RLF). *Biochemistry* 41:274.
71. Wikstrom A.M; Bay K.; Hero M.; Andersson A.M.; Dunkel L. 2006 Serum insulin-like factors 3 levels during puberty in healthy boys and boys with klinefelter syndrome *J Clin Endocrinol Metab* 91:4705-4705.
 72. Foresta C.; Bettella A.; Vinanzi C.; Dabrigli 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.
 73. American Academy of Pediatrics (2000) Evaluation of the newborn with developmental anomalies of the external genitalia. *Pediatrics* 106: 138-142.
 74. Ferlin A, Garolla A, Rigon F, Rasi CL, Lenzi A, Foresta C. Changes in Serum Insulin-Like Factor 3 during Normal Male Puberty. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91 (9); 3426-3431.
 75. Bay K, Andersson AM. Human testicular insulin-like factor 3: in relation to development, reproductive hormones and andrological disorders. *Int J Androl*. 2010.

Anexo I. SINDROMES EN LOS QUE SE PRESENTA CRIPTORQUIDIA

PEPTIDO RELACIONADO CON EL GEN DE LA CALCITONINA Y EL NERVI0 GENITOFEMORAL	
ANENCEFALIA	ENDOCRINO
LABIO LEPORINO Y PALADAR HENDIDO	ENDOCRINO
HIPOGONADISMO HIPOGONADOTRÓFICO	
SIND. DE INSENSIBILIDAD A ANDRÓGENOS	
CRIPTOFTALMOS	SUSRT. RECESIVO
DABOWITZ	SUST. RECESIVO
HIPOPITUITARISMO	ENDOCRINO
SIND. DE KALLMAN	ENDOCRINO
SÍND. DE PERSISTENCIA DE CONDUCTOS MÜLLERIANOS	
LOWE (OCULO CEREBRORENAL)	LIGADO A X
MECKEL-AMBAR	SUST. RECESIVO
SIND. DE NOONAN	ESPORADICO
SIND. DE OPTIZ OPTIZ	AUT. DOMINANTE
APLARIA-LUPOPLANI PITUITARIA	ENDOCRINO
PRADER WILLI	ESPORADICO
PRUNE BELLY	ANOMALIAS
ROBERTS OBERTS	SUST. RECESIVO
RUBINSTEIN-TAYBI	ESPORADICO
DISPLASIA OPTICA-REPTICA	ENDOCRINO
SMITH-SEMLI-OPITZ	SUS. RECESIVO
DEFECTOS ENZIMÁTICOS TESTICULARES	ENDOCRINO
TRIPLOIDIAS	AUTOSOMICO
TRISOMIA 13	AUTOSOMICO
TRISOMÍA 18 (EDWARDS)	AUTOSOMICO
WOLF-HIRSCHHOM) 4P	AUTOSOMICO
DEF. DE 5 ALFA REDUCTASA	ENDOCRINO
3Q	AUTOSOMICO
18Q	AUTOSOMICO
NEVO DE CELULAR BARALES	SUS. DOMINANTE
SIND. DE BECKWITH-WIEDEMANN	ESPORADICO
COFFIN-SIRIS	ESPORADICO
ENANISMO DISTRÓFICO	SUST. RECESIVO
ELLIS-VAN-CREVELD	SUST. RECESIVO
DISTROFIA DE VEJIGA-CLOACA	SUST. RECESIVO
PANCITOPENIA DE FANCONI	SUST. RECESIVO
HIPOPLASIA FEMORAL	ESPORADICO
HIDANTONIA FETAL	ADQUIRIDA
FRASER	SUST. RECESIVO
HIPOPLASIA PONTEMETAFISIONO GORLIN	ESPORADICO
HALLERMAN-STERIFF	ESPORADICO
KLINEFELTER Y VARIANTES	ESPORADICO
MEMBRANA PÓNITEA	SUST. DOMINANTE
ROBINON	SUST. RECESIVO
RUBEOLA	ADQUIRIDO
SAETHRE-CHOTZEN	SUST. DOMINANTE
SECKEL	SUST. RECESIVO
DISTROFIA MICOTICA STEINERT	SUST. DOMINANTE
TREACHER-COLLIUS	SUST. DOMINANTE
TRISOMA 8	AUTOSOMICO
TRISOMA 21 (SIND. DOWN)	AUTOSOMICO
XYY	ESPORADICO
CEREBRO HEPATORENAL	SUST. RECESIVO
5P (CRI-DU-CHA)	AUTOSOMICO
21Q	AUTOSOMICO