



Casa abierta al tiempo

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Maestría en Biología de la Reproducción Animal

“Relación entre las concentraciones hormonales y microlitiasis con la expresión de proteínas de pluripotencialidad y las alteraciones histológicas testiculares en pacientes con criptorquidia”

T e s i s

para obtener el grado de:

Maestra en Biología de la Reproducción Animal

PRESENTA:

Biól. Zayra Ramírez Cuevas

COMITÉ DE TUTORES:

Co-director Externo

Dra. Rosa María Viguera Villaseñor

Co-director Interno

Dr. Mario García Lorenzana

Asesor

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura

COMITÉ DE TUTORES

Co-director externo

Dra. Rosa María Viguera Villaseñor

Laboratorio de Biología de la Reproducción.

Instituto Nacional de Pediatría

Correo electrónico: rmviguera@yahoo.com.mx

Co-director Interno

Dr. Mario García Lorenzana

Área de Neurociencias. Depto. de Biología de la Reproducción

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

Correo electrónico: mglo@xanum.uam.mx

Asesor

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura

Departamento de Biología de la Reproducción

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

Correo electrónico: pgdm@xanum.uam.mx

JURADO DE EXAMEN

Presidente

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura

Departamento de Biología de la Reproducción

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

Correo electrónico: pgdm@xanum.uam.mx

Secretario

Dra. Marcela Arteaga Silva

Departamento de Biología de la Reproducción

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

Correo electrónico: arteaga1967@hotmail.com

Vocal

Dr. Iván Uriel Bahena Ocampo

Laboratorio de Biología Molecular y toxicología de la gametogénesis

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

Correo electrónico: ivan.bahena@gmail.com

Vocal

Dra. Margarita Dolores Chávez Saldaña

Laboratorio de Biología de la Reproducción

Instituto Nacional de Pediatría

Correo electrónico: mdoloreschs@gmail.com

Este trabajo se llevó a cabo en el **Laboratorio de Biología de la Reproducción** del **Instituto Nacional de Pediatría**. Contó con recursos fiscales del programa E-022 del Instituto Nacional de Pediatría para el financiamiento de los **proyectos 04/2014 y 01/2016**, y el apoyo del Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social (FOSISS) del **CONACyT (272641)**.

Se contó con una beca del **CONACyT** para estudios de posgrado **número de becario: 638374 CVU: 869175**.

El programa de la **Maestría en Biología de la Reproducción Animal** de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el **Programa Nacional de Posgrados de Excelencia del CONACyT (PNPC)** Registro 003797.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00074

Matricula: 2173801362

Relación entre las concentraciones hormonales y microlitiasis con la expresión de proteínas de pluripotencialidad y las alteraciones histológicas testiculares en pacientes con criptorquidia.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:30 horas del día 29 del mes de enero del año 2020 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. PABLO GUSTAVO DAMIAN MATZUMURA
DR. IVAN URIEL BAHENA OCAMPO
DRA. MARGARITA DOLORES CHAVEZ SALDAÑA
DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA



ZAYRA RAMIREZ CUEVAS
ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: ZAYRA RAMIREZ CUEVAS

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. PABLO GUSTAVO DAMIAN MATZUMURA

VOCAL

DR. IVAN URIEL BAHENA OCAMPO

VOCAL

DRA. MARGARITA DOLORES CHAVEZ SALDAÑA

SECRETARIA

DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA

DEDICATORIA

A mis padres: **René Ramírez** y **Herlinda Cuevas** por apoyarme en cada una de las decisiones que he tomado a lo largo de mi vida, por creer en mí, por esforzarse para que pudiera cumplir mis metas y por estar siempre conmigo.

A mis hermanos: **Anibal Ramírez** y **Rene A. Ramírez** por darme los mejores ejemplos de vida, por sus consejos, por su compañía y por motivarme a superarme cada día más.

A **Marco Linares** por estar conmigo en estos dos años de gran esfuerzo, lleno de muchos sacrificios para los dos. Sin duda, eres el mejor compañero de vida y sin ti esto no hubiera sido posible.

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Rosa María Viguera Villaseñor**, de quién voy a estar agradecida toda la vida por brindarme desde el primer día su total apoyo, por confiar en todo momento en mí, por todos los conocimientos que me proporciono durante mi estancia en el laboratorio, así como todos los consejos para la vida que he recibido de su parte.

Al **Dr. Mario García Lorenzana** por ser parte de este proyecto y apoyarme en todo momento, al **Dr. Pablo Damián Matzumura** por su invaluable apoyo desde el inicio de la maestría, por sus excelentes consejos y por el tiempo tan valioso que me ha dedicado.

Al **técnico Pedro Medina Granados** por su gran ayuda en la realización de las técnicas realizadas en este trabajo, quién dedico diversas tardes para transmitirme su valioso conocimiento, una excelente persona que me dejó grandes enseñanzas y un gran ejemplo a seguir.

Al **Dr. Juan Osvaldo Cuevas Alpuche** y al **Dr. Ricardo Arceo**, médicos urólogos del Instituto Nacional de Pediatría por la obtención de las biopsias testiculares, así como a **Edgar Cervantes** por el apoyo en el traslado de dichas muestras.

A la **Dra. Margarita Chávez**, **Dr. Julio Rojas**, **Dr. Francisco Jiménez**, al **M. en C. Daniel Landero**, a las **Biólogas Experimental Fabiola García** y **Andrea Gómez** y a la secretaria **Silvia Flores**, miembros del laboratorio de Biología de la Reproducción quienes me apoyaron brindando sus excelentes comentarios, sus conocimientos y su gran compañía a diario y quienes desde el primer día me recibieron con los brazos abiertos haciéndome sentir como en casa.

A mis compañeros de la maestría, especialmente a **Jahdai Hernández** y **Marissa Guillén** por su agradable compañía y su amistad en este difícil camino.

Al **Dr. Guillermo Mora** y a la **Dra. Sheila Peña** por ser las primeras personas que ayudaron a mi formación, brindándome su conocimiento y su apoyo incondicional.

A los miembros del Jurado la **Dra. Marcela Arteaga** y al **Dr. Iván Uriel Bahena** por sus excelentes comentarios en la escritura de esta tesis.

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Síndrome de Disgenesia Testicular	1
1.2. Criptorquidia	1
1.2.1 Clasificación.....	1
1.2.2 Factores etiológicos.....	2
1.2.3 Factores genéticos.....	2
1.2.4 Factores ambientales	3
1.2.5 Tratamiento de la CO.....	4
1.3 Microlitiasis testicular	5
1.4 Cáncer testicular.....	7
1.5 Teoría sobre el origen de la GCNIS	9
1.6. Factores de diferenciación y pluripotencialidad.....	11
1.6 Pertinencia de la biopsia testicular.....	14
1.7 Regulación hormonal	17
1.7.1 Inhibina B.....	17
1.7.2 Hormona Folículo estimulante (FSH).....	18
1.7.2 Estradiol.....	19
2.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	19
3.0 JUSTIFICACIÓN	21
4.0 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	22
5.0 OBJETIVO GENERAL.....	22
6.0 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
7.0 HIPÓTESIS.....	22
8.0 MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
8.1 Criterios de inclusión:.....	22
8.2 Criterios de exclusión:	23
8.3 Estrategia Experimental	23
8.4 Obtención de muestras biológicas.	24
8.4.1 Determinación sérica de Inhibina, FSH y estradiol.	24
8.4.2 Biopsia testicular	25

8.5 Análisis morfológico	25
8.6 Inmunohistoquímica	26
8.7 Análisis estadístico	28
9.0 RESULTADOS	29
9.1 Resultados clínicos	29
9.2 Concentraciones hormonales	30
9.3 Expresión de proteínas de pluripotencialidad	33
9.4 Presentación de MT.....	35
9.5 Presentación de MT y expresión de proteínas de pluripotencialidad.....	36
9.6 Evaluación histológica	37
9.7 Análisis de Correlaciones.....	41
9.7.1 Correlaciones con las proteínas de pluripotencialidad	43
9.8 Análisis individual por paciente	43
10.0. DISCUSIÓN.....	45
10.1 Evaluación hormonal	46
10. 2. Evaluación Histológica	47
10.3. Evaluación en la expresión de proteínas de pluripotencialidad	51
10. 3. Análisis individual por paciente	52
11.0 CONCLUSIÓN	53
12.0 BIBLIOGRAFÍA.....	54
13.0 ANEXOS	73

ABREVIATURAS

AP-2 γ : Factor de transcripción activador de la proteína 2.

AR: Ácido retinoico.

CISt: Carcinoma *in situ* testicular.

c-KIT: Proteína tirosina cinasa.

CO: Criptorquidia.

CT. Cáncer testicular.

DAB: Diaminobencidina.

DE: Disruptor endocrino.

EROs: Especies reactivas de oxígeno.

FSH: Hormona foliculoestimulante.

GCNIS: Neoplasia in situ de células germinales.

GnRH: Hormona Liberadora de Gonadotropinas.

hCG: Gonadotropina coriónica humana.

HOXA10. Homeobox A10.

IH: índice Histopatológico.

INSL3: Factor similar a la insulina.

LB: Lámina basal.

LH: Hormona luteinizante

MC: Muerte celular.

MT: Microlitiasis.

NANOG: Proteína Homeobox nanog.

NCAM: Moléculas de adhesión neuronal.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PLAP: Fosfatasa alcalina placentaria.

POU5F1: Factor de transcripción 1 del dominio POU clase 5.

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.

RXFP2: Receptor de la familia de relaxina 2.

SALL4: Factor de transcripción de dedos de zinc.

SCF: Factor de células *stem*.

SDT: Síndrome de disgenesia testicular.

SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido.

TCG: Tumor de células germinales.

TSH: Hormona estimulante de la tiroides.

RESUMEN

Introducción. La criptorquidia (CO) o testículo no descendido, es un factor de riesgo para la neoplasia testicular. Se propone que métodos no invasivos como la determinación de microlitiasis (MT) caracterizada por microcalcificaciones en los túbulos seminíferos y las concentraciones hormonales asociadas a células que expresan proteínas de pluripotencialidad, podría considerarse marcadores de riesgo a desarrollo de cáncer. **Objetivo.** Determinar en el testículo de pacientes con CO, las características histopatológicas, la presencia de MT, la expresión de proteínas de pluripotencialidad y el perfil hormonal. **Materiales y métodos.** Se estudiaron 23 niños con CO provenientes del Instituto Nacional de Pediatría. Se obtuvo sangre periférica para determinar las concentraciones de FSH, Inhibina B y estradiol. Durante la orquidopexia se tomó una biopsia testicular para el análisis histológico y la determinación de proteínas de pluripotencialidad (SALL4, AP2 γ , PLAP, c-kit y OCT3/4) por inmunohistoquímica. Se correlacionaron todas las variables mediante una prueba de Pearson ($p < 0.05$). **Resultados.** En todos los pacientes se observó, correlación positiva entre la IH, MT y MC; el número de células germinales la LB y la expresión de SALL4; y el IH y la MT. Se presentó correlación positiva en los pacientes con CO inguinal entre la expresión de SALL4, la MC, MT y el IH. También en los pacientes con CO que presentaron MT en la histología, en las concentraciones de Inhibina B y el grado de MT, edad y MC, edad e IH, LB e IH y SALL4 con la edad. Se pudo observar que, de los 23 pacientes, 8 de ellos que representan el 35% presentaron MT en la histología y 6 de ellos presentaron al menos la expresión de una proteína de pluripotencialidad. Uno de los pacientes mostró la expresión de 4 de 5 proteínas de pluripotencialidad y concentraciones bajas de Inhibina B con concentraciones de hasta 50% más bajas en comparación con varones de la edad. **Conclusión.** Existe una correlación positiva entre la expresión de SALL4 (una proteína de pluripotencialidad) con la MT en los pacientes con CO. Esto apoya la presencia de MT sumado a la CO, como un factor de riesgo de malignidad.

ABSTRACT

Introduction. CO or undescended testicle, is a risk factor for testicular neoplasia. It is proposed that non-invasive methods such as the determination of MT characterized by microcalcifications in the seminiferous tubules and the hormonal concentrations associated with cells expressing pluripotentiality proteins, could be considered markers of cancer development risk. **Objective.** To determine in the testicle of patients with CO, the histopathological characteristics, the presence of MT, the expression of pluripotential proteins and the hormonal profile. **Materials and methods.** 23 children with CO from the National Institute of Pediatrics were studied. Peripheral blood was obtained to determine the concentrations of FSH, Inhibin B and estradiol. During the orchidopexy a testicular biopsy was taken for histological analysis and the determination of pluripotential proteins (SALL4, AP2 γ , PLAP, c-kit and OCT3/4) by immunohistochemistry. All variables were correlated by a Pearson test ($p < 0.05$). **Results.** In all patients a positive correlation between IH, MT and MC was observed; the number of germ cells the LB and the expression of SALL4; and the IH and the MT. There was a positive correlation in patients with inguinal CO between SALL4 expression, MC, MT and IH. Also in patients with CO who presented MT in histology, in the concentrations of Inhibin B and the degree of MT, age and MC, age and IH, LB and IH and SALL4 with age. It was observed that, of the 23 patients, 8 of them representing 35% presented MT in histology and 6 of them presented at least the expression of a pluripotentiality protein. One of the patients showed the expression of 4 of 5 pluripotentiality proteins and low concentrations of Inhibin B with concentrations of up to 50% lower compared to men of the age. **Conclusion.** There is a positive correlation between the expression of SALL4 (a pluripotentiality protein) with MT in patients with CO. This supports the presence of MT added to CO, as a risk factor for malignancy.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1 Síndrome de Disgenesia Testicular

El síndrome de disgenesia testicular (SDT) es un término utilizado clinicopatológico en los últimos años para describir un conjunto de desórdenes reproductivos masculinos que incluyen la criptorquidia (CO), hipospadia, bajo conteo espermático y cáncer testicular (CT) (Skakkebaek et al., 2001).

Se ha propuesto que factores genéticos y medio ambientales tendría un papel fundamental en el SDT, ya que es muy probable que estas afectaciones tengan un origen común en el desarrollo testicular prenatal, por un lado, existen defectos directos en las células de Sertoli que podrían dañar la normal proliferación de las células germinales, además, existe una afectación en la producción de testosterona por las células de Leydig resultando en hipospadias y CO (Virtanen *et al.*, 2007; Abdelhamid *et al.*, 2011; Gurney *et al.*, 2017).

1.2. Criptorquidia

La criptorquidia (CO; OMIM # 219050) o no descenso testicular es la falla de uno o ambos testículos para descender de manera permanente. Es el defecto genitourinario al nacimiento con más frecuencia en varones, es de gran trascendencia debido a su alta frecuencia y a las consecuencias en edad adulta que se pueden derivar de esta enfermedad, como es el tumor testicular y la infertilidad.

1.2.1 Clasificación

La CO puede presentarse en uno o en ambos testículos (unilateral o bilateral) y dependiendo de su posición también es clasificada como abdominal, inguinal y ectópica (Virtanen *et al.*, 2007). Se ha reportado que la CO abdominal tiene un mayor riesgo de desarrollar tumor testicular y reducción del número de células germinales (Cortes *et al.*, 2001; Trussell *et al.*, 2004). De la misma manera, el riesgo se incrementa en pacientes con CO bilateral (Tasian *et al.*, 2009).

1.2.2 Factores etiológicos

En la mayoría de los mamíferos, los testículos descienden de la posición abdominal y se desplazan hacia el escroto. Esta es una posición extracorporal que permite que el testículo se encuentre a una temperatura entre 2 a 4 °C menor que la temperatura corporal, para una normal espermatogénesis (Thonneau *et al.*, 1998; Foresta *et al.*, 2008). El descenso testicular es un evento complejo, mediado por factores genéticos, hormonales y anatómicos, que se relacionan con el desarrollo del gubernáculo, el proceso vaginal, el canal inguinal, los vasos espermáticos y el escroto (Heyns y Hutson *et al.*, 1995). Hutson y Donahoe (1986) propusieron que el descenso testicular se presenta en dos fases morfológicamente distintas denominadas transabdominal e inguinoescrotal, las cuales están cada una reguladas bajo un control hormonal diferente. La etiología del no descenso testicular aún es desconocida, aunque sabemos que se manifiesta en varones con algún tipo de falla en el proceso normal del descenso testicular, lo cual hace que esta patología sea considerada multifactorial (Vigueras *et al.*, 2003; Vigueras *et al.*, 2004; Ashley *et al.*, 2010; Hutson *et al.*, 2013).

1.2.3 Factores genéticos

Actualmente se han reportado ciertas alteraciones en diversos genes, que se sugiere podrían ser responsables de la falla en descenso testicular, tanto en estudios en modelos animales como en humanos, aunque estos resultados han sido inconsistentes. Los genes más estudiados es el factor similar a la insulina (INSL3) y su receptor que pertenece a la familia de los péptidos de relaxina 2 (RXFP2), debido a que se expresan en las células de Leydig (Minagawa *et al.*, 2012; Hutson *et al.*, 2015). Otro gen que se ha asociado con la CO es el Homeobox A10, por sus siglas en inglés (HOXA10) el cual es importante en la organogénesis, durante el desarrollo embrionario y su expresión es predominante en el gubernáculo y el hígado. Los estudios en ratones con CO abdominal y bilateral han demostrado concentraciones bajas de HOXA10, por otro lado, en estudios en humanos se ha observado que en el 11% de los pacientes con CO presentaron variaciones en la secuencia de este gen (Kojima *et al.*, 2009; Massart *et al.*, 2010). En nuestro grupo de investigación

identificamos dos pacientes con CO unilateral las variantes rs1555633 y p.R105R del gen INSL3 en una forma heterocigota asociada con CO, por lo que se podría considerar factores de riesgo para la CO (Hutson *et al.*, 2015; Chávez *et al.*, 2017).

1.2.4 Factores ambientales

Estudios animales, han demostrado que la exposición con productos químicos con efectos estrogénicos o antiestrogénicos como los disruptores endocrinos (DE) tienen un papel en la creciente frecuencia de trastornos de la salud reproductiva, relacionados con el SDT (Virtanen *et al.*, 2007).

La exposición a DE durante la organogénesis se ha relacionado con malformaciones en el tracto genital masculino. Se ha propuesto que el mecanismo de acción de los DE es por la interrupción en la síntesis, transporte, metabolismo, unión, acción o eliminación de hormonas endógenas en el desarrollo embrionario. La exposición fetal a los DE ocurre posiblemente a través de la madre en el embarazo mediante la lactancia y durante la infancia por el consumo de fórmula almacenada en recipientes que contiene estos compuestos (Markey *et al.*, 2002).

Algunos autores han evaluado indirectamente la posible exposición a pesticidas de acuerdo con la región geográfica en la que nació el niño, esta clasificación se ha basado en la intensidad de la industria agrícola en dichas regiones (García-Rodríguez *et al.*, 1996; Carbone *et al.*, 2006) o la proximidad a plantas químicas (Gurney *et al.*, 2017). Se han analizado directamente la presencia de DE en muestras biológicas como líquido amniótico (Toft *et al.*, 2016) leche materna (Main *et al.*, 2007), placenta (Fenichel *et al.*, 2012) y se han analizado directamente la presencia de algunos químicos, sin embargo, la exposición directa a productos químicos DE sigue siendo incierto (Gurney *et al.*, 2017).

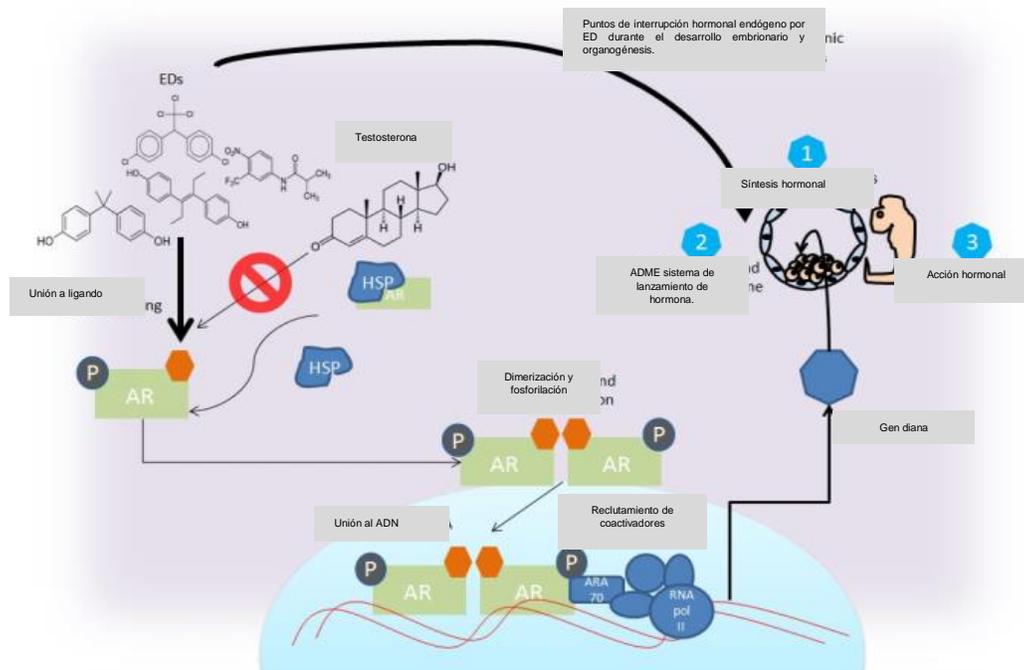


Fig.2. Acción de los disruptores endocrinos (DE) en la producción hormonal endógena, que muestra la competencia de los DE por el sitio de acción en el receptor de andrógenos que pueden cambiar la síntesis, liberación, transporte, metabolismo, unión, acción o eliminación de hormonas endógenas durante el desarrollo embrionario, así como antes, durante o después de la organogénesis. Modificado de Landero-Huerta *et al.*, (2017).

1.2.5 Tratamiento de la CO

En la actualidad no existe un tratamiento hormonal bien definido para la CO. Por un lado, se encuentra el tratamiento hormonal como la gonadotropina coriónica humana (hCG) la cual ha sido usada desde 1930 (Abaci *et al.*, 2013; Ellerkamp *et al.*, 2018) y la Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), aunque sus usos se han convertido en una gran controversia, ya que han demostrado una tasa de éxito que va del 10 al 50%. La poca eficiencia de este tratamiento se ha basado en los dos supuestos que la CO no es causada sólo por una deficiencia del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, sino que también los procesos mecánicos han sido responsables (Rajfer *et al.*, 1986; Rietzen *et al.*, 2007; Thorsson *et al.*, 2007).

El tratamiento principal de la CO consiste en ubicar el testículo en el escroto mediante un proceso quirúrgico, denominado orquidopexia, el cual representa un porcentaje muy bajo de riesgo para el paciente (Kolon *et al.*, 2014). En los varones recién nacidos se recomienda la cirugía durante el primer año de nacimiento (Trussell *et al.*, 2004). El reposicionamiento del testículo en el escroto antes de los 18 meses es de gran importancia debido a que reduce el riesgo del desarrollo de CT y para prevenir problemas de infertilidad (Braga *et al.*, 2017; Gurney *et al.*, 2017; Hildorf *et al.*, 2019; Gupta *et al.*, 2020). Aunque la orquidopexia no reduce del todo el riesgo de CT, puede ser una herramienta de ayuda para la evaluación del testículo (Kolon *et al.*, 2014).

La CO es un factor de riesgo que se han reconocido para el CT, (Gurney *et al.*, 2017) se sabe que pacientes con antecedentes de CO tienen hasta cuatro veces mayor riesgo de padecer CT en comparación con aquellos sin antecedente alguno de CO (Cook *et al.*, 2010; Verkauskas *et al.*, 2018; Grupta *et al.*, 2020) Se ha documentado que la CO podría estar relacionada con las microcalcificaciones testiculares (Shanmungasundaram *et al.*, 2007) y esto podría ser una herramienta importante de valoración funcional del testículo.

1.3 Microlitiasis testicular

La Microlitiasis (MT) es una afección que resulta de un conjunto de microcalcificaciones en los túbulos seminíferos, es una entidad poco estudiada, y fue reportada por primera vez en 1970 en un niño sano de 4 años de edad (Nishiyama *et al.*, 1998; Tan *et al.*, 2011). En los años previos al desarrollo de la ecografía, el diagnóstico se realizaba únicamente con histología, sin embargo, en 1987 se observó la MT utilizando un transductor de alta frecuencia y se describió como “innumerables, pequeños y brillantes ecos dispersos de manera difusa y uniforme en toda la sustancia de los testículos” (Fig. 4) (Doherty *et al.*, 1987).

La incidencia de la MT es desconocida, ya que los pocos estudios que existen, indican información que varía en la población de estudio, las definiciones utilizadas para la MT y los métodos de diagnóstico (Nistal *et al.*, 1979; Winter *et al.*, 2016). Se ha reportado una incidencia de MT en el 0.6% al 9% de los adultos que acuden al médico por dolor

testicular (Rashid *et al.*, 2004; Goede *et al.*, 2009). Por otro lado, algunos estudios realizados con autopsias han encontrado MT en niños prepúberes en el 0.04% a 11.8% de los casos y en varones adultos en el 3% (Shanmugasundaram *et al.*, 2007). Además, se informó en otro estudio que se realizó con 1504 hombres sanos sin ningún síntoma y con una edad de 18 a 35 años, que la MT se presentó únicamente en el 5.6%, teniendo en cuenta que los autores definieron la MT como la presencia de 5 o más focos en el testículo, determinado por ultrasonido (Peaterson *et al.*, 2001). Se ha propuesto que la incidencia puede aumentar con la edad, Goede *et al.*, (2009) informó que, en la población pediátrica sin síntomas, la MT apareció en el 2.4% de pacientes con una edad de entre 0 y 19 años, con un incremento de la incidencia al aumentar la edad del paciente.

El diagnóstico de la MT puede ser histológico o mediante ultrasonido. En muestras histológicas se puede observar dos zonas importantes: a) una zona central totalmente calcificada y b) una zona de fibra de colágeno estratificado de múltiples capas (Shanmugasundaram *et al.*, 2007). El estudio de la progresión de la microlitiasis apoyo a la hipótesis de que el proceso de mineralización ocurre de la siguiente manera: 1) acumulación de residuos celulares en la luz tubular, 2) deposición de anillos concéntricos de glucoproteínas que rodean al núcleo central y 3) calcificación del material laminar de la glicoproteína (Shanmugasundaram *et al.*, 2007; Winter *et al.*, 2016).

Por otro lado, cuando ya existe una calcificación al centro del túbulo de entre 50 y 300 μm , al ser visualizada en un ultrasonido, se puede observar como la aparición de múltiples focos ecogénicos pequeños que carecen de sombra de una manera uniforme en el testículo (Winter *et al.*, 2016). Los dos tipos de diagnóstico (histológico y ultrasonido) han resultado favorables, sin embargo, una evaluación de ultrasonido, no representa medidas agresivas, para pacientes con un mayor riesgo de tumor testicular y criptorquidia.



Fig. 4. Ultrasonido testicular que demuestra la presencia de MT. Tomada de Abdelhamid *et al.*, (2011).

El origen de la MT es desconocido, sin embargo, se han propuesto varias teorías, una de las más aceptadas, es que las células de Sertoli disminuyen su capacidad para fagocitar las células degenerativas y la acumulación de estas células forman la microlitiasis testicular (Shanmugasundaram *et al.*, 2007). Kang *et al.*, (1994) vieron en biopsias testiculares, esta disminución de la capacidad en las células de Sertoli para fagocitar y ellos concluyeron que se debe a la proximidad histológica de GCNIS en los testículos.

La MT se ha asociado con otras afecciones como esterilidad, atrofia testicular, hidrocele, torsión testicular, hipogonadismo, criptorquidia y tumor de células germinales (Shanmungasundaram *et al.*, 2007).

1.4 Cáncer testicular

En los últimos 30 años la incidencia del CT se ha incrementado en diversos países como USA, Canadá, Australia y Nueva Zelanda (Zheng *et al.*, 1996; McGlynn *et al.*, 2005; Purdue *et al.*, 2005; Bray *et al.*, 2006; Jemal *et al.*, 2011), es importante mencionar que la incidencia en las diferentes poblaciones es variable. En México se reportan 8.6 casos por cada 100,000 varones jóvenes y un índice de mortalidad de 1.3 (339 casos) (*International Agency of Research on Cancer (IARC)*, 2008). El GLOBOCAN en el 2012 documenta una incidencia mundial de 2.3 por cada 100,000

varones recién nacidos vivos (rnv), en tanto que en nuestro país esta incidencia es de 9.6 por cada 100,000 rnv (Ferlay *et al.*, 2013).

Las neoplasias malignas testiculares más frecuentes son los tumores de células germinales (TCG; por sus siglas en inglés testicular germ cell tumors), los cuales representan el 95% de todos los casos. En general los TCG se subdividen en seminomas y no seminomas, con una distribución a nivel mundial del 52% al 56% y 44% al 48% respectivamente (McGlynn *et al.*, 2005).

La mayoría de los TCG se originan de una lesión precursora conocida como neoplasia *in situ* de células germinales (GCNIS por sus siglas en inglés), o también conocida como Carcinoma *in situ* testicular (CIS_t). La GCNIS está constituida por células germinales indiferenciadas con aspecto de seminoma que se localiza en la porción basal del tubo seminífero. Se asocia a disminución en la espermatogénesis y los componentes normales son reemplazados por GCNIS. (Hoei-Hansen *et al.*, 2005).

1.4.1 Cáncer testicular y MT

El estudio de la MT ha ido en aumento ya que se ha relacionado con el TCG, sin embargo, aún sigue siendo un tema de controversia, principalmente por las diversas condiciones en los que son realizados los estudios y por la falta de un modelo de laboratorio pertinente para investigación (Tan *et al.*, 2011). La presencia de microlitiasis testicular se ha reportado que confiere aproximadamente un 10% de riesgo de TCG en pacientes con características de síndrome de disgenesia testicular (Tan *et al.*, 2010). En otro estudio también se ha reportado que existe una relación con CT, esto en pacientes remitidos por ecografía escrotal, 48 pacientes (9%) tenía microlitiasis el 27% tenía CT y de los pacientes que no presentaron microlitiasis solo el 8% tenía CT, se concluyó que la MT testicular está altamente asociada con CT (Bach *et al.*, 2001). Ikinger *et al.*, (1982) también encontraron MT en biopsias testiculares en 32 de 43 (74%) tumores testiculares.

1.5 Teoría sobre el origen de la GCNIS

Se sugiere que el origen de la GCNIS es durante el desarrollo embrionario y se propone que los gonocitos son los responsables, debido a la semejanza morfológica entre este tipo celular y la células atípicas características de la GCNIS, además de que comparten el mismo perfil de expresión de proteínas (Nielsen *et al.*, 1974; Skakkebaek *et al.*, 1987; Jorgensen *et al.*, 1995; Chazaud *et al.*, 1996; Rajpert-De Meyts *et al.*, 2003; Looijenga *et al.*, 2003; Honecker *et al.*, 2004; Hoei-Hansen *et al.*, 2005; Pauls *et al.*, 2005; Sonne *et al.*, 2006, Sonne *et al.*, 2009, Hutson *et al.*, 2012; Loebenstein *et al.*, 2019). Los gonocitos son células embrionarias grandes con núcleos prominentes y con uno o dos nucléolos (Baillie 1964; Pauls *et al.*, 2006; Culty *et al.*, 2009). Estas células ocupan el centro de los cordones seminíferos. Sintetizan proteínas (ver tabla 1) que les confieren una capacidad pluripotente, de células indiferenciadas y de sobrevida como el Factor de transcripción 1 del dominio POU clase 5 (POU5F1 por sus siglas en inglés) también llamado OCT3/4 (Zhao y Garbers *et al.*, 2002), el factor de transcripción AP2γ; (TFAP2C por sus siglas en inglés), (Chazaud *et al.*, 1996), la proteína tirosina cinasa (c-KIT por sus siglas en inglés) (Helal *et al.*, 2002), la fosfatasa alcalina placentaria (PLAP por sus siglas en inglés) (Wartenberg *et al.*, 1981), la proteína homeobox nanog (NANOG) (Hoei-Hansen *et al.*, 2005; Rajpert-De Meyts *et al.*, 2006) y el factor de transcripción de dedos de zinc (SALL4, por sus siglas en inglés) este último regula el mantenimiento de la pluripotencialidad y la expresión de NANOG y SOX2 (Tabla 1). Es importante señalar que algunas de estas proteínas se emplean como biomarcadores para el diagnóstico de la GCNIS.

Tabla.1. Descripción y función de las proteínas de pluripotencialidad e indiferenciación.

FACTOR	DESCRIPCIÓN
POU5F1	También llamado OCT-4, es codificado por POU5F1, fue el primer factor de transcripción descrito asociado con la pluripotencialidad y específico para células <i>stem</i> embrionarias (Schöller <i>et al.</i> , 1989). Ha sido detectado en células CGNIS, mantiene las células como “madre” en estado pluripotente y previene la diferenciación.

c-Kit	Es un factor crucial para la supervivencia, proliferación y migración de los gonocitos. La expresión diferencial de c-Kit fue primero descrita en tumor de células germinales por Strohmeyer (Strohmeyer <i>et al.</i> , 1991) y en CGNIS por Rajpert-De Meyts y Skakkebaek <i>et al.</i> , 1993 seguido de varios estudios más (Izquierdo <i>et al.</i> , 1995; Strohmeyer <i>et al.</i> , 1995; Bokemeyer <i>et al.</i> , 1996). La expresión es gradualmente reducida con la edad y puede mantener la supervivencia de células indiferenciadas. Se ha propuesto que su expresión puede contribuir al desarrollo neoplásico por prolongar la supervivencia de células indiferenciadas (Stoop <i>et al.</i> , 2008).
AP-2γ	El factor de transcripción activador de la proteína 2 es un gen involucrado en la supervivencia de células germinales inmaduras (Hoei-Hansen <i>et al.</i> , 2004). Se expresa en gonocitos fetales y células germinales neoplásicas incluyendo CGNIS (Rajpert-De Meyts <i>et al.</i> , 2006).
PLAP	Ha sido utilizado para el diagnóstico de la CGNIS Y TCG. Algunos estudios han demostrado su expresión en seminomas y no seminomas (Biermann <i>et al.</i> , 2006).
VASA	Es un gen que codifica para DEAD-box RNA helicasa, está presente en células germinales humanas a través de su desarrollo y maduración (Castrillon <i>et al.</i> , 2000, Honecker <i>et al.</i> , 2004) y también se expresa en CGNIS y en tumores que retienen su morfología como células germinales, tales como seminoma testicular (Zeeman <i>et al.</i> , 2002).
NANOG	También conocido como ENK, es un factor de transcripción que se expresa en células pluripotentes, en células <i>stem</i> y germinales embrionarios. Se requiere para el mantenimiento de la pluripotencialidad de las células y mantiene la pluripotencialidad de forma dosis dependiente (Yamaguchi <i>et al.</i> , 2005). Se sugiere que la transcripción de NANOG es controlada por acción sinérgica de SOX y OCT3/4. Su expresión en humano es alta, a las 14 semanas de gestación y se regula a la baja. A los 3 a 4 meses postnatales aún se expresa, aunque en baja proporción (Hoei-Hansen <i>et al.</i> , 2005; Klstensen <i>et al.</i> , 2008).
SALL4	Es un factor de transcripción de dedos de zinc que juega un papel muy importante en el mantenimiento de la pluripotencialidad y su expresión ha sido reportada previamente en casos de tumor de células germinales extragonadales (Wang <i>et al.</i> , 2009) y ha sido reportado como un marcador específico y altamente sensible para GCNIS (Cao <i>et al.</i> , 2009).

En humanos sanos los gonocitos inician su diferenciación a espermatogonias durante el segundo al tercer trimestre de la gestación y concluyen en los primeros meses postparto (Paniagua y Nistal *et al.*, 1984; Culty *et al.*, 2009). Durante este periodo las proteínas de pluripotencialidad y de células indiferenciadas se regulan a la baja hasta su total desaparición alrededor de los cuatro meses de edad en humanos (Jorgensen *et al.*, 1995, Pesce *et al.*, 1998; Robinson *et al.*, 2001; Gaskell *et al.*, 2004; Honecker *et al.*, 2004; Stoop *et al.*, 2005; Hoei-Hansen *et al.*, 2005; Culty *et al.*, 2009).

La falta de diferenciación de los gonocitos, que se sugiere en pacientes con criptorquidia, hace pensar que estas células se mantienen vivas, indiferenciadas y con capacidad de pluripotencialidad, lo cual podría hacerlos susceptibles al desarrollo de la GCNIS.

1.6. Factores de diferenciación y pluripotencialidad

Estudios realizados en modelos animales documentan que la diferenciación es gracias al aporte de factores producidos por las células de Sertoli, como el factor de células *stem* (SCF por sus siglas en inglés) (Yamamoto *et al.*, 1993; Yasuda *et al.*, 1993; Robinson *et al.*, 2001), las cadherinas de hipófisis y hueso de tipo corto (Wu *et al.*, 2005), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF por sus siglas en inglés) (Wang y Culty *et al.*, 2007; Basciani *et al.*, 2008) y el ácido retinoico (AR) (Wang y Culty *et al.*, 200; Zhou *et al.*, 2008), así como las moléculas de adhesión celular neuronal (NCAM por sus siglas en inglés). Ya que estos factores de diferenciación son aportados por las células de Sertoli funcionales, un parámetro que permite determinar el funcionamiento adecuado de estas células es la concentración de inhibina B circulante (Anawalt *et al.*, 1996).

La inhibina B es una hormona detectada únicamente en el macho (Illingworth *et al.*, 1996), es una glicoproteína de la superfamilia de factores de crecimiento transformante, (Meachem *et al.*, 2001; Lahlou y Roger *et al.*, 2004). En los niños sanos de 2 a 3 meses de edad existe un incremento en las concentraciones de Inhibina B circulante, la cual permanece elevado por encima de las concentraciones de FSH, LH y testosterona (Raivio *et al.*, 1997; Andersson *et al.*, 1998) durante el periodo

denominado minipubertad. Las concentraciones de FSH, LH y testosterona disminuyen después de este periodo, sin embargo, la Inhibina B permanece (Kollin *et al.*, 2012) y se eleva durante la pubertad por el estímulo de la FSH y el inicio de la espermatogénesis (Meachem *et al.*, 2001; Lahlou y Roger *et al.*, 2004; Kuiri-Hänninen *et al.*, 2019).

Se considera que el desarrollo fetal alterado del testículo y de sus células como las de Sertoli y Leydig pueden ser factores importantes para el riesgo de desarrollo de patologías testiculares futuras en el humano que se incluyen dentro del SDT como la criptorquidia, la hipospadia, el CT y la infertilidad (Skakkebaek *et al.*, 2001). El desarrollo prenatal anormal puede determinar la función testicular postnatal.

En modelos animales se ha demostrado que la exposición a un DE como el ftalato di(n-butil) genera animales con SDT acompañados de alteraciones en las concentraciones de Inhibina B (Hutchison *et al.*, 2008). El desarrollo testicular alterado también se refleja en las concentraciones hormonales séricas de FSH, LH testosterona e inhibina B posterior al nacimiento (Coughlin *et al.*, 1999; Lee y Coughlin *et al.*, 2001).

Recientemente nuestro grupo de trabajo mediante técnicas de inmunohistoquímica y RT-PCR la presencia de las proteínas POU5F1, c-Kit, PLAP, AP2 γ y SALL4 y demostró que en el 21.8% de los pacientes se expresaron dichas proteínas, esto más allá de su periodo normal de diferenciación, es decir, en pacientes mayores a los 12 meses de edad (Fig. 3). Estas proteínas características del desarrollo embrionario y fetal mantienen a las células como indiferenciadas y con capacidad de pluripotencialidad evitando su muerte, lo que las hace susceptibles a su malignización, la sola presencia de unas cuantas células con estas características son blancos de malignidad (Stop *et al.*, 2008). Se proponen que el GCNIS se origina de las células germinales fetales que residen latentes en el testículo, hasta que inician la proliferación después de la pubertad por activación del eje hipotálamo-hipófisis-testículo (Oosterhuis *et al.*, 2005). Esto genera que inicie un lento incremento en el volumen testicular posterior a la pubertad llevando al diagnóstico tardío alrededor de los 25 a los 35 años (Skakkebaek *et al.*, 1982; Liu *et al.*, 1999).

Existen reportes en donde se demuestra que, en patologías como la disgenesia gonadal, el tejido testicular indiferenciado que mostró positividad a proteínas como POU5F1, c-Kit y PLAP durante la niñez, incrementan su posibilidad de desarrollar tumor gonadal en etapas posteriores (Stoop *et al.*, 2008).

Otros argumentos a favor del papel de las proteínas de pluripotencialidad son los siguientes: POU5F1 está presente en la GCNIS, gonadoblastoma, seminoma, germinoma, disgerminoma y en el carcinoma embrionario relacionado a su capacidad pluripotente (Skakkeback *et al.*, 1982; Palumba *et al.*, 2002). La expresión de esta proteína fue descrita por primera vez en un tumor de células germinales por Strohmeyer *et al.*, 1991 y en la GCNIS (Rajpert De Meyts y Skakkebaek *et al.*, 1993). c-Kit también está presente en tumores invasivos (Rajpert de Meyts *et al.*, 1996; Sakuma *et al.*, 2003; Biermann *et al.*, 2007, Stoop *et al.*, 2008). El gen c-Kit ha sido descrito como un blanco del factor de transcripción AP2 γ , característico de la sobrevivencia de células indiferenciadas (Yamamoto *et al.*, 1993, Yasuda *et al.*, 1993), por tanto, la expresión prolongada de AP2 γ y la activación permanente de c-Kit puede tener efectos sobre la transformación maligna al incrementar la sobrevivencia de las células germinales inmaduras y detener la diferenciación hacia las células germinales.

Con respecto a la PLAP se conoce su presencia en pacientes con seminoma, carcinoma de ovario y carcinoma pancreático, entre otros (Ehrmeyers *et al.*, 1978). Se ha demostrado que una vez diagnosticado la GCNIS, el 50% de los pacientes desarrollarán seminoma en los siguientes 5 años y el 70% lo desarrollarán en 8 años (VonDerMaase *et al.*, 1986).

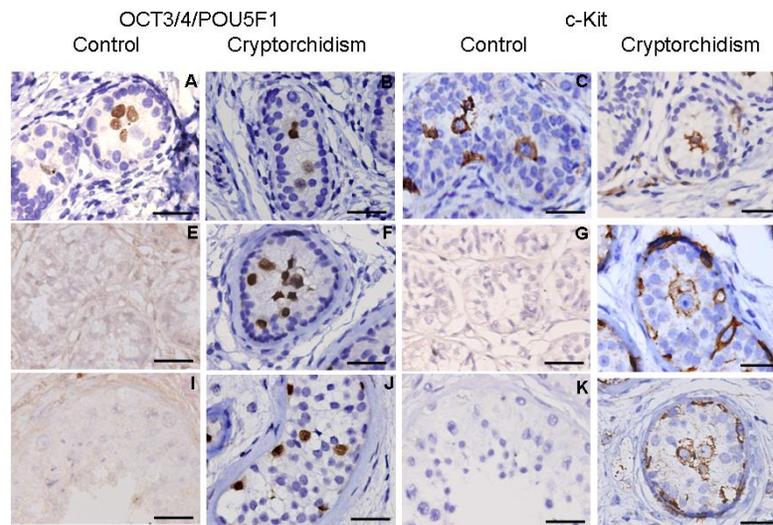


Fig. 3. Se muestra la inmunoreactividad a las proteínas de pluripotencialidad en los tubos seminíferos de pacientes y niños control de diferentes edades. A-D recién nacidos a 23 meses; E-H de 24 meses a 10 años; I-L de 11 a 16 años. Tomado de Viguera *et al.*, 2015.

1.6 Pertinencia de la biopsia testicular

Para los niños con criptorquidia, la biopsia testicular, es una herramienta muy valiosa que ayuda a predecir la fertilidad futura, la selección para terapia hormonal post-orquidopexia y para detectar la presencia de la GCNIS (Nakane *et al.*, 2005). La biopsia testicular de rutina en niños con criptorquidia permanece controversial, por el supuesto daño al testículo (Nistal y Paniagua, 1999). Esto ha generado el interés por tratar de reemplazar la biopsia con otras técnicas (perfil hormonal, volumen testicular) que proporcionen información indirecta relacionada al estado del parénquima testicular. Sin embargo, estos métodos indirectos no aportan información suficiente para explicar lo que ocurre en el testículo.

Los riesgos de la toma de biopsia que se proponen son sangrado, infección, atrofia o reducción del volumen testicular y reacción antigénica contra los gametos. Los beneficios incluyen la predicción del análisis de semen futuro e identificación de la

GCNIS. Los datos han demostrado que los beneficios sobrepasan los riesgos (Patel *et al.*, 2005).

Se han realizado estudios para determinar la seguridad de la biopsia testicular en humanos y en modelos animales. Las investigaciones experimentales de Nakane *et al.*, (2005) demuestran que la espermatogénesis, la apoptosis y la fertilidad de ratones maduros no se afecta por la biopsia testicular prepuberal. En otro estudio, Patel *et al.*, (2005) incluyeron 112 niños a quienes se les había practicado la orquidopexia y biopsia testicular bilateral; ellos encontraron que la biopsia testicular abierta prepuberal no incrementó la tasa de microlitiasis considerando que estas estructuras histológicas pueden ser un marcador de disfunción testicular que predispone a degeneración o a procesos de malignidad (Furness *et al.*, 1998); y ningún paciente mostró evidencia de reacción antigénica contra células germinales, tampoco reportaron evidencias de daño testicular adicional asociado con la biopsia testicular efectuada en la orquidopexia. En este mismo estudio la microlitiasis fue encontrada únicamente en 2 de 29 biopsias (6.9%) en testículos intrabdominales.

En otros estudios tampoco se encontró reacción antigénica en 25 hombres en quienes realizaron biopsia testicular y orquidopexia bilateral (Cortes *et al.*, 1990). Estos resultados concuerdan con los de Patel *et al.*, (2005), quienes no detectaron evidencia de que la biopsia testicular prepuberal produjera la formación de anticuerpos que pudieran afectar la fertilidad futura. Moller *et al.*, (1998) reportaron 830 pacientes con 1026 biopsias testiculares en los que encontraron que la frecuencia de malignidad testicular se incrementaba 2 veces en los testículos no descendidos tratados con orquidopexia y biopsia testicular, comparado con un incremento de 4 veces en los que no se realizó la biopsia. Ellos concluyen que la biopsia testicular al momento de la orquidopexia no incrementa el riesgo de neoplasia.

Se recomienda la biopsia testicular en el período prepuberal ya que en esta etapa aún no se ha formado la barrera hematotesticular. La formación de la barrera hematotesticular genera un medioambiente privilegiado, inmunológicamente necesario

para mantener la espermatogénesis sin que las espermatidas, como células haploides con distinta información genética y distinta al resto del cuerpo, sean reconocidas como extrañas (Cortés *et al.*, 1990).

La barrera hematotesticular está integrada por las células mioides que recubren a los tubos seminíferos, a la lámina basal y principalmente a las uniones estrechas entre las células de Sertoli que impiden el paso de cualquier partícula hacia el compartimento interno de los tubos seminíferos a fin de proteger a las células que llevan a cabo la meiosis (Fig. 5). Esta barrera completa su formación en la etapa puberal al inicio de la espermatogénesis (Furuya *et al.*, 1978).

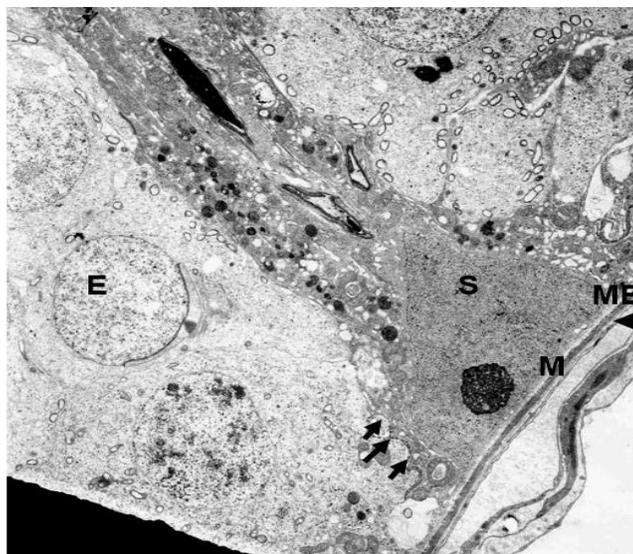


Fig. 5. Ultraestructura del epitelio seminífero en donde se muestran los componentes de la barrera hematotesticular como son las células mioides (M), la membrana basal (MB) y las uniones estrechas (flecha) entre las células de Sertoli (S) con la finalidad de proteger a las células germinales en meiosis o que concluyeron con este proceso como las espermatidas (E). Tomado de Viguera *et al.*, 2004.

En niños púberes con criptorquidia, esta barrera se encuentra alterada debido a la reducción de las células de Sertoli diferenciadas, resultando en pocas uniones estrechas en el epitelio seminífero (Lui *et al.*, 2003). Una alteración en esta barrera puede resultar en formación de anticuerpos dirigidos contra los espermatozoides. Sin

embargo, en niños prepúberes en quienes aún no se ha formado la barrera, la biopsia no altera o genera anticuerpos ya que aún no están presentes las espermátidas.

Cabe mencionar que, en los últimos años, diversos institutos de investigación de alto reconocimiento en distintos países como Suiza, Estados Unidos de Norteamérica, Dinamarca, Inglaterra, Egipto, España entre otros, han llevado a cabo la toma de

biopsia en niños con criptorquidia, apegados a protocolos de investigación (Rusnack *et al.*, 2003; Nistal *et al.*, 2007; Tasian *et al.*, 2009; AbouZeid *et al.*, 2011; Bader *et al.*, 2011; Dalgaard *et al.*, 2012; Dohle *et al.*, 2012; Kollin *et al.*, 2012; Kraft *et al.*, 2012; Thorup *et al.*, 2012).

1.7 Regulación hormonal

En los pacientes con CO se ha podido observar concentraciones hormonales diferentes al de los niños sanos (Braga *et al.*, 2015), por lo que se propone que las concentraciones hormonales (Inhibina B, FSH y estradiol) podrían ser un marcador sérico confiable y que no implique ningún riesgo directo al testículo. Estas concentraciones podrían identificar aquellos pacientes con alguna disfunción testicular con riesgo de GCNIS y poder establecer un correcto programa de seguimiento personalizado.

1.7.1 Inhibina B

La Inhibina B es una hormona glucoproteica heterodimérica que pertenece a la superfamilia de factores de crecimiento β (Braga *et al.*, 2015). La Inhibina B es la principal hormona gonadal peptídica en hombres que refleja la funcionalidad de las células de Sertoli (Cristiansen *et al.*, 2002). En el primer año de vida se da un aumento en las concentraciones de Inhibina B, esto se debe a la activación del eje-hipotálamo-hipófisis-testículo y refleja la actividad proliferativa de las células de Sertoli, las cuales son capaces de producir las dos subunidades (α y β) (Skakkebaek *et al.*, 2001) mientras que, en la edad adulta, se puede producir directamente en células germinales (Main *et al.*, 2006).

En algunos trabajos se ha observado que existe una disminución en las concentraciones de Inhibina B en niños con CO en comparación con niños sanos (Andersson *et al.*, 1998; Hildfor *et al.*, 2019). También se ha reportado que la CO bilateral presentan aún, contracciones más bajas que los pacientes con CO unilateral. Hamdi *et al.*, (2017) realizaron un estudio en donde evaluaron las concentraciones de Inhibina B en 27 niños con CO bilateral y unilateral, ellos observaron que las concentraciones de Inhibina B resultaron más bajas en los niños con CO en comparación con el grupo control, especialmente en CO bilateral. También se ha propuesto que las concentraciones Inhibina B en pacientes con CO podrían estar relacionadas con la funcionalidad del epitelio germinal y, por ende, en las funciones de las células de Sertoli, quienes son de gran importancia para la diferenciación de Gonocitos a espermatogonias, ya que proporcionan diversos factores de diferenciación, de igual manera, se ha observado una correlación directa entre el número de células de Sertoli en túbulos cortados transversalmente y las concentraciones de Inhibina (Hildfor *et al.*, 2019), esto es de gran importancia, ya que las concentraciones de esta hormona en pacientes con CO podría ser un indicador de alguna afección directa en el testículo.

1.7.2 Hormona Folículo estimulante (FSH)

La FSH, es un miembro de hormonas glucoproteicas que incluyen la Hormona Luteinizante (LH) y la hormona estimuladora de la tiroides (TSH). En niños de 3 meses de edad, la activación temprana del eje hipotálamo-hipófisis-testículo resulta en un incremento de Inhibina B, los cuales permanecen elevados durante 15 meses aproximadamente, mientras que FSH y LH disminuye (Raivio *et al.*, 1997; Christiansen *et al.*, 2002; Kuirri-Hänninen *et al.*, 2019). Por otro lado, las concentraciones de Inhibina B en niños prepúberes aumenta después de un aumento en las concentraciones de FSH (Young *et al.*, 2000), lo puede sugerir que esta hormona podría estimular y caracterizar el estado de las células de Sertoli, ya que se ha detectado que en pacientes con CO resulta en una disminución en las concentraciones de FSH (Suomi *et al.*, 2006). La Inhibina se produce bajo la estimulación con FSH, sin embargo, el

papel real de esta relación en el desarrollo de la función normal del testículo aún no está bien establecido (Esposito *et al.*, 2018) y podría ser una herramienta confiable para evaluar el grado de daño que existe en testículos de pacientes con CO.

1.7.2 Estradiol

El papel de los estrógenos en la función testicular ha sido un tema de gran importancia en los últimos años. El estradiol puede ejercer su efecto sobre receptores de membrana, que a través de segundos mensajeros acoplados a proteínas G pueden activar algunas proteínas inhibitoras de la apoptosis (Alberts *et al.*, 2010). Hay evidencias que sugieren que la exposición elevada del feto masculino a estrógenos aumenta la incidencia de CO. De hecho, se propuso en la “hipótesis del estrógeno”, que el aumento de la exposición en el útero a los estrógenos puede estar relacionado con el incremento en la incidencia de trastornos de la salud reproductiva masculina (Shakkebaek *et al.*, 1991).

Se ha propuesto que el aumento en las concentraciones de estradiol daña de alguna manera al gonocito y que, aunque cuente con los factores necesarios para su diferenciación a espermatogonia, este no responda a tales efectos y mantenga la expresión de proteínas de pluripotencialidad (O'Donnell *et al.*, 2001; Kristensen *et al.*, 2008). Otra propuesta ha sido que el estradiol daña directamente a las células de Sertoli, lo que ocasiona que no envíe los factores necesarios para que los gonocitos puedan diferenciarse a espermatogonia (Kristensen *et al.*, 2008)

2.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La CO es el defecto congénito al nacimiento más frecuente en humanos y el factor de riesgo mejor documentado para neoplasia testicular. Se ha propuesto al gonocito como el responsable del desarrollo del seminoma, y se menciona que este tipo celular se mantiene indiferenciado en los pacientes con CO desde etapas fetales con susceptibilidad a su malignización. Recientemente nuestro grupo de trabajo demostró

mediante técnicas de inmunohistoquímica y RT-PCR, la presencia de las proteínas POU5F1, c-Kit y PLAP, SALL4 y AP-2 γ en el 21.8% de los pacientes con criptorquidia, más allá de su periodo normal de diferenciación, es decir, en pacientes mayores a los 24 meses. Incluso se diagnosticó en dos de los pacientes la GCNIS, ya que estas proteínas son consideradas como biomarcadores diagnósticos de esta patología. Esto apoya la idea de los gonocitos latentes como los posibles responsables del desarrollo de la GCNIS.

Se propone que los DE pueden alterar en las células de Sertoli del feto y por ende la producción de factores de diferenciación de gonocitos. Estos DE pueden modificar las concentraciones de gonadotropinas, esteroides y la inhibina B aún después del nacimiento. También se ha propuesto que puede existir una afectación directa para fagocitar células degenerativas en Sertoli y esto produce la formación de calcificaciones intratubulares que forman MT testicular, y en la cual se ha reportado una asociación directa con TCG. La MT, puede diagnosticarse con métodos no invasivos como ultrasonido. Con base en esto, es probable que los niños en quienes se presente una expresión aberrante de proteínas de pluripotencialidad en las gónadas, muestren también alteraciones en las concentraciones de inhibina B, y si además presentan la MT, esto reflejaría el estado funcional de las células de Sertoli, indispensable para la diferenciación de los gonocitos.

Por lo tanto, identificar en pacientes con CO, las concentraciones hormonales, la presencia de MT y las características histopatológicas del testículo y su relación con la expresión de proteínas de pluripotencialidad testicular es de suma importancia, pues esto podría permitir en un futuro, hacer un diagnóstico de riesgo temprano y manejo oportuno del paciente con criptorquidia con la determinación de un perfil hormonal con ayuda de una muestra sanguínea y con un ultrasonido para determinar la presencia de MT.

3.0 JUSTIFICACIÓN

El TGCT tienen a la GCNIS como precursor común (Skakkebaek *et al.*, 1987). La GCNIS se desarrolla como una malignidad invasiva en el 70% de los casos en 7 años y presumiblemente en todos los pacientes en periodo mayor de tiempo (Giwerzman y Skakkebaek 1993). La GCNIS puede ser tratada exitosamente con una baja dosis de radioterapia u orquiectomía unilateral. Este manejo previene la progresión de la GCNIS a un tumor de células germinales testiculares invasivo y muy probablemente hasta la cura del paciente (Giwerzman y Skakkebaek 1993). Esto evita la quimioterapia adyuvante y la radioterapia y el riesgo de desarrollar complicaciones a largo plazo como enfermedades cardiovasculares, fibrosis pulmonar, nefrotoxicidad y malignidad secundaria. Por lo tanto, es indispensable proponer técnicas para la detección temprana de la GCNIS.

En este trabajo nos propusimos encontrar una relación entre las concentraciones hormonales previas a la orquidopexia, presencia de proteínas de pluripotencialidad, alteraciones histológicas y la microlitiasis, lo que sugiere hacer al testículo susceptible a la malignidad. Si

esta relación existe, se permitirá en un futuro, identificar a pacientes de riesgo con métodos no invasivos.

Hasta el momento no se ha realizado algún estudio que permita relacionar la MT, las concentraciones hormonales de FSH, estradiol e inhibina B con la expresión de proteínas de pluripotencialidad como: SALL4, OCT3/4, c-Kit, PLAP y AP-2 γ y las alteraciones histológicas en células germinales testiculares que permitan proponer marcadores de riesgo o de diagnóstico temprano de la GCNIS en patologías con mayor riesgo de desarrollar cáncer testicular.

4.0 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe correlación entre las concentraciones hormonales, la MT, la expresión de proteínas de pluripotencialidad y las alteraciones histológicas testiculares en pacientes con criptorquidia?

5.0 OBJETIVO GENERAL

Determinar la correlación entre las concentraciones hormonales y la MT, las proteínas de pluripotencialidad y las alteraciones histológicas testiculares en pacientes con criptorquidia.

6.0 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar en pacientes con criptorquidia:

- Características clínicas relevantes de los pacientes con CO incluidos como edad, ubicación de los testículos y bilateralidad.
- El perfil hormonal (Inhibina B, FSH y estradiol)
- Las alteraciones histológicas testiculares.
- La presencia de MT.
- La expresión de proteínas de pluripotencialidad.

7.0 HIPÓTESIS

Existe correlación entre las concentraciones hormonales, presencia de MT, la expresión de proteínas de pluripotencialidad y cambios histológicos testiculares como foco de malignidad en pacientes con criptorquidia.

8.0 MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Criterios de inclusión:

- 1.-Pacientes con criptorquidia (uni o bilateral, inguinal o abdominal) clínicamente diagnosticada por 2 médicos distintos en 2 consultas distintas.

2.-Pacientes de entre 1 y 8 años de edad.

8.2 Criterios de exclusión:

1.-Pacientes con criptorquidia secundaria a procedimientos quirúrgicos previos.

2.- Pacientes con criptorquidia con orquidopexia.

3.-Pacientes con testículo retráctil o dudosamente criptorquídico.

4.-Paciente con tratamiento hormonal.

5.- Tejido testicular mal fijado o que no permita visualizar la estructura testicular y/o negativo a vimentina, un marcador constitutivo celular que permite evaluar la integridad y conservación del tejido.

8.3 Estrategia Experimental

Se estudiaron 23 niños con criptorquidia de entre 1 y 8 años de edad, provenientes de la consulta externa de los departamentos de Cirugía general y Urología, del Instituto Nacional de Pediatría. Antes de la cirugía se obtuvo una muestra de sangre periférica para la evaluación de concentraciones hormonales, posteriormente se realizó la orquidopexia y se obtuvo la biopsia testicular. Esto lo llevo a cabo el médico cirujano urólogo del Instituto, biopsia se utilizó para la determinación de la expresión de proteínas de pluripotencialidad y la caracterización histológica (figura 3). La susceptibilidad se determinó por la presencia de células con expresión de proteínas de pluripotencialidad, ya que estas proteínas son consideradas biomarcadores junto a las alteraciones histológicas descritas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), para el diagnóstico de la GCNIS (Stoop *et al.* 2008).

Este proyecto fue aprobado por los comités de ética, investigación y bioseguridad (04/2014 y 01/2016) del Instituto Nacional de Pediatría y conto con el apoyo del CONACyT (272641). Se obtuvo para todos los pacientes el consentimiento firmado por los padres previo a la obtención de tejidos (Anexo 1).

Diseño Experimental

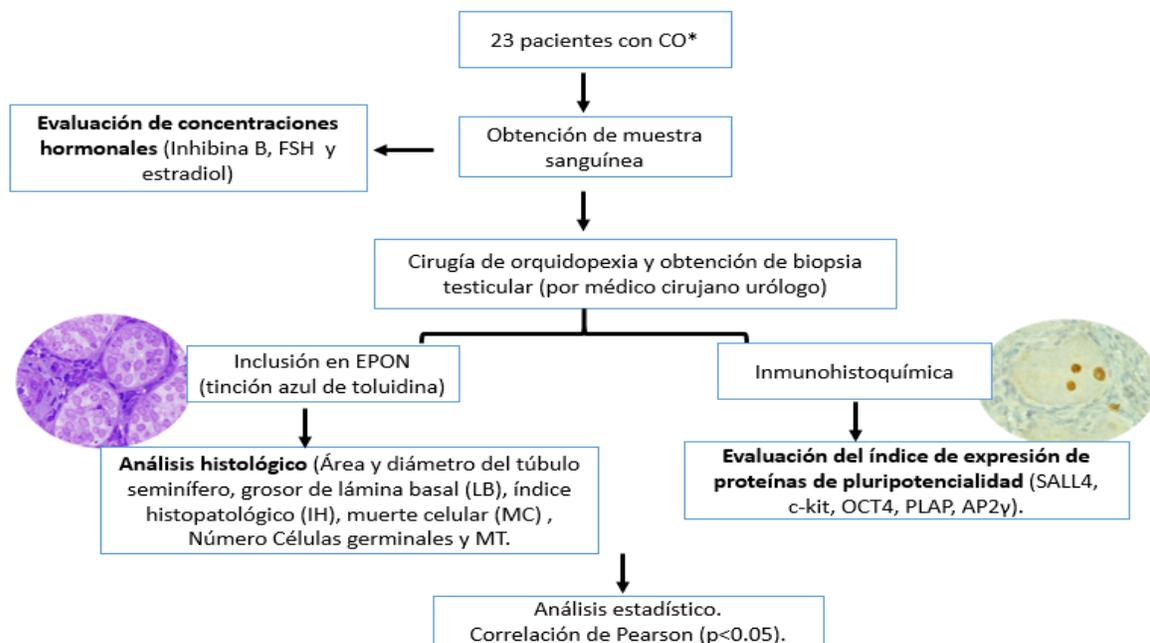


Fig. 6. Diseño experimental.

8.4 Obtención de muestras biológicas.

8.4.1 Determinación sérica de Inhibina, FSH y estradiol.

Se obtuvieron de 5 a 7 ml de sangre periférica y se colectaron en tubos BD Vacutainer estériles para suero. La sangre se dejó a temperatura ambiente durante 2 horas. El plasma obtenido se centrifugó para eliminar células sanguíneas, para esta técnica se requirió de 100µl de suero por paciente y con el duplicado fue necesario un total de 200µl para cada hormona, por lo tanto, con 1.0 ml de sangre para la determinación fue suficiente para cada hormona.

La determinación de FSH, estradiol y la Inhibina B se llevó a cabo mediante KIT`s de radioinmunoanálisis (Phoenix pharmaceuticals Inc., Belmont CA, RK035-27) por parte de la empresa Procesos Sistematizados de Medición y todo el procedimiento estuvo apegado a las instrucciones de los fabricantes.

8.4.2 Biopsia testicular

La biopsia de testículo se obtuvo en el mismo tiempo quirúrgico de la orquidopexia con el propósito de corregir la criptorquidia. Una vez expuesto el testículo previamente se colocaron puntos de sutura para la fijación del mismo a la bolsa escrotal, como se lleva a cabo de manera rutinaria. En este momento, se tomó la biopsia mediante una incisión sobre la túnica albugínea de alrededor de 0.5 cm, seccionando con bisturí una cuña de parénquima testicular, la cual una parte fue fijada en paraformaldehído al 4% para su procesamiento e inclusión en parafina; y otra parte de la biopsia, se fijó en solución de Karnovski para su procesamiento e inclusión en EPON. Posteriormente se realizó el cierre de la túnica albugínea con sutura absorbible 4-0 (Dohle *et al.*, 2012). A partir de este momento, se continuó con la técnica habitual de orquidopexia.

8.5 Análisis morfológico

Una vez que se realizó la inclusión en EPON de las biopsias testiculares se obtuvieron cortes semifinos de 1µm de grosor, que fueron teñidos con azul de toluidina al 0.5% y se montaron en porta objetos para su estudio.

El análisis histológico se realizó por un solo observador auxiliándose del microscopio óptico. Por cada paciente se observaron 20 secciones transversales de tubos seminíferos y se determinaron las siguientes variables:

- a) El número de gonocitos, identificados por su morfología y el número de espermatogonias en cordones/tubos cortados transversalmente. Esto considerando que la persistencia de los gonocitos en los cordones seminíferos, con ausencia en su diferenciación a espermatogonia, es el factor de riesgo propuesto para el desarrollo de la neoplasia ya que este tipo celular conserva su pluripotencialidad.
- b) El área y diámetro del epitelio seminífero mediante un sistema de análisis de imágenes (Image-Pro 5.1) evaluando únicamente cortes transversales de los tubos. La atrofia del epitelio seminífero es un patrón histológico característico de la GCNIS y que se refleja en el área epitelial.

- c) El grosor de la lámina basal, ya que se ha descrito un aumento en el grosor de la lámina basal en pacientes con criptorquidia y con GCNIS.
- d) El índice histopatológico (IH) (anexo 2).
- e) La cantidad de muerte celular por túbulo seminífero (anexo 3)
- f) La clasificación del espermatogénesis por túbulo (anexo 4).
- g) El grado de presentación de la microlitiasis (anexo 5).

8.6 Inmunohistoquímica

La otra parte de la biopsia testicular se utilizó para la inclusión en parafina, en las cuales se evaluó la susceptibilidad por la presencia de células con expresión de proteínas de pluripotencialidad (AP-2 γ , OCT3/4, SALL4, c-Kit y PLAP), utilizando anticuerpos primarios y continuando con un sistema de avidina-biotina y diaminobencidina (DAB) para hacer evidentes los sitios en donde se une el anticuerpo. Se realizaron cortes de 4 μ m de grosor y fueron colocados en portaobjetos con poly-L-lisina (SIGMA, México). Seis secciones de cada testículo fueron colectadas. Las laminillas fueron desparafinadas e hidratadas. La actividad de la peroxidasa endógena fue bloqueada con H₂O₂ al 1% en metanol durante 30 minutos. Se continuó con lavados en agua destilada. Las laminillas fueron incubadas en solución de tritón X-100 durante 10 minutos y fueron bloqueadas con albúmina sérica bovina al 1% en buffer de fosfatos (PBS) durante 2 horas e incubadas toda la noche con el anticuerpo primario correspondiente. Posteriormente las secciones fueron lavadas con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con HRP, (Santa Cruz, Biotechnology, USA) las laminillas fueron lavadas en PBS. En ambos casos, el sitio de unión del anticuerpo se demostró utilizando DAB. Todas las incubaciones se realizaron en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Las laminillas fueron contrastadas con hematoxilina, deshidratadas, aclaradas y montadas. La integridad y conservación del tejido se verificó por la reacción a la vimentina, una proteína estructural. El índice de inmunoreactividad se determinó en secciones transversales y el número de células positivas a las diferentes proteínas. Se realizaron cortes de 4 μ m de grosor y fueron

colocados en portaobjetos con poly-L-lisina (SIGMA, México). Seis secciones de cada testículo fueron colectadas. Las laminillas fueron desparafinadas e hidratadas. La actividad de la peroxidasa endógena fueron bloqueada con H₂O₂ al 1% en metanol durante 30 minutos. Se continuó con lavados en agua destilada. Las laminillas fueron incubadas en solución de tritón X-100 durante 10 minutos y fueron bloqueadas con albúmina sérica bovina al 1% en buffer de fosfatos (PBS) durante 2 horas e incubadas toda la noche con el anticuerpo primario correspondiente. Posteriormente las secciones fueron lavadas con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con HRP, (Santa Cruz, Biotechnology, USA) las laminillas fueron lavadas en PBS. En ambos casos, los sitios de unión del anticuerpo se demostraron utilizando DAB. Todas las incubaciones se realizaron en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Las laminillas fueron contrastadas con hematoxilina, deshidratadas, aclaradas y montadas. La integridad y conservación del tejido fue verificada por la reacción a la vimentina, una proteína estructural. El índice de inmunoreactividad se determinó en secciones transversales y el número de células positivas a las diferentes proteínas fueron cuantificado en relación al número total de células germinales por cordón/tubo seminífero. Un total de 50 cordones/tubos seminíferos fueron evaluados por paciente.

Tabla 2. Anticuerpos empleados para detectar Gonocitos pluripotenciales e indiferenciados.

ANTICUERPO	CARACTERÍSTICAS
OCT3/4	Anticuerpo monoclonal hecho en ratón y dirigido contra los aminoácidos 1-134 de la proteína (sc-5279).
c-Kit	Anticuerpo monoclonal hecho en ratón dirigido contra el amino terminal del receptor (sc-70457).
PLAP	Anticuerpo policlonal hecho en ratón y dirigido contra los aminoácidos 18-317 del amino Terminal de la proteína (sc-1666261).
SALL4	Anticuerpo monoclonal hecho en ratón y dirigido contra los aminoácidos 1017-1053 de en el carboxilo terminal de SALL4 (sc-101147).

AP-2 γ	Anticuerpo monoclonal hecho en ratón y dirigido contra los aminoácidos 183-219 de la región interna (sc-12762).
Vimetina	Anticuerpo monoclonal hecho en ratón y dirigido contra los aminoácidos 429-438 cerca del C-terminal (sc-6260).

8.7 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se diseñaron tablas para la captura de todos los datos de los pacientes en las que se concentraron los resultados de todas las variables estudiadas en este trabajo (concentraciones de cada una de las hormonas, la cantidad de células pluripotentes para cada proteína y las características histológicas como MT, muerte celular, índice histopatológico, grosor de lámina basal, área y diámetro de los túbulos seminíferos) se evaluaron todas las variables mencionadas, como se puede observar en la Fig. 7.

Se realizaron diferentes grupos de comparación para las correlaciones con las variables estudiadas y se muestran a continuación:

Grupo 1: Se incluyeron los 23 pacientes del estudio.

Grupo 2: Se incluyeron los pacientes que presentaron únicamente MT en la histología.

Grupo 3: Se incluyeron solo los pacientes con CO unilateral.

Grupo 4: Se incluyeron solo los pacientes con CO bilateral.

Grupo 5: Se incluyeron solo los pacientes con CO Inguinal.

Se utilizó el análisis de correlación simple de Pearson y se consideraron en todos los casos como significativo a una $p < 0.05$.

		Diametro	Área	IH	MT	CT	LB	MC	inhibina B	Estradiol	FSH	VASA	SALL4	AP2GAMMA	OCT-3/4	PLAP	Edad
	X	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	Diametro		23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
2	Área	23		23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
3	IH	23	23		23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
4	MT	23	23	23		23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
5	CT	23	23	23	23		23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
6	LB	23	23	23	23	23		23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
7	MC	23	23	23	23	23	23		23	23	23	23	23	23	23	23	23
8	inhibina B	23	23	23	23	23	23	23		23	23	23	23	23	23	23	23
9	Estradiol	23	23	23	23	23	23	23	23		23	23	23	23	23	23	23
10	FSH	23	23	23	23	23	23	23	23	23		23	23	23	23	23	23
11	VASA	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23		23	23	23	23	23
12	SALL4	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23		23	23	23	23
13	AP2GAMMA	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23		23	23	23
14	OCT-3/4	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23		23	23
15	PLAP	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23		23
16	Edad	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	

Fig.7. Correlaciones realizadas entre las variables estudiadas para cada una de las variables estudiadas.

9.0 RESULTADOS

9.1 Resultados clínicos

Los resultados son presentados en la tabla 3. De los 23 pacientes estudiados, 21 mostraron CO inguinal y 2 con CO abdominal y de acuerdo a la lateralidad se obtuvieron 10 con CO bilateral y 13 con CO Unilateral. La edad promedio fue de 4 años (E.S= 2.5) con una edad mínima de 1 año y máxima de 8 años. La edad más frecuente fue de 3 años.

Tabla 3. Resultados clínicos de pacientes.

No. de Paciente	Edad (años)	Tipo de CO (Inguinal/Abdominal)	Lateralidad de la CO (Unilateral/Bilatera)
1	1	Inguinal	Unilateral
2	3	Inguinal	Unilateral
3	3	Inguinal	Unilateral
4	7	Inguinal	Unilateral
5	7	Inguinal	Bilateral
6	2	Inguinal	Bilateral
7	3	Inguinal	Unilateral

8	7	Inguinal	Bilateral
9	7	Inguinal	Bilateral
10	8	Inguinal	Unilateral
11	2	Inguinal	Unilateral
12	4	Abdominal	Unilateral
13	2	Inguinal	Unilateral
14	8	Inguinal	Unilateral
15	8	Inguinal	Unilateral
16	3	Inguinal	Bilateral
17	6	Inguinal	Bilateral
18	2	Inguinal	Unilateral
19	8	Inguinal	Bilateral
20	5	Inguinal	Bilateral
21	4	Inguinal	Unilateral
22	3	Abdominal/Inguinal	Bilateral
23	1	Inguinal	Bilateral

9.2 Concentraciones hormonales

Se muestran los resultados de las concentraciones hormonales para cada uno de los pacientes (Tabla 4) y el comportamiento por edad para la inhibina B (Fig. 8), FSH (Fig. 9) y estradiol (Fig. 10). No se encontró correlación significativa entre las concentraciones hormonales, con el análisis histológico, la MT y la expresión de proteínas de pluripotencialidad AP2 γ , OCT3/4, SALL4, c-Kit y PLAP. Como se puede apreciar el promedio de las concentraciones de inhibina B fue de 73 pg/ml (E. S: 41.9), FSH 0.90 UI/l (E. S: 5.8), y estradiol 23 pg/ml (E. S: 0.45). Se presentaron pacientes en donde las concentraciones de estradiol estuvieron por abajo del límite de detección de la técnica.

Tabla 4. Concentraciones hormonales por paciente.

No. De paciente	Edad (años)	Inhibina B (pg/ml)	Estradiol (pg/ml)	FSH (UI/l)
1	1	172.8	<20	1.93
2	1	42	<20	0.46
3	2	126.2	<20	0.441
4	2	101	<20	1.34
5	2	122.6	<20	0.861
6	2	80.2	<20	0.74
7	3	38.7	34.9	0.462
8	3	99.1	<20	1.17
9	3	148	21.9	0.384
10	3	79.8	<20	1.1
11	4	<1.6	<20	0.523
12	4	41.6	25	1.88
13	5	34.8	<20	0.75
14	6	50.2	39.9	0.58
15	6	34.7	<20	1.36
16	7	92.4	22.7	0.287
17	7	69.3	25.3	0.643
18	7	17	<20	0.955
19	7	80.8	<20	0.788
20	8	78.9	36.8	0.425
21	8	62.4	22.9	1.21
22	8	56.4	<20	1.22
23	8	47.9	20.3	1.03

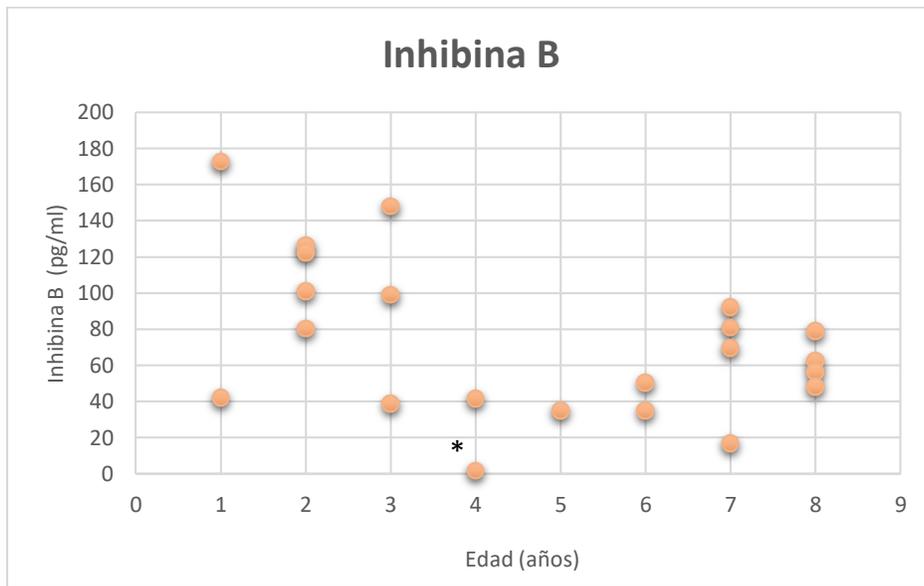


Fig.- 8. Concentraciones de Inhibina B en relación a la edad de los pacientes con CO. * < (cifra menor que 20 pg/ml).

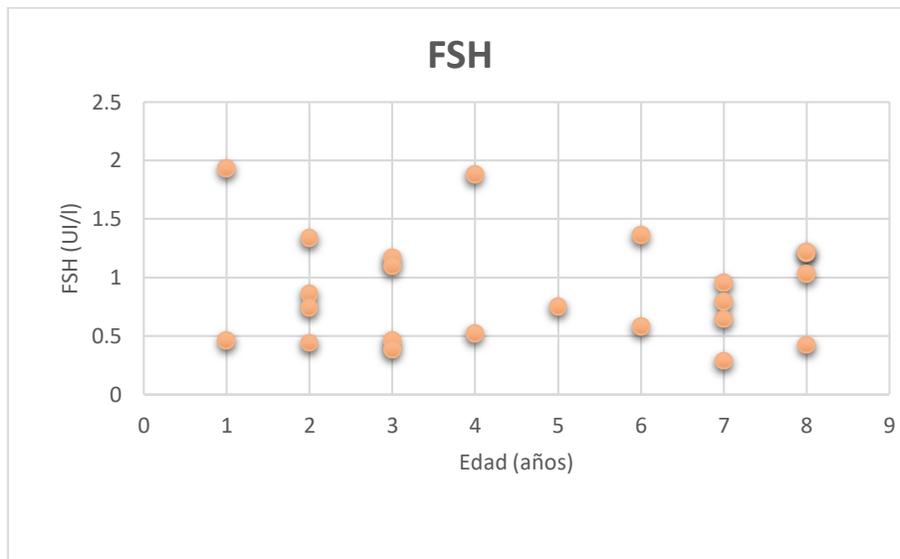


Fig. 9. Concentraciones de FSH en pacientes con CO.

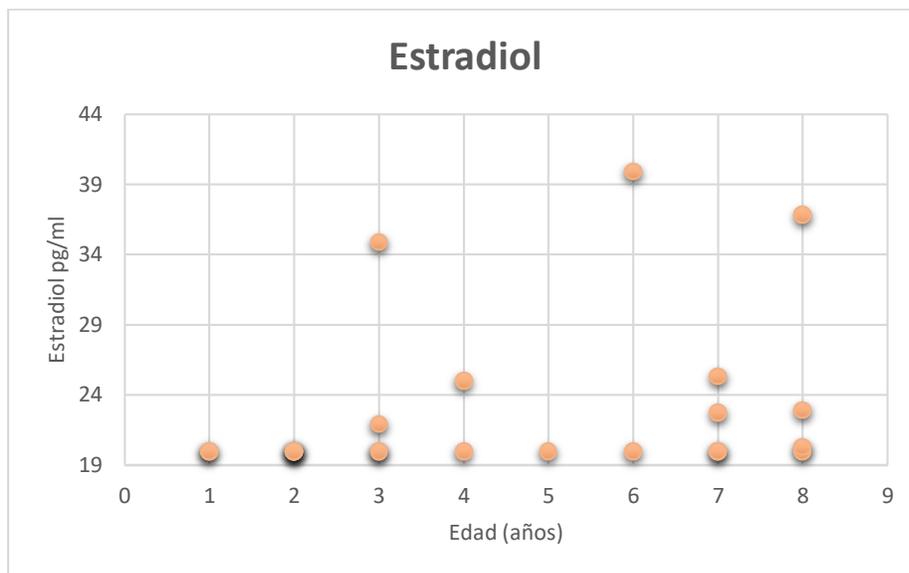


Fig. 10. Concentraciones de Estradiol en pacientes con CO.

9.3 Expresión de proteínas de pluripotencialidad

En el caso de la expresión de proteínas de pluripotencialidad se pudo observar que 14 pacientes que representan 60% de los pacientes expresaron SALL4, 3 pacientes que representa el 11.5% expresaron AP2 γ , 1 paciente que representa 3.8 % expresó OCT3/4, 1 paciente que representa el 3.8% expresó PLAP y ningún paciente expresó c-KIT (Tabla 5).

Tabla. 5. Porcentaje de células que expresan proteínas de pluripotencialidad.

No. de Paciente	SALL4	AP2 γ	OCT3/4	PLAP	c-KIT
1	36	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0
3	13	0	0	0	0
4	47	0	0	0	0
5	4	0	0	0	0
9	45	0	0	0	0
10	2	0	0	0	0
11	5	0	0	0	0
13	27	24	0	0	0

14	95	13	0	0	0
15	100	78	64	71	0
16	14	0	0	0	0
20	38	0	0	0	0

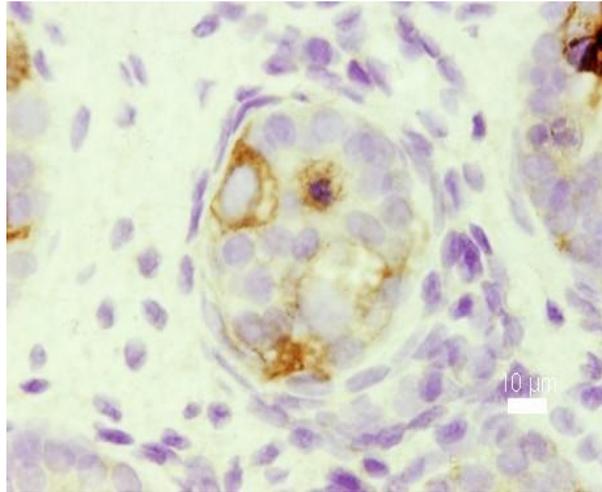


Fig. 11. Micrografía que muestra un cordón seminífero de un paciente de 4 años en donde se observa la expresión de la proteína SALL4 ubicado en el citoplasma de las células germinales.

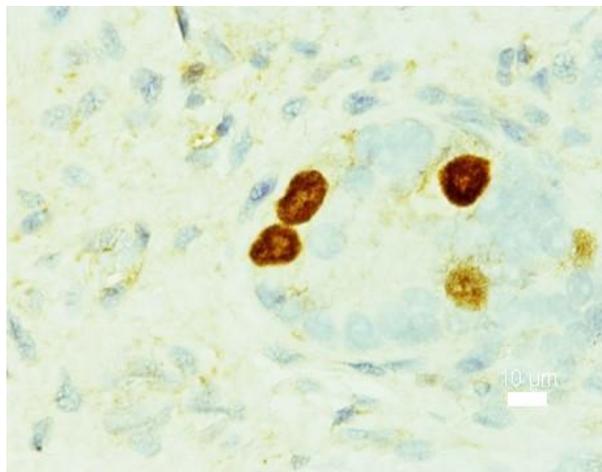


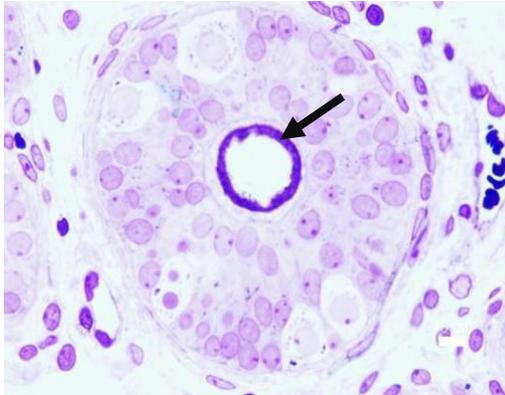
Fig. 12. Micrografía que muestra un cordón seminífero de un paciente de 5 años en donde se observa la expresión de AP2y citoplasmático en pacientes con CO. Barra 10 µm

9.4 Presentación de MT

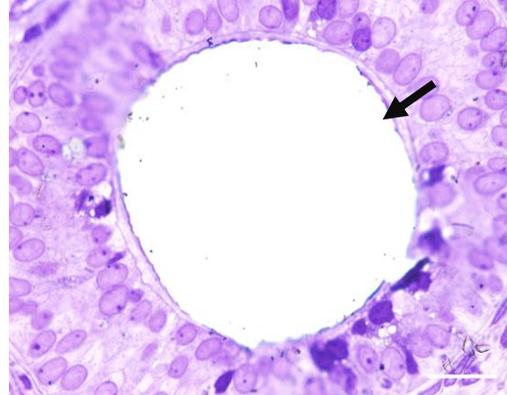
Se muestra a continuación la lista de los pacientes y cuál de ellos mostraron presencia de MT en la histología (Tabla 6) de los 23 pacientes que se incluyeron en este trabajo, se logró identificar que 8 de ellos mostraron MT en la histología testicular.

Tabla. 6. Pacientes con presentación de MT

No. De paciente	Presencia de MT
1	NO
2	NO
3	SI
4	NO
5	NO
6	NO
7	NO
8	NO
9	SI
10	NO
11	SI
12	SI
13	NO
14	NO
15	SI
16	NO
17	SI
18	NO
19	NO
20	SI
21	SI
22	NO
23	NO



MT en paciente con CO inguinal Bilateral de 8 años.



MT en paciente con CO inguinal Bilateral de 8 años

Fig. 13. Micrografía que muestra un túbulo seminífero de paciente con CO en el que se presenta MT. Flecha: MT Tinción azul de toluidina. Barra 10 μ m. Se puede observar las estructuras calcificadas (flecha) al centro de los túbulos seminíferos.

9.5 Presentación de MT y expresión de proteínas de pluripotencialidad

De los 8 pacientes que presentaron MT en la histología, se pudo observar que 6 de ellos presentaron mínimo la expresión de una proteína de pluripotencialidad como se observa en la tabla 7.

Tabla. 7. Pacientes que presentan MT en la histología y expresión para las proteínas de pluripotencialidad.

No. de Paciente	SALL4	AP2 γ	OCT3/4	PLAP	C-Kit
3	14	0	0	0	0
9	45	0	0	0	0

11	5	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0
15	100	46	64	71	0
17	18	0	0	0	0
20	50	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0

9.6 Evaluación histológica

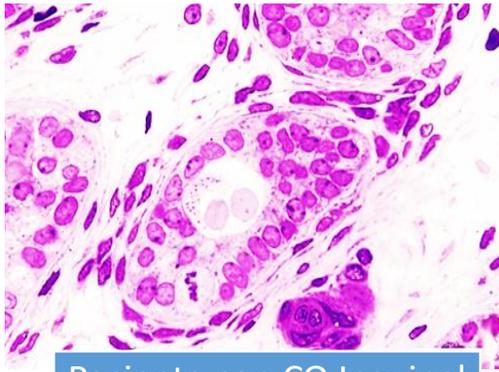
Se muestra en la tabla 8, los resultados de la evaluación histológica realizada para cada una de las variables: Diámetro, área, índice histopatológico (IH), MT, Lámina basal (LB) y Muerte celular (MC) para cada uno de los pacientes incluidos en este estudio.

Tabla. 8. Análisis histológico de los 23 pacientes con CO.

No. de Paciente	Diámetro μm	Área μm	IH	MT	LB	MC
1	175.2012	2285.149	12.2	1.05	3.6847766	1.85
2	158.264963	1785.84313	13.4	0.5	3.33020395	1.25
3	143.166388	1510.30025	12.05	1.15	3.69715	1.55
4	163.206125	1959.46	14.5	2.45	2.59016095	1.8
5	185.538409	2508.9154	13.325	1.95	1.59169276	1.975
6	172.761802	2214.62378	14.225	1.725	1.90126465	1.35
7	210.378425	3134.11975	15.4	2.8	1.60324616	2.25
8	197.703229	2871.28314	15.725	2.7	1.66053602	1.8
9	182.091245	2393.98744	17.1	2.85	1.78154353	2.15
10	153.704927	1683.07293	13.2	0.65	1.84848915	0.65
11	196.451608	2807.72292	15.9	2.6	1.61036395	1.5
12	145.028629	1489.91771	14.65	1.8	1.7118839	1.35
13	151.575993	1634.1892	14.1	1	1.59042064	1.05
14	270.722714	5513.15229	20.95	2.45	2.2853891	1.95
15	196.946683	2864.19117	23	3.25	1.35705271	3
16	170.159084	2088.61488	15.325	1.35	1.68035568	1.35
17	173.444144	2201.08904	20	3.1	2.01927275	2.775
18	190.037413	2601.27688	15.8	2.15	4.2720508	2.15
19	221.858241	3575.48525	12.7	2.45	2.3623848	1.675
20	164.366194	1959.76738	13.35	1.325	3.01667088	1.1
21	191.806189	2707.13767	12.85	2.55	2.44323395	1.1

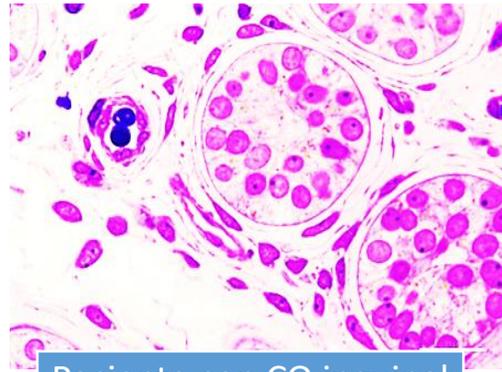
22	154.353685	1667.28054	13.6	2.85	1.69928265	1.7
23	182.568963	2368.6625	13.25	1.65	2.17368865	1.2

En general se logró observar en la histología testicular de los pacientes, diversos daños, como una gran cantidad de gonocitos en edades en las cuales este tipo de células ya no deberían estar presentes (Fig. 14), los Gonocitos fueron reconocidos por ser células grandes con un núcleo evidente y pálido. Se encontraron en la posición central de los cordones testiculares y se desplazaron hacia la lámina basal, para su diferenciación a espermatogonias. También se observó un aumento en el grosor de la lámina basal (Fig. 15), la cual llegaba a medir hasta 5 μm de grosor. Se lograron identificar vacuolizaciones dentro de los túbulos seminíferos (Fig. 16), en algunos pacientes se presentó una evidente atrofia del tejido testicular y una gran cantidad de células muertas (Fig. 17). En los pacientes que presentaron MT, se logró identificar la progresión de la calcificación intratesticular, la cual comienza con un aumento progresivo de células en muerte, el posicionamiento de la muerte celular al centro del túbulo y su posterior calcificación formando la MT (Fig. 18 y 19), además se cuantificó el número de células germinales por túbulo (Fig. 20), esto con ayuda en la expresión de VASA y los resultados se muestran en la tabla 9.



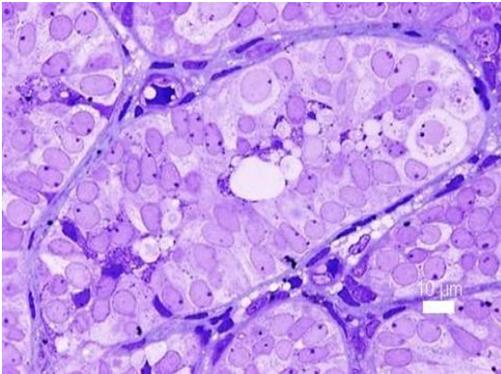
Paciente con CO Inguinal Bilateral de 2 años.

Fig. 14. Histopatología de pacientes con CO con presencia de gonocitos. Tinción azul de toluidina. Barra 10 μ m



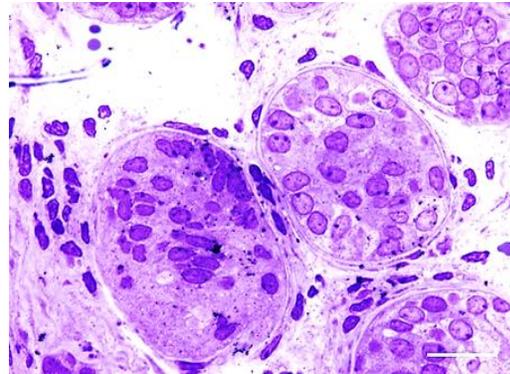
Paciente con CO inguinal Unilateral de 2 años.

Fig. 15. Histopatología de pacientes con CO con una lámina basal engrosada. Tinción azul de toluidina. Barra 10 μ m



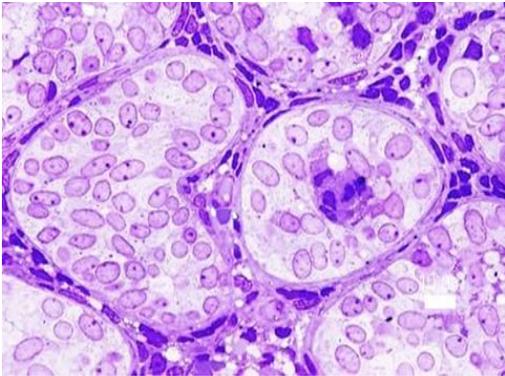
Paciente con CO inguinal Bilateral de 6 años.

Fig. 16. Histopatología de pacientes con CO con presencia de vacuolizaciones. Tinción azul de toluidina. Barra 10 μ m.

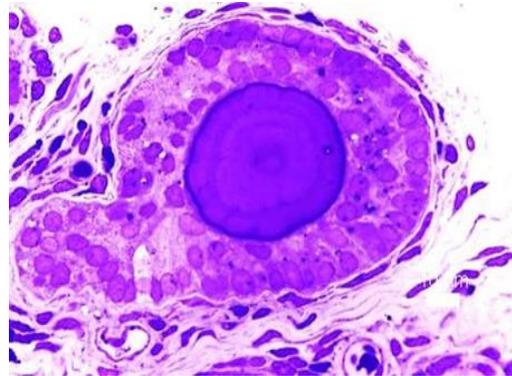


Paciente con CO inguinal Bilateral de 2 años

Fig. 17. Histopatología de pacientes con CO con una gran cantidad de células germinales en muerte. Tinción azul de toluidina. Barra 10 μ m.



Paciente con CO Abdominal
Bilateral de 8 años



Paciente con CO Abdominal
Bilateral de 8 años

Fig. 18. Histopatología de pacientes con CO. Posicionamiento de muerte celular al centro del túbulo. Tinción azul de toluidina. Barra 10 μ m.

Fig. 19. Histopatología de pacientes con CO con presencia de MT. Tinción azul de toluidina. Barra 10 μ m.

Tabla. 9. Porcentaje de células germinales por túbulo seminífero para cada paciente.

No. de Paciente	% Células germinales
1	25
2	2
3	77
4	99
5	6
6	0
7	0
8	0
9	97
10	27
11	0
12	6
13	25
14	100
15	14

16	0
17	18
18	78
19	78
20	50
21	0
22	0
23	0

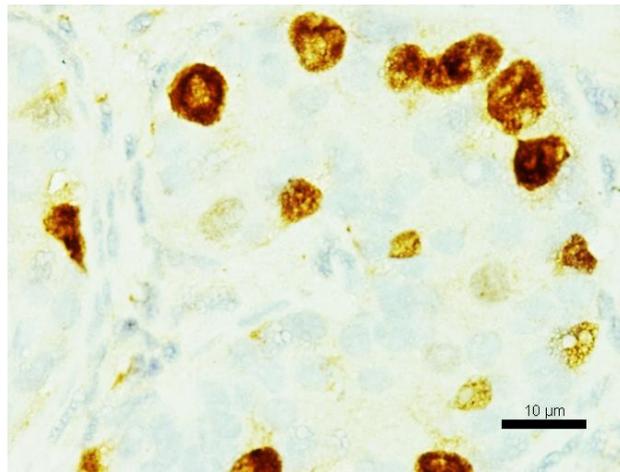


Fig. 20. Inmunohistoquímica de tejido testicular, paciente con CO positivo a la expresión de VASA.

9.7 Análisis de Correlaciones

Se muestra a continuación las correlaciones positivas significativas que se obtuvieron tanto en el grupo 1 (Tabla 10), grupo 2 (Tabla 11) y grupo 3 (Tabla 12).

Tabla. 10. Grupo 1 con correlaciones positivas significativas entre las variables.

Correlaciones positiva en el grupo 1 (Todos los pacientes del estudio)	Valor de r (coeficiente de correlación)
IH/MC	0.7118
MC/MT	0.607
Cél. Germinales/LB	0.5331
Cél. Germinales/SALL4	0.5643
SALL4/IH	0.6961
IH/MT	0.7177

IH: Índice histopatológico; MC: Muerte celular; MT: Microlitiasis.

Tabla. 11. Grupo 2 con correlaciones positivas significativas entre las variables.

Correlaciones positiva en el grupo 2 (pacientes que presentaron únicamente MT en la histología)	Valor de r (coeficiente de correlación)
Inhibina B/MT	0.5209
Edad/MC	0.744
Edad/IH	0.7428
LB/IH	0.7177
Edad/Cél. germinales	0.7291
SALL4/Edad	0.8191

IH: Índice histopatológico; MC: Muerte celular; MT: Microlitiasis.

Tabla. 12. Grupo 5 con correlaciones positivas significativas entre las variables.

Correlaciones positiva en el grupo 5 (pacientes con CO Inguinal)	Valor de r (coeficiente de correlación)
SALL4/MC	0.5594
SALL4/MT	0.5594
SALL4/IH	0.7133

IH: Índice histopatológico; MC: Muerte celular; MT: Microlitiasis.

9.7.1 Correlaciones con las proteínas de pluripotencialidad

Al realizar las diferentes correlaciones entre los grupos y las variables descritas anteriormente, se pudo observar que en los pacientes con CO (Grupo 1) entre más número de células germinales, se presenta una mayor expresión de SALL4 ($r=0.5643$), la expresión de SALL4 y el IH ($r=0.6961$), en los pacientes con CO y presencia de MT en la histología (Grupo 2) se observó también una correlación positiva entre la expresión de SALL4 y la edad ($r=0.8191$) y en los pacientes con CO inguinal (Grupo 5) se observó que a mayor muerte celular, mayor es la expresión de SALL4 y la MC ($r= 0.5594$) y una correlación positiva entre la expresión de SALL4 y el grado de presentación de la MT ($r=0.5594$) y de la misma manera entre la expresión de SALL4 y el IH ($r=0.7133$).

9.8 Análisis individual por paciente

Se realizó una evaluación individual por paciente para valorar la posible relación entre la presentación de MT en la histología, la expresión de proteínas de pluripotencialidad y las concentraciones hormonales (Inhibina B, FSH y estradiol). De este análisis llama la atención uno de nuestros pacientes, el cual tiene 7 años de edad y presenta CO bilateral Inguinal con diversos daños histopatológicos como plegamiento de lámina basal, gran cantidad de células muertas, disminución en el número de células germinales, expresión para SALL4, presenta MT en su histología (Fig. 21) y sus concentraciones hormonales fueron de 80.8 pg/ml para Inhibina B; <20 pg/ml para E2 y 0.78 mUI/ml para FSH.

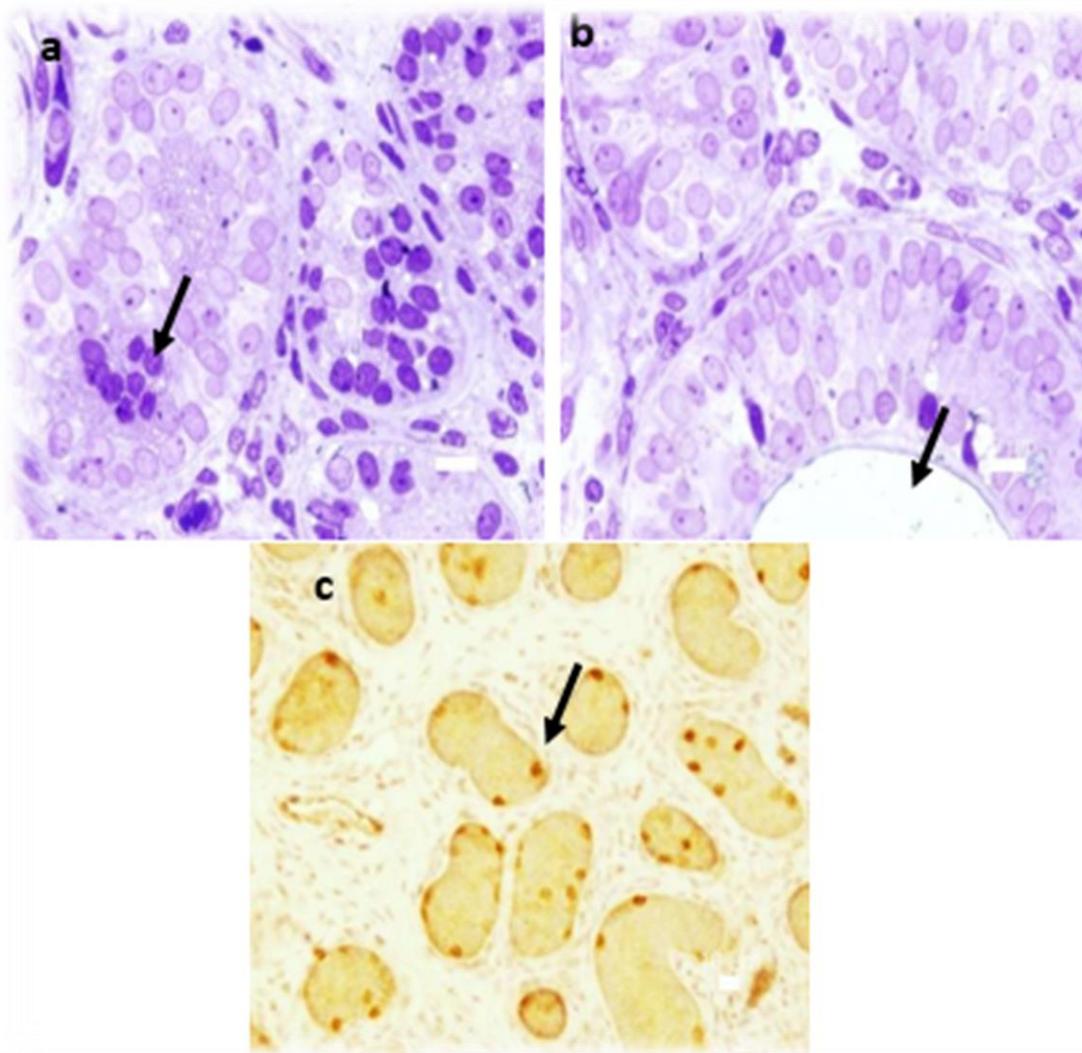


Fig. 21. Paciente con CO Bilateral Inguinal con 7 años. A) Daño histológico en túbulo b) Presencia de MT c) Expresión de SALL4. Tinción azul de toluidina. Barra 10 μ m.

Por otro lado, se observó otro paciente de gran interés (Fig. 21) con CO unilateral Inguinal con 8 años de edad y con daño histológico severo: Túbulos con todas las células muertas, plegamiento de lámina basal, ausencia de células germinales, diversas vacuolizaciones, presencia de MT, expresión para SALL4, PLAP, OCT3/4 y AP2 γ y las concentraciones hormonales fueron las siguientes: Inhibina B: 56.4 pg/ml FSH: 1.22 mUI/ml Estradiol:<20 pg/ml.

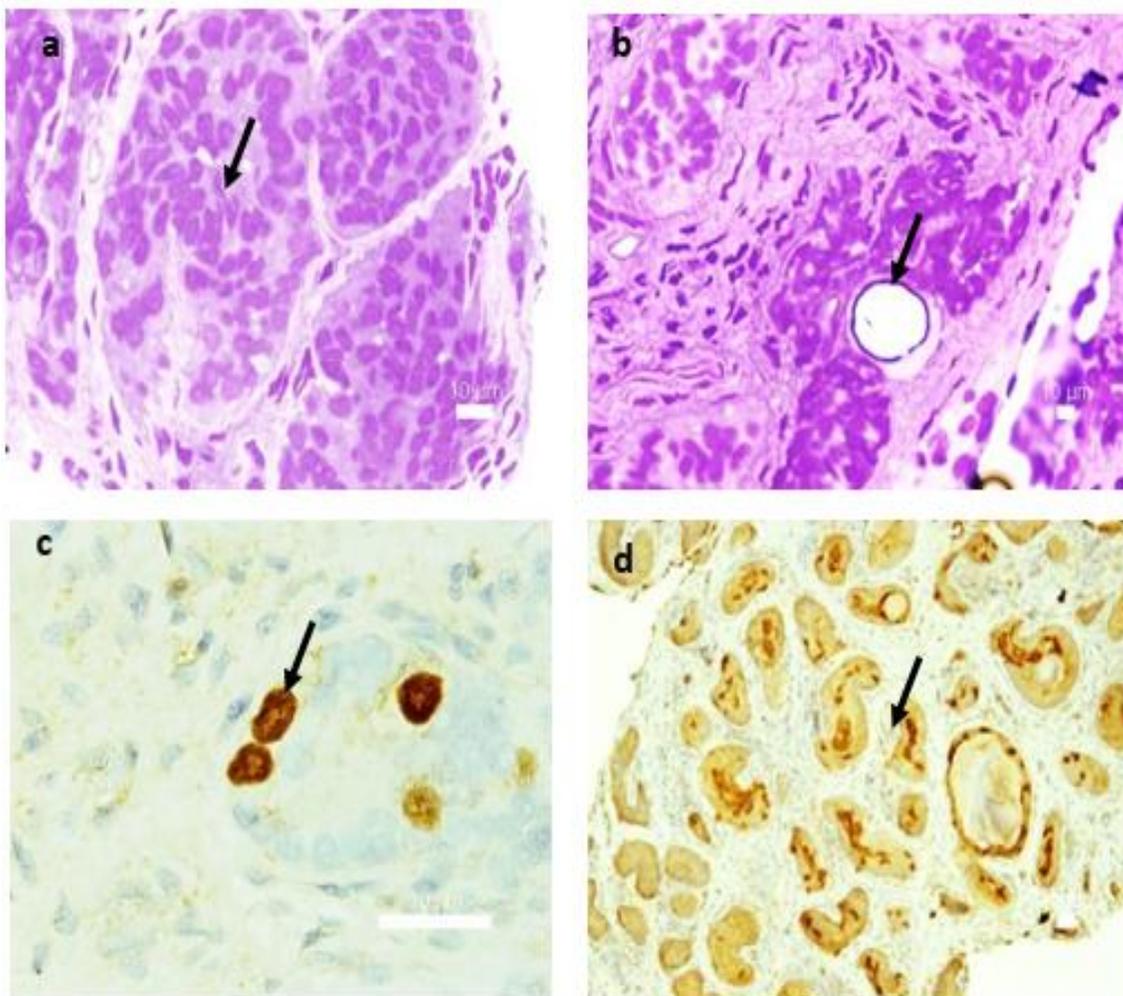


Fig.

22. Paciente con CO unilateral Inguinal con 8 años. a) Muerte celular en túbulos b) Presencia de MT c) Positivo para SALL4 y d) AP2γ. Tinción de azul de toluidina y Inmunihistoquímica. Barra 10 µm.

10.0. DISCUSIÓN

Los TCG tienen a la GCNIS como precursor común (Skakkebaek *et al.*, 1987). La GCNIS se desarrolla como una malignidad invasiva en el 70% (Giwerzman y Skakkebaek 1993). Esta malignidad puede ser tratada exitosamente con una baja dosis de radioterapia u orquiectomía unilateral. Este manejo previene la progresión de la GCNIS a un tumor de células germinales testiculares invasivo y muy probablemente hasta la cura del paciente (Giwerzman y Skakkebaek 1993). Es por eso que en ese trabajo se propuso buscar una relación entre las concentraciones hormonales,

presencia de MT, la expresión de proteínas de pluripotencialidad y las alteraciones histológicas, esto con la finalidad de identificar algún parámetro que sirva como una herramienta que permita en un futuro identificar a pacientes de alto riesgo al desarrollo del TCG con métodos no invasivos como lo es la toma de una muestra sanguínea para la determinación de las concentraciones hormonales y/o un ultrasonido para valorar la presencia de MT en los testículos.

10.1 Evaluación hormonal

Se observó una variabilidad en las concentraciones hormonales de los pacientes con CO. Estos resultados coinciden, con lo ya reportado en otros trabajos, tanto para inhibina B (Hildorf *et al.*, 2018), FSH (Christiansen *et al.*, 1999) como para el estradiol (Elicevik *et al.*, 2006) y depende de la edad de los pacientes.

Se ha propuesto que los cambios en las concentraciones hormonales se acompañan con anormalidades histológicas testiculares en los pacientes con CO. Diversos estudios han evaluado las concentraciones de hormonas relacionadas con la funcionalidad de células de Sertoli en niños con CO y las han comparado con grupos de niños sanos de las mismas edades. Los resultados son variados, en algunos no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (Christiansen *et al.*, 2002), mientras que en otros trabajos si reflejaron algunas diferencias, principalmente en las concentraciones Inhibina B (Gaudino *et al.*, 2008; Thorup *et al.*, 2012).

En el presente trabajo se incluyeron únicamente pacientes con CO y se realizaron correlaciones entre la presencia de MT con las alteraciones histológicas, las concentraciones de inhibina B, FSH y estradiol y la expresión de proteínas de pluripotencialidad. Sin embargo, no se encontraron correlaciones significativas entre las hormonas y la expresión de proteínas de pluripotencialidad, esto probablemente debido al tamaño de muestra con el que contamos y a la combinación de los tipos de CO y el rango de edad estudiado.

Se observó una correlación positiva entre las concentraciones de Inhibina B y el grado de presentación de la MT en el grupo 2 de pacientes que presentaron MT. Esto sugiere

que a mayor concentración de Inhibina B mayor es el grado en el que se presentan la MT, de acuerdo a la histología testicular de los pacientes con CO. Lo que propone que las concentraciones de inhibina B superiores o inferiores a las concentraciones fisiológicas, puede ser de riesgo para el mantenimiento del epitelio seminífero. Algunos autores han propuesto que las concentraciones bajas de inhibina B se asocian con una disfunción testicular, como en el trabajo de Cortés et al., (2007), quienes compararon concentraciones de Inhibina B y FSH con diversos parámetros testiculares en pacientes con CO bilateral, sus resultados mostraron un bajo número de espermatogonias y gonocitos en la biopsia, el 24% de estos pacientes tenían concentraciones bajas de Inhibina B y en el 9% la FSH había aumentado. Los autores propusieron una relación directa entre la Inhibina, con la función testicular deteriorada (Cortés et al., 2007). También se ha reportado una asociación entre las concentraciones de Inhibina, el número de células de Sertoli por túbulo en pacientes con CO (Zivkovic et al., 2009), morfología anormal (Paniagua et al., 1990) y degeneración celular (Rune et al., 1992).

La correlación positiva que se encontró en este trabajo entre las concentraciones de inhibina B y el grado de presentación de la MT ($r= 0.5209$) nos permite proponer que la Inhibina B podría estar regulando negativamente la secreción de FSH y repercutir sobre el estado y funcionamiento en las células de Sertoli. Esto podría llevar una acumulación de células muertas dentro de los túbulos seminíferos y una posterior presentación de la MT. Ya se ha demostrado que las concentraciones de Inhibina B y FSH se regulan recíprocamente en la etapa prepúber (Raivio et al., 1999; Kuiri-Hänninen et al., 2019) y que la Inhibina B es un regulador negativo y actúa sobre la hipófisis frenando la producción de FSH (Conn et al., 1986).

10. 2. Evaluación Histológica

En los años 50's se pensaba que las características más significativas de daño histopatológico en pacientes con CO era el número de células germinales por cordón/tubo seminífero y la presencia de GCNIS, sin embargo, estudios posteriores describen con más detalle los daños en células germinales y de Leydig (Mechlin et al.,

2014). La evaluación histológica, asociada a factores clínicos como tipo de CO, posición del testículo, concentración de hormonas sexuales y edad de la orquidopexia es sumamente importante, ya que podría inferir un riesgo de malignidad con la necesidad de realizar pruebas diagnósticas adicionales para los pacientes (Mechlin *et al.*, 2014).

Este trabajo se mostraron diversas alteraciones histológicas: la presencia de MT en el 35% de los pacientes, un aumento en el número de células de Sertoli, y presencia de gonocitos persistentes en pacientes de más de un año de edad, estas alteraciones ya han sido previamente reportadas (AbouZeid *et al.*, 2011). AbouZeid *et al.*, (2011) quienes reportaron en pacientes con CO un aumento en la proliferación de células de Sertoli, vacuolización del epitelio seminífero, membrana basal sumamente engrosada, ausencia de células germinales y presencia de MT en el 6% de sus pacientes.

La diferenciación del gonocito a espermatogonia obscura, comienza durante el último tercio de gestación y culmina el primer año de vida (Hutson *et al.*, 2013). Sin embargo, en pacientes con CO unilateral y bilateral, se ha reportado la presencia de gonocitos que persisten sin diferenciarse en pacientes mayores al año de edad. Se ha propuesto una falla en la transformación de los gonocitos a espermatogonia durante la llamada minipubertad, que abarca los primeros seis meses. (Hadziselimovic *et al.*, 2008; Loebenstein *et al.*, 2019). Esta falla podría resultar en una pérdida en el número total de células germinales en la etapa adulta, lo que afectaría la fertilidad. En el peor de los casos, si estos gonocitos se conservan sin diferenciarse, se incrementa el riesgo del desarrollo de malignidad futura.

Se observó una disminución en la cantidad de células germinales en pacientes mayores a 2 años de edad, y se ha reportado que los pacientes que se someten a orquidopexia en una edad mayor a los 2 años tienen un riesgo significativo de infertilidad (Thorup *et al.*, 2012; Hildorf *et al.*, 2019). En la actualidad, la persistencia de gonocitos después de los 6 meses de edad, la ausencia o disminución de las espermatogonias y de espermatoцитos puede ser un indicador de la infertilidad futura en los pacientes con CO (Mechlin *et al.*, 2014).

En este trabajo se logró identificar una correlación positiva entre la edad de la corrección quirúrgica y la cantidad de células muertas por túbulo seminífero ($r= 0.744$), y el IH ($r= 0.7428$) en el testículo. Esto puede deberse a que entre mayor es la edad de la corrección de la CO, mayor es el tiempo que el testículo se somete a alta temperatura ocasionando daño directo a las células de Sertoli generando un mal funcionamiento lo que posiblemente evite la secreción de factores necesarios para la diferenciación del gonocito como el SCF (Yamamoto *et al.*, 1993; Yasuda *et al.*, 1993; Robinson *et al.*, 2001), PDGF (Wang y Culty *et al.*, 2007; Basciani *et al.*, 2008), AR (Wang y Culty *et al.*, 200; Zhou *et al.*, 2008). Es probable que al no diferenciarse los gonocitos, mueren por apoptosis y una falla en la fagocitosis de estas células muertas por parte de las células de Sertoli genere la formación de MT (Shanmugasundaram *et al.*, 2007).

Se encontró también que, a mayor grosor de la lámina basal, existe una mayor cantidad de daño histológico (IH) ($r= 0.7177$). Previos reportes demuestran que la CO se asocia con alteraciones en la lámina basal. Esta estructura juega un papel importante en el mantenimiento de la cohesión estructural de los túbulos seminíferos, y también es un componente de la barrera hematotesticular. El engrosamiento de esta estructura se atribuye a un aumento de la síntesis y secreción de componentes extracelulares, (Pinart *et al.*, 2001). Se ha visto que, en varones sanos, las células de Sertoli maduras inhiben la producción de la matriz extracelular excesiva, esto con la ayuda de las células peritubulares (Raychoudhury *et al.*, 1993). Este engrosamiento de la lámina basal podría ocasionar una comunicación defectuosa entre las células de Sertoli del tubo seminífero y las células de Leydig del espacio intersticial, repercutiendo en anomalías en las células germinales.

La correlación positiva entre la MT con la cantidad de células muertas ($r=0.607$) y el IH ($r=0.7177$) en los túbulos seminíferos, puede ser una herramienta valiosa, ya que la MT por sí sola, puede diagnosticarse gracias a un método no invasivo como lo es el ultrasonido. Por lo que el ultrasonido, podría ser un método indirecto de las alteraciones histológicas al epitelio seminífero. Aunado a esto, si la MT se diagnostica

en la infancia, y se asocia con CO, puede considerarse como una condición premaligna, ya que el origen de esta se ha propuesto como un daño directo a las células de Sertoli que son de gran importancia para la diferenciación de los gonocitos y además, podría utilizarse como un marcador de disfunción testicular (Shanmugasundaram *et al.*, 2007).

Histológicamente la MT, se puede observar como un conjunto de estructuras calcificadas dentro del túbulo seminífero, ya se ha reportado que estas calcificaciones se originan de la degeneración celular (Shanmugasundaram *et al.*, 2007). Con los resultados obtenidos en este trabajo, proponemos que la gran cantidad de células muertas y el daño histológico observado al testículo puede ocasionar la formación de MT.

Se propone que todas estas alteraciones al epitelio germinal de los pacientes con CO inferidas por el grado de MT en un ultrasonido son una herramienta de gran valor para predecir el daño al testículo. Nistal *et al.*, (1999) han sugerido, que la atrofia testicular, es un parámetro que podría considerarse como una lesión primaria que se presenta antes del desarrollo del tumor testicular. Esto puede deberse a diversas causas: la primera es un aumento en las especies reactivas de oxígeno (EROS) debido a la temperatura a la que el testículo se encuentra expuesto cuando no se ubica dentro del escroto. Se ha correlacionado la presencia de EROS con un aumento de apoptosis en células germinales, ya que, dentro de los túbulos seminíferos, las células germinales son las más vulnerables al estrés por calor, ya que se caracterizan por una alta actividad mitótica (Tower *et al.*, 2012). Por lo que es de suma importancia la pronta ubicación del testículo a una temperatura inferior a la corporal para que la diferenciación del gonocito a espermatogonia AD se lleve a cabo satisfactoriamente.

El segundo factor que podría estar involucrado en el daño histológico testicular es una falla en el eje hipotálamo-hipófisis-testículo el cuál podría verse afectado el mecanismo de descenso testicular y por lo tanto en el daño directo al testículo. Se propuso en 1993 que trastornos reproductivos masculinos como la CO, hipospadias y una baja fertilidad, podría estar relacionados con la exposición ambiental de productos químicos con

acciones estrogénicas o antiestrogénicas, las cuales simulan o bloquean la secreción de andrógenos endógenos (Sharpe y Skakkebaek *et al.*, 1999). Esto podría tener efectos sobre la regulación de la secreción de gonadotropinas, por un mecanismo de retroalimentación negativa, por la acción de compuestos con actividad estrogénica (Bonde *et al.*, 2016). Se ha informado que el estradiol puede inhibir la producción de andrógenos, limitando por completo el desarrollo, proliferación de células de Leydig y las células de Sertoli (Hermanowicz *et al.*, 2012).

10.3. Evaluación en la expresión de proteínas de pluripotencialidad

En nuestro estudio logramos identificar una correlación positiva ($r= 0.8191$) entre la edad de la orquidopexia del paciente y la expresión de SALL4, esto resalta la importancia de la corrección quirúrgica antes del primer año de vida ya que, si esto se posterga, no puede realizarse una adecuada diferenciación de gonocitos a espermatogonias y el gonocito indiferenciado podría ser capaz desarrollar TCG rn un futuro. Algunos autores ya han reportado la importancia de la edad de la orquidopexia en la diferenciación de gonocitos a espermatogonias Ad como Wilkson *et al.*, (2001) que proponen que la intervención quirúrgica debe realizarse antes de los 15 meses de edad y otros autores recomiendan que sea antes de los 9 meses (Trussell *et al.*, 2004). Es importante tener en cuenta que no solo existe un daño potencial a las células del linaje germinal, si no que el testículo, a mayor tiempo fuera del escroto, incrementa la posibilidad de desarrollar cáncer testicular como lo han sugerido varios estudios epidemiológicos (Moller *et al.*, 1996; Strader *et al.*, 1988; Pinczowski *et al.*, 1991; Herrinton *et al.*, 2003; Grupta *et al.*, 2020).

Aunque en este trabajo se observó que a mayor edad en la que se realización de la orquidopexia hay mayor cantidad de células germinales como lo expresa la proteína VASA, que es específica para células germinales. Proponemos que esto es debido a que los gonocitos continúan proliferando, como normalmente ocurre y pueden seguir tres caminos: a) continuar con su diferenciación y proliferación y contribuir en una fertilidad exitosa a futuro. b) que posteriormente entren en apoptosis y generen

problemas en la fertilidad futura y c) mantenerse como gonocito indiferenciado pluripotente como foco de malignidad (Vigueras *et al.*, 2015).

En este trabajo logramos observar una correlación positiva entre el IH ($r=0.7133$) y la MC (0.5594) con la expresión de la proteína SALL4, el cual es un factor de transcripción de dedos de zinc que juega un papel en el mantenimiento de la pluripotencialidad y su expresión se ha reportado previamente en algunos casos de tumor de células germinales extragonadales (Emerson and Ulbright, 2010; Camparo and Comperat, 2013). Ha sido utilizado como un marcador altamente sensible para GCNIS y su expresión se regula a la baja durante la diferenciación de Gonocitos a espermatogonias (Cao *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009). También está documentado que SALL4 regula otras proteínas como son OCT3/4, NANOG y SOX2 que participan en el mantenimiento de la pluripotencialidad de las células (Zhang *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007). Este resultado es importante, ya que nosotros podemos deducir que cuando existe un daño testicular severo a nivel histológico el testículo está más propenso a la malignidad, principalmente por un fallo en células de Sertoli. Teniendo en cuenta que SALL4 es un marcador específico de GCNIS, proponemos que la MT, la cual se puede diagnosticar mediante un ultrasonido, por sí sola podría inferir, de manera indirecta, la presencia de proteínas de pluripotencialidad.

10. 3. Análisis individual por paciente

En el presente trabajo se logró identificar a 1 paciente de 8 años de edad con CO unilateral que fue positivo para la expresión de proteínas de pluripotencialidad (SALL4, PLAP, OCT3/4 y AP2 γ) en una edad en la que deberían de regularse a la baja (Gaskell *et al.*, 2004; Honecker *et al.*, 2004; Høi-Hansen *et al.*, 2005; Stoop *et al.*, 2005; Culty, 2009). El hecho de que estas células mantengan una expresión persistente provoca que estas células sean más susceptibles a la malignidad (Vigueras *et al.*, 2015), sumado a que estas proteínas son empleadas como biomarcadores para el diagnóstico de la GCNIS. Es muy importante resaltar que además de la expresión de estas proteínas el paciente mostró marcado daño histopatológico (túbulos con todas las células en muerte, plegamiento de lámina basal, escasas células germinales,

diversas vacuolizaciones), se pudo observar MT en la histología, y concentraciones de inhibina B de 56.4 pg/ml que son concentraciones bajas para lo reportado en la literatura (Raivio *et al.*, 1999). Estas características podrían estar proporcionando información acerca del estado funcional de las células de Sertoli, y esto repercutir en el mantenimiento de los gonocitos persistentes con el posterior desarrollo de GCNIS. También es importante resaltar que tanto la determinación de concentraciones hormonales y la identificación de MT testicular son diagnósticos que se pueden valorar mediante métodos no invasivos como la toma de muestra sanguínea y un ultrasonido.

Esto es sumamente importante para nuestro trabajo, ya que abre la posibilidad de estudiar mucho más a fondo la expresión de estas proteínas de pluripotencialidad y su relación con la MT en pacientes con CO, sin embargo, se requiere de un tamaño de muestra mucho más grande de pacientes para comprobar de alguna manera si existe una correlación significativa, ya en este trabajo no se cuenta con el número suficiente de pacientes con estas características.

11.0 CONCLUSIÓN

En este trabajo no se encontró una correlación entre proteínas de pluripotencialidad como AP2 γ , OCT3/4, PLAP y c-kit, sin embargo, se observó que existe una correlación positiva entre la expresión de SALL4 (una proteína de pluripotencialidad y actualmente usada en el diagnóstico de TCG) con la MT en los pacientes con CO, esto es una herramienta sumamente valiosa como un diagnóstico temprano, ya que la identificación de la MT se puede realizar mediante un ultrasonido.

12.0 BIBLIOGRAFÍA

- A. Jemal; F. Bray; M. M. Center.; J. Farlay; E. Ward; D. Forman: Global cancer statistics. CA Cancer J Clin. 2011; 61, 69-90.
- Abacı A, Çatlı G, Anık A, et al. Epidemiology, classification and management of undescended testes: does medication have value in its treatment? J Clin Res Pediatr Endocrinol 2013;5(2):65–72.
- AbouZeid AA, Mousa MH, Soliman HA, et. al. Intra-abdominal testis: histological alterations and significance of biopsy. J Urol. 2011;185(1):269-74.
- AbouZeid AA, Mousa MH, Soliman HA, et. al. Intra-abdominal testis: histological alterations and significance of biopsy. J Urol. 2011;185(1):269-74.
- AbouZeid AA, Mousa MH, Soliman HA, Hamza AF, Hay SA. Intra-abdominal testis: histological alterations and significance of biopsy. J Urol. 2011 Jan;185(1):269-74.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., and Walter P. Biología Molecular de la Célula. 5ta. Ed. Omega. Barcelona, España, 2010.
- Anawalt BD, Bebb RA, Matsumoto AM, Groome NP, Illingworth PJ, McNeilly AS, Bremner WJ. Serum inhibin B levels reflect Sertoli cell function in normal men and men with testicular dysfunction. 1996. J Clin Endocrinol Metab. 81: 3341–3345.
- Andersson AM, Müller J, Skakkebaek NE. Different roles of prepubertal and postpubertal germ cells and Sertoli cells in the regulation of serum inhibin B levels. 1998. J Clin Endocrinol Metab. 83:4451–4458.
- Arredondo G, Arreola SMA, Lierse W. Morphogenesis of the gubernaculum testis in Sprague-Dawley rat. Preliminary Report. Arch Invest Med (Mex). 1991, 22 (2):151-161.
- Ashley RA, Barthold JS, Kolon TF. Cryptorchidism: pathogenesis, diagnosis, treatment and prognosis. Urol. Clin. North Am. 2010, 37: 183–193.

- Bach AM, Hann LE, Hadar O, Shi W, Yoo HH, Giess CS, Sheinfeld J, Thaler H. Testicular microlithiasis: what is its association with testicular cancer? *Radiology*. 2001, Jul;220(1):70-5.
- Backhouse KM, Hewer HR. Features of reproduction in the grey seal. *Med Biol Illus* 1964, 14:144-150.
- Bader MI, Peeraully R, Ba'ath M, McPartland J, Baillie C. The testicular regression syndrome--do remnants require routine excision? *J Pediatr Surg*. 2011;46(2):384-6.
- Biermann K, Klingmüller D, Koch A, Pietsch T, Schorle H, Büttner R, Zhou H. Diagnostic Value of Markers M2A, OCT3/4, AP-2gamma, PLAP and c-KIT in the Detection of Extragonadal Seminomas. *Histopathology*. 2006 49 (3), 290-7.
- Biermann K, Göke F, Nettersheim D. c-KIT is frequently mutated in bilateral germ cell tumours and down-regulated during progression from intratubular germ cell neoplasia to seminoma. 2007. *J Pathol*. 213: 311-318.
- Bonde JP, Flachs EM, Rimborg S. The epidemiologic evidence linking prenatal and postnatal exposure to endocrine disrupting chemicals with male reproductive disorders: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2016; Jan; 23(1): 104–125.
- Bokemeyer C, Kuczyk MA, Dunn T, Serth J, Hartmann K, Jonasson J, Pietsch T, Jonas U, Schmoll HJ. Expression of stem-cell factor and its receptor c-kit protein in normal testicular tissue and malignant germ-cell tumours. 1996. *J Cancer Res Clin Oncol*. 122(5):301-306.
- Buehr M, McLaren A, Bartley A, Darling S. Proliferation and migration of primordial germ cells in We/We mouse embryos. 1993. *Dev Dyn*. 198(3):182-189.
- Braga LH, Lorenzo AJ. Cryptorchidism: A practical review for all community healthcare providers. *Can Urol Assoc J*. 2017 ;11(1-2Suppl1):S26-S32

- Braga LH, Lorenzo AJ. The changing elaboration of inhibin B in patients with unilateral testicular maldescent vs vanished testis. 2015, J Urol. 193(5):1465–1466. doi: 10.1016/j.juro.2015.02.076.
- Bray F, Richiardi L, Ekbom A, Pukkala E, Cuninkova M, Moller H. Trends in testicular cancer incidence and mortality in 22 European countries: continuing increases in incidence and declines in mortality. 2006. Int J Cancer.118(12):3099-3111.
- Camparo P, Comperat EM. SALL4 is a useful marker in the diagnostic work-up of germ cell tumors in extra-testicular locations. Virchows Arch 2013, 462:337–41.
- Cao D, Li J, Guo CC, Allan RW, Humphrey PA. SALL4 is a novel diagnostic marker for testicular germ cell tumors. Am J Surg Pathol 2009;33:1065–77
- Carbone P, Cryptorchidism and hypospadias in the Sicilian district of Ragusa and the use of pesticides. 2006, Reproductive Toxicology. 22:8–12.
- Castrillon DH, Quade BJ, Wang TY, Quigley C and Crum CP. The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage. 2000. ProcNatl Acad Sci USA. 97(17):9585-9590.
- Chávez, SM, Viguera VRM, Yokoyama RE, Landero HDA, Rojas CJC, Taja CL, Cuevas AJO, Zambrano E. 2017. Single nucleotide polymorphisms associated with nonsyndromic cryptorchidism in Mexican patients. Andrologia. Feb;50(1).
- Chazaud C, Oulad-Abdelghani M, Bouillet P, Décimo D, Chambon P, Dollé P. AP-2.2, a novel gene related to AP-2, is expressed in the forebrain, limbs and face during mouse embryogenesis. 1996. Mech Dev, 54(1):83-94.
- Cook MB, Olof A, Forman D, Madigan MP, Richiardi L, McGlynn KA. 2010. A systematic review and meta-analysis of perinatal variables in relation to the risk of testicular cancer—experiences of the son Int J Epidemiol. ahead of print 26 July 2010.

- Coughlin MT, Bellinger MF, Lee PA. Age at unilateral orchiopexy: effect on hormone levels and sperm count in adulthood. 1999. *Urology*. 162:986–989
- Conn, P.M., Staley, D., Harris, C., Andrews, W.V., Gorospe, W.C., McArdle, C.A., Huckle, W.R., and Hansen, J. Mechanism of action of gonadotropin releasing hormone. 1986, *Annu. Rev. Physiol.* 48, 495–513.
- Cortes D, Brandt B, Thorup J. Direct mixed antiglobulin reaction (MAR) test in semen at follow-up after testicular biopsy of maldescended testes operated in puberty. *Z Kinderchir.* 1990, 45(4):227-228.
- Cortes D., Thorup J. M., Visfeldt J. Cryptorchidism: aspects of fertility and neoplasms. A study including data of 1,335 consecutive boys who underwent testicular biopsy simultaneously with surgery for cryptorchidism. 2001. *Horm. Res.* 55, 21–2710.
- Cortes D, Thorup J, Hogdall E, Norgaard-Pedersen B, Petersen BL, Hogdall C. The relation of germ cells per tubule in testes, serum inhibin B and FSH in cryptorchid boys. *Pediatr Surg Int.* 2007;23(2):163–169.
- Culty M. Gonocytes, the forgotten cells of the germ cell lineage. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2009; 87:1–26.
- Christiansen P, Andersson AM, Skakkebaek NE, Juul A. Serum inhibin B, FSH, LH and testosterone levels before and after human chorionic gonadotropin stimulation in prepubertal boys with cryptorchidism. *Eur J Endocrinol.* 2002. Jul;147(1):95-101.
- Dalgaard MD, Weinhold N, Edsgård D, Silver JD, Pers TH, Nielsen JE, Jørgensen N, Juul A, Gerds TA, Giwercman A, Giwercman YL, Cohn-Cedermark G, Virtanen HE, Toppari J, Daugaard G, Jensen TS, Brunak S, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE, Leffers H, Gupta R. A genome-wide association study of men with symptoms of testicular dysgenesis syndrome and its network biology interpretation. *J Med Genet.* 2012, 49(1):58-65.
- Dohle GR, Elzanaty S, van Casteren NJ. Testicular biopsy: clinical practice and interpretation. *Asian J Androl.* 2012, 14(1):88-93.

- Eliçevik M1, Tireli G, Sander S, Celayir S. Plasma testosterone and estradiol levels in unilateral cryptorchidism. *Arch Androl.* 2006 Sep-Oct;52(5):343-6.
- Ellerkamp V, Schmid A, Blumenstock G, et al. Guideline implementation for the treatment of undescended testes: still room for improvement. *J Pediatr Surg* 2018; 53(11):2219–24.
- Emerson RE, Ulbright TM. Intratubular germ cell neoplasia of the testis and its associated cancers: the use of novel biomarkers. 2012, *Pathology.* 42: 344–55.
- Ehrmeyer SL, Joiner BL, Kahan L, Larson FC, Metzzenberg RL. A cancer-associated, fast, homoarginine-sensitive electrophoretic form of serum alkaline phosphatase. 1978. *Cancer Res.* 38:599-601.
- Esposito S, Confini M, Donato R, Leonardi A, Lucchetti L, Cipolla Cleilia. Inhibin B in healthy and cryptorchid boys. *Ital J, Pediatric* 2018; 44: 81.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013.
- Fénichel P. Unconjugated bisphenol A cord blood levels in boys with descended or undescended testes. 2012, *Human Reproduction.* 27:983–990.
- Foresta C., Zuccarello D., Garolla A, and Ferlin A. Role of Hormones, Genes, and Environment in Human Cryptorchidism. 2008, *Endocr Rev.* 29(5):560-580.
- Furness PD 3rd, Husmann DA, Brock JW 3rd, Steinhardt GF, Bukowski TP, Freedman AL, Silver RI, Cheng EY. Multi-institutional study of testicular microlithiasis in childhood: a benign or premalignant condition? 1998, *J Urol.*160(3 Pt 2):1151-4.
- Furuya S, Kumamoto Y, Sugiyama S. Fine structure and development of Sertoli junctions in humantestis. 1978, *Arch Androl.* 1(3):211-219.

- García-Rodríguez J, et al. Exposure to pesticides and cryptorchidism: Geographical evidence of a possible association. *Environmental Health Perspectives*. 1996, 104:1090–1095.
- Gaudino R, Cavarzere P, Camilot M, Teofoli F, Zampieri N & Tatò L. Prepubertal serum inhibin B in cryptorchid infants and in monorchid boys with compensatory testicular hypertrophy. 2008, *Fertil Steril* 90, 2217– 2221.
- Gaskell TL, Esnal A, Robinson LL, Anderson RA, Saunders PT. Immunohistochemical profiling of germ cells within the human fetal testis: identification of three subpopulations. *Biol Reprod* 2004;71:2012–21.
- Giwercman A, Carlsen E, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for increasing incidence of abnormalities of the human testis: a review. *Environ Health Perspect*. 1993. Jul;101 Suppl 2:65-71.
- Goede J, Hack WW, van der Voort-Doedens LM, Sijstermans K, Pierik FH. Prevalence of testicular microlithiasis in asymptomatic males 0 to 19 years old. *J Urol* 2009, 182:1516–1520.
- Gupta M, Cheaib JG, Patel HD. Diagnosis and Management of Intratubular Germ Cell Neoplasia in Situ: A Systematic Review. *J Urol*. 22:101097. 2020.
- Gurney J, K., McGlynn K,A., Stanley J., Merriman T., Signal V., Shaw C., Edwards R., Richiardi L., Hutson J., Sarfati D. Risk factors for cryptorchidism. *Nat Rev Urol*. *Nat Rev Urol*. 2017, 14(9): 534–548.
- Hadziselimovic F, Hoecht B. Testicular histology related to fertility outcome and postpubertal hormone status in cryptorchidism. *Klin Padiatr* 2008; ;220(5):302-7
- Hadziselimovic F, Zivkovic D, Bica DTG, Emmons LR. 2005. The importance of mini-puberty fo fertility in cryptorchidism. *J Urol* 174:1536–1539.

- Hamdi SM, Almont T, Galinier P, Mieusset R, Thonneau P. Altered secretion of Sertoli cells hormones in 2-year-old prepubertal cryptorchid boys: a cross-sectional study. *Androl.* 2017, 5(4):783–789.
- Helal MA, Mehmet H, Thomas NS, Cox PM, Ralph DJ, Bajoria R, Chatterjee R. Ontogeny of human fetal testicular apoptosis during first, second, and third trimesters of pregnancy. 2002. *J Clin Endocrinol Metab.* 87(3):1189-1193
- Hermanowicz A, Matuszczak E, Debek W. Expression of estrogen receptors α and β in paratesticular tissues in boys operated on for unilateral cryptorchidism between the 1st and 4th years of life. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res.* 2012. 18(10):CR630-4.
- Herrinton LJ, Zhao W and Husson G: Management of cryptorchism and risk of testicular cancer. *Am J Epidemiol* 2003; 157: 602.
- Heyns CF, Hutson JM. Historical review of theories in testicular descent. *J Urol.* 1995, 153:754-767.
- Hildorf S, Clasen-Linde E, Cortes D, Fossum M, Thorup J. Fertility Potential is Compromised in 20% to 25% of Boys with Nonsyndromic Cryptorchidism Despite Orchiopexy within the First Year of Life. *J Urol.* 2019.
- Hildorf S, Dong L, Thorup J, Clasen-Linde E, Yding Andersen C, Cortes D. Sertoli Cell Number Correlates with Serum Inhibin B in Infant Cryptorchid. *Sex Dev.* 2019;13(2):74-82.
- Hoei-Hansen CE, Almstrup K, Nielsen JE, Brask Sonne S, Graem N, Skakkebaek NE, Leffers H, Rajpert-De Meyts E. Stem cell pluripotency factor NANOG is expressed in human fetal gonocytes, testicular carcinoma in situ and germ cell tumors. *Histopathology* 2005;47:48–56.
- Hoei-Hansen CE, Nielsen JE, Almstrup K, Sonne SB, Graem N, Skakkebaek NE, Leffers H, Rajpert-De Meyts E. Transcription factor AP-2 γ is a developmentally

regulated marker of testicular carcinoma in situ and germ cell tumors. 2004. *Clin Cancer Res.* 10:8521–8530.

-Honecker F, Stoop H, de Krijger RR, Chris Lau YF, Bokemeyer C, Looijenga LH. Pathobiological implications of the expression of markers of testicular carcinoma in situ by fetal germ cells. *J Pathol* 2004;203:849–57.

-Hutchison GR, Scott HM, Walker M, McKinnell C, Ferrara D, Mahood IK, Sharpe RM. Sertoli Cell Development and Function in an Animal Model of Testicular Dysgenesis Syndrome1. 2008. *Biol Reprod.* 78(2):352-60.

- Hutson J, Li R, Vikraman J, Loebenstein M. What Animal Models of Testicular Descent and Germ Cell Maturation Tell Us about the Mechanism in Humans. 2016, *Eur J Pediatr Surg* 26:390–398.

- Hutson JM, Donahoe PK. The hormonal control of testicular descent. 1986, *Endocr Rev.* 7:270.

- Hutson JM, Southwell BR, Li R. The Regulation of Testicular Descent and the Effects of Cryptorchidism. 2013, *Endocr Rev* 34:725–752.

- Hutson, J. M., Li, R., Southwell, B. R., Newgreen, D., & Cousinery, M. Regulationoftesticular descent. *Pediatric Surgery International.* 2015, 31,317–325.

-Hutson MJ, Li R, Southwell RB, Petersen LB, Thorup J, Cortes D. Germ cell development in the postnatal testis: the key to prevent malignancy in cryptorchidism?. 2012. *Front Endocrinol (Lausanne).* 3:176.

- Illingworth PJ, Groome NP, Byrd W, Rainey WE, McNeilly AS, Mather JP, Bremner WJ. Inhibin-B: a likely candidate for the physiologically important form of inhibin in men. 1996. *J Clin Endocrinol Metab.* 81:1321–1325.

- Izquierdo MA, Van der Valk P, Van Ark-Otte J, Rubio G, Germa-Lluch JR, Ueda R, Scheper RJ, Takahashi T, Giaccone G. Differential expression of the c-kit proto-oncogene in germ cell tumours. 1995. *J Pathol.* 177:253–258.

- Ikinger U, Wursten K, Terway B, Mohring K. Microcalcifications in testicular malignancy: Diagnostic tool in occult tumour? *Urol.* 1982, 19:525–8.
- Jorgensen N, Rajpert-De Meyts E, Graem N, Muller J, Giwercman A, Skakkebaek NE. 1995. Expression of immunohistochemical markers for testicular carcinoma in situ by normal human fetal germ cells. *Lab Invest.* 72:223–31.
- Kang JL, Rajpert-De Meyts E, Giwercman A. La asociación de carcinoma testicular in situ con microcalcificaciones intratubulares. *J Urol Pathol.* 1994; 2: 235–42.
- Kojima, Y., Mizuno, K., Kohri, K., & Hayashi, Y. 2009, Advances in molecular genetics of cryptorchidism. *Urology*, 74, 571–578.
- Kollin C, Stukenborg JB, Nurmio M, Sundqvist E, Gustafsson T, Söder O, Toppari J, Nordenskjöld A, Ritzén EM. Boys with undescended testes: endocrine, volumetric and morphometric studies on testicular function before and after orchidopexy at nine months or three years of age. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012, 97(12):4588-4595.
- Kolon TF, Herndon CD, Baker LA, Baaskin LS, Baxter CG, Cheng EY, Díaz M, Lee PA, Seashore CJ, Tasian Ge, Barthold JS. Evaluation and treatment of Cryptorchidism: AUA guideline. *Journal of Urology.* 2014;192:337–345.
- Kraft KH, Canning DA, Snyder HM 3rd, Kolon TF. Undescended testis histology correlation with adult hormone levels and semen analysis. *J Urol.* 2012, 188(4 Suppl):1429-1435.
- Kristensen DM, Sonne SB, Ottensen AM, Perrett RM, Nielsen JE, Almstrup K, Skakkebaek NE, Leffers H, Rajpert-De Meyt E. Origin of pluripotent germ cell tumours: the role of microenvironment during embryonic development. *Mol Cell Endocrinol* 2008, 288 (1-2): 111-8.

- Kuiru-Hänninen, T., Koskenniemi, J., Dunkel, L., Toppari, J., & Sankilampi, U. Postnatal Testicular Activity in Healthy Boys and Boys With Cryptorchidism. *Frontiers in endocrinology*. 2019. 10, 489.
- Landero DA, Viguera VRM, Yokoyama RE, Arechaga OE, Rojas CJL, Jimenez TF, Chavez SM. Epigenetic and risk factors of testicular germ cell tumors: a brief review. 2017, *Frontiers In Bioscience, Landmark*, 22, 1073-1098.
- Landero-Huerta DA, Viguera-Villasenor RM, Yokoyama-Rebollar E, Arechaga-Ocampo E, Rojas-Castaneda JC, Jimenez-Trejo F, Chavez-Saldana M. Epigenetic and risk factors of testicular germ cell tumors: a brief review. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2017 Mar 1;22:1073-1098. Review.
- Lahlou N, Roger M. Inhibin B in pubertal development and pubertal disorders. 2004. *SeminReprod Med*. 22(3):165-175.
- Liu S, Wen SW, Mao Y, Mery L, Rouleau J. Birth cohort effects underlying the increasing testicular cancer incidence in Canada. *Can J Public Health*. 1999. 90:176–180.
- Lui WY, Mruk D, Lee WM, Cheng CY. Sertoli cell tight junction dynamics: their regulation during spermatogenesis. 2003, *Biol Reprod*. 68:1087.
- Loebenstein M, Thorup J, Cortes D, Clasen-Linde E, Hutson JM. Cryptorchidism, gonocyte development, and the risks of germ cell malignancy and infertility: A systematic review. *Pediatr Surg*. 2019. S0022-3468(19)30450-6.
- Looijenga LH, Stoop H, de Leeuw HP, de Gouveia Brazao CA, Gillis AJ, van Roozendaal KE, van Zoelen EJ, Weber RF, Wolffenbuttel KP, van Dekken H, Honecker F, Bokemeyer C, Perlman EJ, Schneider DT, Kononen J, Sauter G, Oosterhuis JW. POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors. 2003. *Cancer Res*. 63:2244–2250.

- McGlynn KA, Devesa SS, Graubard BI, Castle PE. Increasing incidence of testicular germ cell tumors among black men in the United States. 2005. *J Clin Oncol*. 23(24):5757-5761.
- Main KM, et al. Flame retardants in placenta and breast milk and cryptorchidism in newborn boys. *Environmental Health Perspectives*. 2007, 115:1519–1526. doi: 10.1289/ehp.9924.
- Main KM, Mortensen GK, Kaleva MM, et al. Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age. *Environ Health Perspect*. 2006. 114(2):270–
- Markey, B. S. Rubin, A. M. Sot C.Sonnenschein: Endocrine disruptors: from Wingspread to environmental development biology. 2012, *J Steroid BiochemMol Biol*. 83, 23 244.
- Massart, F., & Saggese, G. Morphogenetic targets and genetics of un descended testis. 2010, *Sexual Development*, 4, 326–335.
- McGlynn KA, Devesa SS, Graubard BI, Castle PE. Increasing incidence of testicular germ cell tumors among black men in the United States. 2005. *J Clin Oncol*; 23(24):5757-5761.
- Mechlin CW, Kogan BA. What lessons can be learned from testicular histology in undescended testes?. *Transl Androl Urol*. 2014, 3(4):365-9. Review.
- Meachem SJ, Nieschlag E, Simoni M. Inhibin B in male reproduction: pathophysiology and clinical relevance. 2001. *Eur J Endocrinol*. 145:561–571.
- Minagawa, I., Fukuda, M., Ishige, H., Kohriki, H., Shibata, M., Park, E. Y., ... Kohsaka, T. Relaxin-like factor (RLF)/insulin-like peptide 3 (INSL3) is secreted from testicular Leydig cells as a monomeric protein comprising three domains B-C-A with full biological activity in boars. 2012. *Biochemical Journal*, 441, 265–273.

- Møller H, Cortes D, Engholm G, Thorup J. Risk of testicular cancer with cryptorchidism and with testicular biopsy: cohort study. 1998, *BMJ*. 317(7160):729.
- Moller H, Prener A and Skakkebaek NE: Testicular cancer, cryptorchidism, inguinal hernia, testicular atrophy, and genital malformations: case-control studies in Denmark. *Cancer Causes Control* 1996; 7: 264.
- Nakane A, Kojima Y, Hayashi Y, Kurokawa S, Mizuno K, Kohri K. Effect of testicular biopsy in childhood on spermatogenesis, fertility, and paternity in adulthood—a mouse model study. 2005, *Urology* 66: 682.
- Nielsen H, Nielsen M, Skakkebaek NE. The fine structure of possible carcinoma in situ in the seminiferous tubules in the testis of four infertile men. 1974. *Acta PatholMicrobiolScand A*. 82(2):235-48.
- Nishiyama T, Terunuma M, Iwashima A, Souma T, Hirahara H. Testicular microlithiasis with mediastinal choriocarcinoma: a case report. 1998, *Int. J. Urol.* 5, 301–302.
- Nistal M and Paniagua R: Testicular biopsy— contemporary interpretation. 1999, *Urol Clin North Am*. 26: 555.
- Nistal M, Paniagua R, Riestra ML, Reyes-Múgica M, Cajaiba MM. Bilateral prepubertal testicular biopsies predict significance of cryptorchidism-associated mixed testicular atrophy and allow assessment of fertility. *Am J Surg Pathol*. 2007;31(8):1269-1276.
- Nistal M, Paniagua R, Riestra ML, Reyes-Múgica M, Cajaiba MM. Bilateral prepubertal testicular biopsies predict significance of cryptorchidism-associated mixed testicular atrophy and allow assessment of fertility. 2007, *Am J Surg Pathol*. 31(8):1269-1276.
- O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER. Estrogen and spermatogenesis. 2001, *Endocr Rev* 22(3): 289-318.

- Oosterhuis JW, Looijenga LH. Testicular ger-cell tumors in broader perspective. 2005. Nat. Rev. Cancer.5: 210-222.
- Pauls K, Schorle H, Jeske W, Brehm R, Steger K, Wernert N, Buttner R, Zhou H. Spatial expression of germ cell markers during maturation of human fetal male gonads: an immunohistochemical study. Hum Reprod 2005, 21 397–404.
- Palumbo C, van Roozendaal K, Gillis AJ. Expression of the PDGF alpha-receptor 1.5 kb transcript, OCT-4, and c-KIT in human normal and malignant tissues. Implications for the early diagnosis of testicular germ cell tumours and for our understanding of regulatory mechanisms. 2002. J. Pathol. 196: 467-477.
- Paniagua R, Martinez-Onsube P, Santamaria L, Saez FH, Amat P & Nistal M. Quantitative and ultrastructural alterations in the lamina propria and Sertoli cells in human cryptorchid test. 1990. Int J Androl 13, 470-487.
- Paniagua R, Nistal M. Morphological and histometric study of human spermatogonia from birth to the onset of puberty. 1984. J. Anat. 139(Part 3), 535–552.
- Patel RP, Kolon TF, Huff DS, Carr MC, Zderic SA, Canning DA, Snyder HM 3rd. Testicular microlithiasis and antisperm antibodies following testicular biopsy in boys with cryptorchidism. 2005, J Urol. 174(5):2008-2010.
- Peterson AC, Bauman JM, Light DE, McMann LP, Costabile RA. The prevalence of testicular microlithiasis in an asymptomatic population of men 18 to 35 years old. J Urol 2001; 166: 2061–2064.
- Pinart E1, Bonet S, Briz M, Pastor LM, Sancho S, García N, Badia E, Bassols J. Morphological and histochemical characteristics of the lamina propria in scrotal and abdominal testes from postpubertal boars: correlation with the appearance of the seminiferous epithelium. 2001, J Anat. 199(Pt 4):435-48.
- Pinczowski D, McLaughlin JK, Lackgren G, Adami HO and Persson I: Occurrence of testicular cancer in patients operated on for cryptorchidism and inguinal hernia. J Urol 1991; 146: 1291.

- Purdue MP, Devesa SS, Sigurdson AJ, McGlynn KA. International patterns and trends in testis cancer incidence. 2005. *Int J Cancer*.115 (5):822-827.
- Raivio T, Toppari J, Perheentupa A, McNeilly AS & Dunkel L. Treatment of prepubertal gonadotrophin-deficient boys with recombinant human follicle-stimulating hormone. *Lancet* 1997 350 263–264.
- Raivio T1, Dunkel L. Inverse relationship between serum inhibin B and FSH levels in prepubertal boys with cryptorchidism. 1999, *Pediatr Res*, 46(5):496-500.
- Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE. The possible role of sex hormones in the development of testicular cancer. *Eur Urol* 1993; 23: 54–59.
- Rajfer J., Handelsman D.J., Swerdloff R.S., et al. Hormonal therapy of cryptorchidism. A randomized, double-blind study comparing human chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone. 1986, *N Engl J Med*. 314(8):466–70.
- Rajpert-De Meyts E. Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspects. 2006. *Hum Reprod Update*. 12: 303-323.
- Rajpert-De Meyts E, Bartkova J, Samson M, Hoei-Hansen CE, Frydelund-Larsen L, Bartek J, Skakkebaek NE. 2003. The emerging phenotype of the testicular carcinoma in situ germ cell. *APMIS*. 111(1):267-78.
- Rashid HH, Cos LR, Weinberg E, Messing EM. Microlitiasis testicular: una revisión y su asociación con el cáncer testicular. 2004. *Urol Oncol*. 22: 285–289.
- Ritzen E.M., Bergh A., Bjerknes R., et al. Nordic consensus on treatment of undescended testes. 2007, *Acta Paediatr*. 96(5):638–43.
- Robinson LL, Gaskell TL, Saunders PT, Anderson RA. Germ cell specific expression of c-kit in the human fetal gonad. 2001. *Mol Hum Reprod*. 7(9):845-852.
- Rune GM, Mayr J, Neugebauer H, Anders C & Sauer H. (1992) Pattern of Sertoli cell degeneration in cryptorchid prepubertal testes. *Int J Androl* 15, 19– 31.

- Rusnack SL, Wu HY, Huff DS, Snyder HM 3rd, Carr MC, Bellah RD, Zderic SA, Canning DA. Testis histopathology in boys with cryptorchidism correlates with future fertility potential. 2003, J Urol. 169(2):659-662.
- Shanmugasundaram R, Singh J C, Kekre NS. Testicular microlithiasis: Is there an agreed protocol?. Indian J Urol 2007;23:234-9.
- Skakkebaek NE, Berthelsen JG, Giwercman A, Müller J. Carcinoma-*in-situ* of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma. 1987, Int J Androl. 10:19–28.
- Skakkebaek NE, Berthelsen JG, Müller J. Carcinoma in-situ of the undescended testis. Urol Clin North Am, 1982; 9:377-85.
- Skakkebæk NE, Rajpert-de Meyts E, Main KM. Testicular Dysgenesis Syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. 2001, Hum Reprod. 16: 972–8.
- Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesissyndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. 2001, Hum Reprod. 16(5):972–8.
- Schöler HR, HatzopoulosAK, Balling R, Suzuki N, Gruss P. A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor. Embo J. 1989, 8:2543–2550.
- Strader CH, Weiss NS, Daling JR, Karagas MR and McKnight B: Cryptorchism, orchiopexy, and the risk of testicular cancer. 1988, Am J Epidemiol. 127: 1013.
- Strohmeier T, Peter S, Hartmann M, Munemitsu S, Ackermann R, Ullrich A, Slamon DJ. Expression of the hst-1 and c-kit protooncogenes in human testicular germ cell tumors. 1991. Cancer Res. 51(7):1811–1816.

- Strohmeier T, Reese D, Press M, Ackermann R, Hartmann M, Slamon D. Expression of the c-kit proto-oncogene and its ligand stem cell factor (SCF) in normal and malignant human testicular tissue. 1995. *J Urol.* 153(2):511–515.
- Stoop H, Honecker F, Cools M, de Krijger R, Bokemeyer C, Looijenga LH. Differentiation and development of human female germ cells during prenatal gonadogenesis: an immunohistochemical study. *Hum Reprod.* 2005;20:1466–76.
- Stoop H, Honecker F, van de Geijn GJ, Gillis AJ, Cools MC, de Boer M, Bokemeyer C, Wolffenbuttel KP, Drop SL, de Krijger RR, Dennis N, Summersgill B, McIntyre A, Shipley J, Oosterhuis JW, Looijenga LH. Stem cell factor as a novel diagnostic marker for early malignant germ cells. 2008. *J Pathol.* 216 (1):43–54.
- Sonne SB, Herlihy AS, Høie-Hansen CE, Nielsen JE, Almstrup K, Skakkebaek NE, Marks A, Leffers H, Rajpert-De Meyts E. Identity of M2A (D2–40) antigen and gp36 (Aggrus, T1A-2, podoplanin) in human developing testis, testicular carcinoma in situ and germ-cell tumours. 2006. *Virchows Arch.* 449:200–206.
- Suomi A-M, Main KM, Kaleva M, et al. Hormonal changes in 3-month-old cryptorchid boys. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006, 91(3):953–958.
- Tan MH, Eng C. Testicular microlithiasis: recent advances in understanding and management. 2011, *Nat Rev Urol.*8(3):153-63.
- Tasian GE, Hittelman AB, Kim GE, DiSandro MJ, Baskin LS. Age at orchiopexy and testis palpability predict germ and Leydig cell loss: clinical predictors of adverse histological features of cryptorchidism.2009, *J Urol.* 182(2):704-709.
- Thonneau P, Bujan L, Multigner L & Mieusset R. Occupational heat exposure and male fertility: a review. 1998, *Human Reproduction.*13 2122–2125.
- Thorsson AV, Christiansen P., Ritzen M. Eficacia y seguridad del tratamiento hormonal de la criptorquidia: estado actual de la técnica. *Acta Paediatr.* 2007; 96 (5): 628–30.

- Thorup J, Petersen BL, Kvist K, Cortes D. Bilateral undescended testes classified according to preoperative and postoperative status of gonadotropins and inhibin B in relation to testicular histopathology at bilateral orchiopexy in infant boys. 2012. J Urol.188(4 Suppl):1436-1442.
- Thorup J, Petersen BL, Kvist K & Cortes D. Bilateral undescended testes classified according to preoperative and postoperative status of gonadotropins and inhibin B in relation to testicular histopathology at bilateral orchiopexy in infant boys. 2012, J Urol 188, 1436– 1442.
- Toft G. Perfluorooctane sulfonate concentrations in amniotic fluid, biomarkers of fetal leydig cell function, and cryptorchidism and hypospadias in Danish boys (1980–1996) 2016, Environmental Health Perspectives.124:151–156.
- Tower J (2012) Stress and stem cells. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol 1:789–802.
- Trussell JC and Lee PA: The relationship of cryptorchidism to fertility. 2004, Curr Urol Rep,5: 142
- Verkauskas G, Malcius D, Dasevicius D, Hadziselimovic F. Histopathology of Unilateral Cryptorchidism. 2019. Pediatr Dev Pathol. 2019. ;22(1):53-58.
- Viguera VRM, Moreno MN, Reyes TG, Merchant LH. Androgen receptor and calcitonin gene-related peptide in neurons of the genitofemoral nerve during testicular descent induced with Human Chorionic Gonadotropin. 2003, ArchMed Res. 34: 166-170.
- Viguera VRM, Moreno MNA, Reyes TG, Merchant LH. Gubernacular fibroblasts express the androgen receptor during testis descent in cryptorchid rats treated with human chorionic gonadotrophin. 2004, Urol Res. 32: 386-390.
- Virtanen HE, Bjerknes R, Cortes D, Jørgensen N, Rajpert-De Meyts E, Thorsson AV, Thorup J, Main KM. Cryptorchidism: classification, prevalence and long-term consequences. 2007, Acta Paediatr. 96(5):611-616.

- Von der Maase H, Rørth M, Walbom-Jørgensen S. Carcinoma in situ on contralateral testis in patients with testicular germ cell cancer: study of 27 cases in 500 patients. 1986. *BMJ*. 293: 1398-1401.
- Wang Y, Culty M. Identification and distribution of a novel platelet-derived growth factor receptor beta variant: effect of retinoic acid and involvement in cell differentiation. 2009. *Endocrinology*. 148(5):2233-22350.
- Wartenberg H. Differentiation and development of the testes. In *The testis*. 1981. Ed. New York: Raven Press pp 39-81.
- Wensing CJ. Testicular descents in the rat and a comparison of this process in the rat with that in the pig. 1986, *Anat Rec*. 214(2):154-160.
- Wilkerson ML, Bartone FF, Fox L et al: Fertility potential: a comparison of intra-abdominal and intracanalicular testes by age groups in children. 2001, *Horm Res*, 55: 18
- Winter TC, Kim B, Lowrance WT, Middleton WD. Testicular Microlithiasis: What Should You Recommend? *AJR* 2016, *Am J Roentgenol*. 206(6):1164-9.
- Wu J, Jester WF Jr, Orth JM. Short-type PB-cadherin promotes survival of gonocytes and activates JAK-STAT signalling. 2005. *DevBiol*. 284(2):437-450.
- Yamamoto K, Tojo A, Aoki N, Shibuya M. Characterization of the promoter region of the human c-kit proto-oncogene. 1993. *Jpn J Cancer Res*. 84(11):1136-1144.
- Yasuda H, Galli SJ, Geissler EN. Cloning and functional analysis of the mouse c-kit promoter. 1993. *Biochem Biophys Res Commun*. 191(3):893-901.
- Young J, Couzinet B, Chanson P, Brailly S, Loumaye E, Schaison G. Effects of human recombinant luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in patients with acquired hypogonadotropic hypogonadism: study of Sertoli and Leydig cell secretions and interactions. 2000, *J Clin Endocrinol Metab*. 85(9):3239–3244.

- Young J, Couzinet B, Chanson P, Brailly S, Loumaye E, Schaison G. Effects of human recombinant luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in patients with acquired hypogonadotropic hypogonadism: study of Sertoli and Leydig cell secretions and interactions. 2000, *J Clin Endocrinol Metab.* 85(9):3239–3244.
- Zeeman AM, Stoop H, Boter M, Gillis AJ, Castrillon DH, Oosterhuis JW, Looijenga LH. VASA is a specific marker for both normal and malignant human germ cells.2002. *Lab Invest.* 82(2):159-166.
- Zhao GQ, Garbers DL. Male germ cell specification and differentiation.*Dev Cell.* 2002, 2(5):537-547.
- Zhang J, Tam WL, Tong GQ, Wu Q, Chan HY, Soh BS. Sall4 modulates embryonic stem cell pluripotency and early embryonic development by the transcriptional regulation of Pou5f1. 2006, *Nat Cell Biol.* 8:1114–23
- Zhou Q, Chipperfield H, Melton DA, Wong WH. A gene regulatory network in mouse embryonic stem cells. 2007, *Proc Natl Acad Sci USA.* 104:16438–43.
- Zhou Q, Li Y, Nie R, Friel P, Mitchell D, Evanoff RM, Pouchnik D, Banasik B, McCarrey JR, Small C, Griswold MD.Expression of stimulated by retinoicacidgene8 (Stra8) and maturation of murinegonocytes and spermatogoniainduced by retinoicacid in vitro. 2008. *Biol Reprod.* 78(3):537-545.
- Zheng, T., Holford, T. R., Ma, Z., Ward, B. A., Flannery, J. and Boyle, P. 1996. Continuing increase in incidence of germ-cell testis cancer in young adults: experience from Connecticut, USA, 1935e1992 *International Journal of Cancer,* 65, 723e729.
- Zimmermann S, Steding G, Emmen JMN, Brinkmann AO, Nayernia K, Holstein AF. Targeted disruption of the Insl3 gene causes bilateral cryptorchidism. 1999, *Mol Endocrinol.* 13:681.

- Zivkovic D & Hadziselimovic F. (2009) Development of Sertoli cells during mini-puberty in normal and cryptorchid testes. Urol Int 82, 89– 91.

13.0 ANEXOS

ANEXO 1 CARTA DE CONSENTIMIENTO

Instituto Nacional de Pediatría

“CARACTERIZACIÓN DE MARCADORES TEMPRANOS DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DEL TUMOR TESTICULAR DE CÉLULAS GERMINALES EN UN GRUPO DE PACIENTES CON CRIPTORQUIDIA”

INVESTIGADOR PRINCIPAL Dra. Rosa María Viguera Villaseñor

Documento de Consentimiento Informado para padres o tutores de menores con diagnóstico confirmado de criptorquidia participantes en el estudio morfológico y hormonal.

Paciente No.____ Expediente No.____ Ciudad de México a __ de _____ de 201__

El Instituto Nacional de Pediatría a través del servicio de Urología y el Laboratorio de Biología de la Reproducción me han invitado a participar en un estudio de investigación. Es necesario que usted decida si su hijo participará o no en el estudio. Lea cuidadosamente este formato y pregunte al médico del estudio cualquier duda al respecto. El médico urólogo colaborador de este estudio me ha explicado que la participación de mi hijo será como paciente con diagnóstico de criptorquidia abdominal aislada, padecimiento que se presenta sin una causa aparente y para tratar de estudiar algunos factores que nos indiquen si tiene riesgo a desarrollar cáncer testicular, por lo que me explico que:

1) La criptorquidia es una enfermedad que se puede presentar en algunos de los recién nacidos cuando uno o ambos testículos no descendieron a la bolsa escrotal. Se puede relacionar con distintos problemas a largo plazo, como puede ser infertilidad (incapacidad para tener hijos en el futuro), así como un aumento en la posibilidad de presentar cáncer de testículo. El riesgo de cáncer de testículo en los pacientes con criptorquidia es de 6.2 a 18.6 por cada 10,000 habitantes, a diferencia de la población general (pacientes sin criptorquidia), el cual es de 0.86 por cada 10,000 habitantes. Esto no significa que el paciente con criptorquidia forzosamente presentará problemas en la fertilidad o cáncer de testículo, solamente significa que tiene un mayor riesgo comparado con pacientes sin criptorquidia.

2) Se trata de un estudio clínico cuyo objetivo es conocer qué grupo de pacientes con criptorquidia (clasificados de acuerdo a sus concentraciones hormonales) tiene células testiculares con riesgo de desarrollar neoplasia intratubular de células germinales. Esta neoplasia intratubular de células germinales es una enfermedad que aparece antes del cáncer testicular relacionado a criptorquidia.

3) Se requiere obtener una muestra de 4 ml de sangre periférica del niño (brazo), con riesgo mínimo de daño físico y nulo de daño irreversible. Al momento de realizar la orquidopexia (que es el nombre que se le da a la cirugía para descender el o los testículos a la bolsa escrotal) el cirujano obtendrá una muestra de aproximadamente 2.0 mm^3 de testículo y no le causará dolor. Esta biopsia únicamente se tomara, con todas las medidas necesarias, en niños con testículo superior a 1 cm en su eje mayor. Se debe aclarar que la toma de esta muestra testicular no se efectúa de forma rutinaria en nuestro país, sin embargo está bien documentado que son más los beneficios que las posibilidades de daño, con este proyecto estaremos en posibilidad de **inferir el riesgo** del paciente con criptorquidia aislada abdominal a desarrollar cáncer testicular en edad adulta. Se ha reportado que la toma de biopsia testicular puede generar atrofia del testículo (aunque hay que considerar que la criptorquidia como tal, también puede desarrollar atrofia testicular) sin embargo cuando se realiza antes de la pubertad (momento en el cual inicia la maduración de los órganos sexuales) no genera daño secundario. Se debe hacer un seguimiento del paciente ya que en raras ocasiones puede ocasionar sangrado e infección

que de ser el caso será corregido de inmediato por el médico urólogo (Dr. Juan Osvaldo Cuevas Alpuche al teléfono 1084 0900 ext. 1272. El material que se utilizará es nuevo y desechable, y los procedimientos efectuados, como los materiales utilizados para el estudio, no tendrán costo alguno agregado a otros tratamientos necesarios de mi atención y prescritos por otros médicos.

Los beneficios no son propios del paciente pero si del proyecto de investigación en curso y podría aportar información sobre factores hormonales involucrados en el riesgo y susceptibilidad a presentar cáncer testicular. Aunque en algunos casos, podrían permitir identificar el riesgo de desarrollar tumor. Los datos científicos han demostrado que los beneficios superan los riesgos, ya que si se detectara la presencia de células con riesgo a daño, el paciente tendrá una estrecha vigilancia por el médico tratante o será transferido a la Institución adecuada, ya que el seguimiento se realizará hasta que se cumplan los 18 años de edad.

4) En este estudio participarán 23 pacientes con criptorquidia y toda la información obtenida será confidencial y la publicación que se genere no va a incluir el nombre del participante. Las muestras serán clasificadas con el número del proyecto y números consecutivos del 1 al 23

5) Podré abandonar voluntariamente el estudio en el momento que mi hijo o yo lo decidamos y las muestras serán desechadas siguiendo los procedimientos debidos, sin que ello repercuta en la atención que se le brinde a mi hijo 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 incluir la muestra de mi hijo en 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. Al final del estudio y una vez publicado el artículo que se genere, las muestras serán desechadas siguiendo los procedimientos debidos.

En caso de detectar algún resultado positivo relacionado con la salud del paciente se solicitará una cita con el médico genetista y el urólogo, involucrados en el proyecto, para

otorgar un asesoramiento genético adecuado y un seguimiento bajo vigilancia clínica y estudios de gabinete, de ser necesarios.

7) Los hallazgos de la investigación serán presentados en Congresos Nacionales e Internacionales, así como en publicaciones científicas.

8) 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 al teléfono 1084 0900 ext. 1272, la Dra. Rosa María Viguera Villaseñor al teléfono 1084 0900 ext.1453 investigadores del proyecto y la Dra. Matilde Ruiz García Presidente del Comité de Ética Teléfono 10840900 ext. 1581 en caso de que tenga dudas sobre los derechos del participante.

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.

Al firmar a continuación, acepto que:

He leído este formato de consentimiento.

He tenido la oportunidad de formular preguntas y éstas han sido contestadas.

Entiendo que la participación de mi hijo es voluntaria.

Acepto que mi hijo participe en el estudio

Doy autorización para que se use y comparta la información referente a mi hijo como se describe en este formato

Puedo elegir que mi hijo no participe en el estudio o que lo abandone en cualquier momento, comunicándolo al Doctor del estudio.

Podría ser que mi hijo tenga que abandonar el estudio sin mi consentimiento en caso de requerir otro tratamiento, si sufre alguna lesión relacionada con el estudio o si no sigue el plan de tratamiento del estudio.

Nombre del menor

Nombre y firma del padre

Nombre y firma de la madre

Nombre y firma de la persona que conduce
la revisión del Consentimiento

TESTIGOS

Nombre y firma de Testigo 1

(Es conveniente que anote su dirección)

Relación que tiene con el participante

Nombre y firma de Testigo 2

(Es conveniente que anote su dirección)

Relación que tiene con el participante

Recibí copia de este consentimiento

ANEXO 2

INDICE HISTOPATOLÓGICO

<i>Alteraciones histológicas</i>	<i>Puntaje</i>
<i>a) Plegamiento de lámina basal</i>	1
<i>b) Descamación celular</i>	1
<i>c) Vacuolización epitelial</i>	2
<i>d) Cincisio celular</i>	2
<i>e) Picnosis</i>	2
<i>f) Tubos sin espermátides</i>	3
<i>g) Tubos sin espermatoцитos</i>	4
<i>h) Tubos sin espermatogonias</i>	5
<i>i) Ausencia de todo tipo celular</i>	5

ANEXO 3

CANTIDAD DE MUERTE CELULAR

	<i>Puntaje</i>
<i>a) Sin muerte celular</i>	0
<i>b) 1-5 células en muerte</i>	1
<i>c) Más de 5 células en muerte</i>	2
<i>d) Todas células del túbulo en muerte</i>	3

ANEXO 4

CLASIFICACIÓN DE ESPERMATOGÉNESIS POR TÚBULO

Característica	Puntaje
a) Ausencia de túbulos seminíferos	1
b) No hay células germinales en los túbulos (síndrome de solo células de sertoli)	2
c) Espermatogénesis incompleta, no más allá de espermatocitos	3
d) Todos los estadios de células germinales presentes, pero hay evidente disminución en el número de células germinales.	4
e) Espermatogénesis normal	5

ANEXO 4

CLASIFICACIÓN DE MICROLITIASIS

Característica	Puntaje
a) Sin microlitiasis	0
b) Muerte celular (no en el centro del tubo/cordón seminífero).	1
c) Muerte celular (en el centro del tubo/ cordón seminífero).	2
d) Muerte y lisis celular	3
e) Microlitiasis	4