



**Universidad Nacional Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa**  
**División de Ciencias Biológicas de la Salud**

**Perfil de expresión de los miRNAs: miR-371-373 y miR-367 en pacientes con  
criptorquidia aislada**

**T E S I S**

Que para obtener el grado en  
**Maestra en Biología Experimental**

Presenta

**Biól.Exp. Fabiola García Andrade**  
2173801648

**COMITÉ TUTORAL**

Co-Directora Externa

Dra. Margarita Dolores Chávez Saldaña

Co-Director Interno

Dr. Iván Uriel Bahena Ocampo,

Asesora externa

Dra. Elena Aréchaga Ocampo,

CDMX

noviembre 2019

“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 63770.

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

La realización de este trabajo se logró con el apoyo económico del Programa E-022 Investigación y Desarrollo Tecnológico en Salud otorgado al Laboratorio de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Pediatría S.S. y al proyecto general titulado "**PERFIL DE EXPRESIÓN DEL CLUSTER miR-371-373 Y DEL miR-135a ASOCIADOS A TGCT EN PACIENTES CON CRIPTORQUIDIA AISLADA**", con número de registro INP 63/2018 del cual deriva esta Tesis.

Agradezco enormemente a la Dra. Margarita Dolores Chávez Saldaña del Laboratorio de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Pediatría, por el apoyo brindado para la realización de este trabajo. También al apoyo interinstitucional del Instituto Nacional de Cancerología, con la colaboración del Dr. José Díaz Chávez y bajo la Co tutoría del Dr. Iván Bahena Ocampo perteneciente al Laboratorio de Expresión Génica de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa y de la Asesoría de la Dra. Elena Aréchaga Ocampo del Laboratorio de Biología Celular de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

Primeramente quisiera agradecer a Dios por permitirme realizar este proyecto.

Me gustaría agradecer en especial a la Dra. Margarita Chávez por todo el apoyo que me ha brindado durante mi formación académica, por la paciencia, el tiempo, los conocimientos y sus consejos tanto a nivel académico como en lo personal.

Al Dr. Iván Bahena y a la Dra. Elena Aréchaga por aceptarme como alumna y por su gran apoyo y consejos durante el proyecto, muchas gracias.

Un agradecimiento especial a la Dra. Vanessa Villegas Ruiz por su valiosa ayuda en las técnicas experimentales utilizadas en el proyecto.

A la Dra. Rosy Viguera por sus comentarios y consejos para la realización de la tesis.

Gracias a todos los demás miembros del laboratorio: Sr. Pedro, Daniel, Dr. Julio, Andrea, Silvia, Fany, Areli, Irene, Zaira y Tania, que siempre me han ayudado en lo que he necesitado y por haber compartido conmigo esta etapa de mi vida.

También quiero agradecer al Dr. Diddier Prada (INCan), por su ayuda y sugerencias sobre el proyecto.

Muchas gracias al comité del Posgrado en Biología Experimental y al Jurado evaluador de este proyecto, por sus comentarios y correcciones, contribuyendo a mi formación académica.

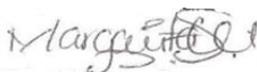
Muchas gracias a mis padres, a mis hermanos y a mi hija, por ser una familia tan unida y apoyarnos en todo.

A mi hermoso Diego por ser mi alma gemela, por estar siempre a mi lado en todas las situaciones de la vida y brindarme su compañía y amor.

Por último quiero agradecer a Daniel Ramírez K., por el apoyo y la amistad que siempre me ha brindado, muchas gracias por estar en mi vida, te quiero.

**Perfil de expresión de los miRNAs: miR-371-373 y miR-367 en pacientes con  
criptorquidia aislada**

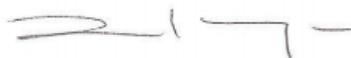
VISTO BUENO DEL COMITÉ TUTORAL



Co-Directora Externa  
Dra. Margarita Chávez Saldaña  
Investigador en Ciencias Médicas "D"  
Laboratorio de Biología de la Reproducción, INP.  
Tel. 5543392664  
[mdoloreschs@gmail.com](mailto:mdoloreschs@gmail.com)



Co-Director Interno  
Dr. Iván Uriel Bahena Ocampo,  
Investigador Asociado "C"  
Laboratorio de Expresión Génica, CBS,  
UAM-Iztapalapa.  
Tel. 5543636470,  
[ivan.bahena@gmail.com](mailto:ivan.bahena@gmail.com)



Asesora Externa  
Dra. Elena Aréchaga Ocampo,  
Profesor-Investigador Titular "C"  
Laboratorio de Biología Celular, DCNI,  
UAM-Cuajimalpa.  
Tel. 5513220490,  
[e\\_arechaga@hotmail.com](mailto:e_arechaga@hotmail.com)

## RESUMEN

La criptorquidia (CO; OMIM # 219050) o el no descenso testicular, es un padecimiento urogenital que se presenta en varones recién nacidos vivos, a pesar de ser una malformación leve, tiene repercusiones en la salud del varón en la edad adulta. Los individuos con CO presentan un riesgo relativo general (RR) de 4.8 (con intervalo de confianza del 95% 4.0-5.7) de desarrollar el tumor testicular de células germinales, en relación a la población general (TGCT, OMIM#273300). Hasta la fecha la relación de la CO y el TGCT está establecida clínicamente, sin embargo, la relación a nivel molecular aún se desconoce. Aunque se han estudiado factores genéticos, de manera independiente tanto para la CO como para el TGCT, hasta ahora hay inconsistencias al respecto, y aún no se ha descrito un factor genético que relacione a ambas patologías. Por lo que resulta de gran interés identificar factores genéticos en común que nos apoyen a establecer esta relación y un diagnóstico temprano a pacientes en riesgo como los pacientes con CO. Dentro de estos factores genéticos podemos considerar a los microRNAs (miRNA), que se han estudiado como biomarcadores relacionados al TGCT, y llegan a funcionar como *cluster*, entre ellos están el 371-373 y el miR-367 que apoyan con la predicción del riesgo a desarrollar TGCT, a través de métodos no invasivos, **Objetivo.** En este trabajo nos propusimos determinar los niveles de expresión de los miR-371-373 y del miR-367 relacionados con el desarrollo al TGCT en pacientes pediátricos con criptorquidia. **Material y Métodos.** Se evaluó la expresión de los miRNAs maduros del *cluster* miR-371-373 y del miR-367 mediante qRT-PCR en tiempo real de 12 muestras de tejido

embebido en parafina de cada uno de los tres grupos de estudios, 1) pacientes pediátricos con CO aislada, 2) pacientes con TGCT con antecedentes de CO y 3) un grupo control de individuos sanos. Finalmente se realizó una predicción de genes blancos regulados por los miR-361-373 y del miR-367

**Resultados:** Se determinó que el *cluster* miR-371-373 presentó niveles de expresión similar entre las muestras de pacientes con CO y el grupo control, mientras que el nivel de expresión del miR-367 mostró diferencias significativas entre los pacientes con CO en relación al grupo control, en tanto que el grupo de TGCT mantuvo un perfil de expresión elevado en todos los miRNAs analizados. Al realizar la predicción de genes blancos regulados por los miR analizados se identificó que el gen IGF1R es regulado por los miR-371, 372 y 367, y además se encuentra relacionado con el desarrollo del TGCT. **Conclusión.** El miR-367 presentó los niveles más altos en los pacientes con CO y en los pacientes de TGCT. Por lo que un análisis más profundo de la participación de estos miRNA podría resultar en la obtención de un biomarcador pronóstico para los pacientes con un alto riesgo de desarrollar el TGCT.

## ABSTRACT

Cryptorchidism (CO; OMIM # 219050) or non-testicular descent, is a urogenital condition that occurs in live newborns. Despite being a mild malformation, has an impact on the health of the male in adulthood. Individuals with CO present a general relative risk (RR) of 4.8 (with 95% confidence interval 4.0-5.7) of developing the testicular germ cell tumor, in relation to the general population (TGCT, OMIM # 273300). To date, the relationship between CO and TGCT is clinically established, however, the relationship at the molecular level is still unknown. Although genetic factors have been studied, independently for both CO and TGCT, so far there are inconsistencies in this regard, and a genetic factor that relates both pathologies has not yet been described. Therefore, it is of great interest to identify genetic factors in common that allow us to establish this relationship and an early diagnosis of at-risk patients such as patients with CO. Within these genetic factors we can consider the microRNAs (miRNA), which have been studied as biomarkers related to TGCT, and become functioning as *clusters*, among them are 371-373 and miR-367 that support with the prediction of risk to develop TGCT, through non-invasive methods, **Objective.** In this work we set out to determine the expression levels of miR-371-373 and miR-367 related to the development of TGCT in pediatric patients with cryptorchidism. **Material and methods.** Expression of mature miRNAs of the miR-371-373 cluster and miR-367 was evaluated by real-time qRT-PCR of 12 samples of paraffin embedded tissue from each of the three study groups, 1) pediatric patients with CO isolated, 2) patients with TGCT with and without a history of CO and 3) a control group of healthy individuals. Finally, a prediction of target genes regulated by

miR-361-373 and miR-367 was made **Results:** It was determined the miR-371-373 cluster showed similar expression levels between the samples of patients with CO and the control group, while expression levels of miR-367 showed significant differences between patients with CO and the control group, while the TGCT group maintained a high expression profile in all miRNAs analyzed. When predicting white genes regulated by the analyzed miRs, we identify that the IGF1R gene is regulated by miR-371, 372 and 367, and is also related to the development of the TGCT. **Conclusion.** The miR-367 presented the highest levels in patients with CO and in patients with TGCT. Therefore, a deeper analysis of the participation of these miRNAs could result in obtaining a prognostic biomarker for patients with a high risk of developing the TGCT.

## ÍNDICE

1.	Introducción	12
1.1	Criptorquidia	12
1.2	Tumor testicular de células germinales	15
1.3	MicroRNAs	18
1.3.1.	Biogénesis de miRNAs	19
1.3.2.	Regulación de miRNAs	21
1.3.3.	Localización de miRNAs	22
1.3.4	miRNAs en el cáncer	23
2	Antecedentes	24
3.	Planteamiento del problema	29
3.1	Justificación	30
3.2	Hipótesis	31
3.3	Objetivo General	31
3.4	Objetivos Particulares	31
4	Material y Métodos	32
4.1	Captación de pacientes	32
4.2	Criterios de Selección	32
4.2.1	Criterios de inclusión	32
4.2.2	Criterios de exclusión	33
4.3	Extracción de miRNAs de FFPE	33
4.4	Obtención de cDNA por RT-PCR	35
4.5	Cuantificación de los miRNAs por RT-qPCR	37

4.6	Predicción de los genes blanco	39
4.7	Análisis Estadístico	40
5	Resultados	40
5.1	Evaluación de la extracción de miRNAs	40
5.2	Cuantificación por RT-qPCR de los miRNAs del <i>cluster</i> miR-371-373 y miR-367 y normalización con respecto a RNU44 y RNU6B	41
5.3	Análisis ontológico del miR-371-373 y del miR-367	52
6	Discusión	55
7	Conclusión	59
8	Referencias	60

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 CRIPTORQUIDIA

El término criptorquidia (CO; OMIM # 219050) se deriva de los vocablos griegos "kryptos" que significa oculto y "orchis" que significa testículo (Kurpysz, Havryluk, Nakonechnyj, Chopyak y Kamieniczna, 2010), es una condición anormal que se define como la ausencia de uno o ambos testículos en el escroto. Es considerada parte del síndrome de disgenesia testicular aunada a la hipospadia, infertilidad y cáncer testicular (Fawzy, Hussein, Mahmoud, Mahmoud y Khairy, 2015). La CO es de gran trascendencia en la edad pediátrica (Wei et al., 2018), debido a su frecuencia y a las posibles repercusiones en edad adulta, por considerarse un factor de riesgo de infertilidad y del tumor testicular de células germinales [TGCT; por sus siglas en inglés; *testicular germ cell tumors* (MIM 273300)] (Ferguson y Agoulnik, 2013; Gurney et al., 2017). Con base en su etiología, la CO puede presentarse como parte de alguno de los más de 250 síndromes, ya sea cromosómicos o mendelianos, o como una CO aislada o idiopática (Foresta, Zucarello, Garolla y Ferlin 2008; Urh y Kunej, 2016). La CO se presenta de forma unilateral o bilateral, y con base en la localización de los testículos en el canal de descenso se clasifica en: 1) abdominal 2) inguinal y 3) ectópico, fuera de la vía normal del descenso (Figura 1) (Hutson, Balic, Nation y Southwell, 2010).

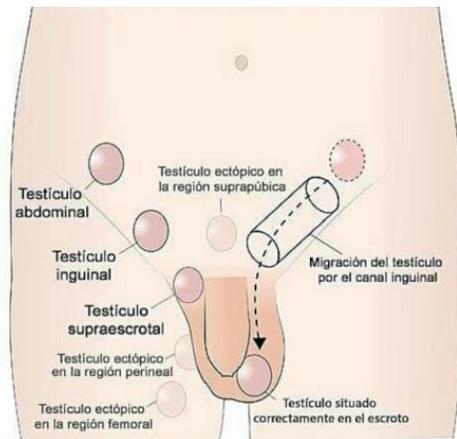


Figura 1. Posición testicular. El testículo con criptorquidia puede encontrarse en el trayecto normal del descenso testicular o puede encontrarse fuera del trayecto llamándose testículo ectópico. <http://www.instazu.com/media>

A pesar del amplio conocimiento de la fisiología testicular, la etiología de la falla en el descenso testicular es desconocida, sin embargo se considera una patología multifactorial (Massart y Saggese, 2010), en la que pueden interferir factores endócrinos, anatómicos, ambientales y genéticos; éstos últimos han sido estudiados ampliamente, desde etapas muy tempranas del desarrollo embrionario, para una mejor comprensión de la fisiopatología de la enfermedad (Ashley, Ashley, Barthold, Tomas y Kolon, 2010; Fawzy et al., 2015).

La CO es una falla congénita con una prevalencia variable entre una población y otra, reportándose una variabilidad del 2.4 al 9% en Dinamarca y Finlandia respectivamente (Komarowska, Hermnowicz y Debek, 2015; Grinspon, Gottlieb, Bedecarrás y Rey, 2018). En México, hasta la fecha no se cuenta con estudios epidemiológicos contundentes; aunque a nivel mundial se reporta entre 1.6% y 9%, de acuerdo a estudios prospectivos en niños a término (Virtanen et al., 2007; Gurney et al., 2017).

Se ha reportado que en niños prematuros y con bajo peso al nacer son susceptibles a presentar criptorquidia, pero aún no se ha identificado el origen, se postula que

varios factores genéticos pueden estar involucrados y afectar el descenso testicular; en algunos casos de CO en humanos se sugiere que son atribuidos a defectos genéticos; estudios de asociación han demostrado que alteraciones en los genes INSL3, LGR8, HOXA10 y AR pueden ser responsables del no descenso testicular, aunque aún se desconoce su etiología (Kojima, Mizuno, Kohri y Hayashi, 2009).

Se ha sugerido que el origen celular de los TGCT en pacientes con CO podría encontrarse en los gonocitos (células embrionarias), que no consiguen diferenciarse en espermatogonias en los primeros meses de vida (Foresta et al., 2008; Hutson et al., 2010). Pacientes con CO presentan un riesgo relativo general (RR) de 4.8 (con intervalo de confianza del 95% 4.0-5.7) de desarrollar el TGCT, en relación a la población general (TGCT, OMIM#273300) (Dieckmann y Pichlmeier, 2004; Kratz, Mai y Greene, 2010), sin embargo, la relación entre CO y TGCT aún no es muy clara.

En la CO unilateral el incremento del riesgo de TGCT es mucho más bajo en el testículo contralateral que en el ipsilateral (riesgo relativo [RR] de cáncer testicular en testículos criptorquídicos: 6.33, 95% CI 4.30–9.31; testículo contralateral RR 1.74, 95% CI 1.01–2.98) lo que sugiere una relación entre la criptorquidia y el cáncer testicular, principalmente como una manifestación variable de un factor de riesgo compartido, en lugar de una anomalía general que afecta por igual a ambos testículos (Gurney et al., 2017). Por lo que, la CO puede ser el primer síntoma de una alteración en donde el TGCT y la infertilidad podrían ser manifestaciones de un mismo síndrome (Skakkebaek, Rajpert y Main, 2001).

Así se considera que el fenotipo grave del testículo no descendido es el intrabdominal y bilateral, en donde se muestra una reducción del número de células

germinales y un mayor riesgo de desarrollar una malignidad (Tasian, Hittelman, Kim, DiSandro y Baskin, 2009). Por lo tanto, se sabe que la relación clínica entre la CO y el TGCT está bien determinada; sin embargo, no se ha establecido algún componente molecular que relacione ambas patologías, a pesar de que diversos estudios que infieren que existen factores genéticos compartidos que subyacen entre la CO y el TGCT (Ferlin et al., 2008; Gurney et al., 2017).

Una explicación alternativa es que la posición anormal del testículo, en sí misma, es directamente responsable de la infertilidad y la tumorigénesis de células germinales (Khan et al., 2014). La temperatura elevada del testículo no descendido inhibe la diferenciación de la espermatogonia, lo que resulta en una detención de la espermatogénesis, reducción del tamaño de los túbulos seminíferos, la disminución del número de células germinales. A pesar de ello, el vínculo entre la criptorquidia y el TGCT aún no es claro (Urh y Kunej, 2016).

## **1.2. TUMOR TESTICULAR DE CÉLULAS GERMINALES (TGCT)**

El cáncer testicular (CT) está representado por el tumor testicular de células germinales, esta patología puede desarrollarse en uno o ambos testículos, es una de las neoplasias genitourinarias que comprende una clase heterogénea de tumores sólidos malignos, en sus primeras etapas el tratamiento es generalmente exitoso, sin embargo, presenta un índice significativo de morbilidad y mortalidad ya que en dichas etapas es clínicamente silencioso (Huyghe, Matsuda y Thonneau, 2003).

El TGCT Se presenta generalmente en varones jóvenes, entre 15 y 45 años de edad, al igual que la CO, su incidencia ha ido en aumento en los últimos 30 años y es muy

variable en las diferentes poblaciones, reportándose incidencias altas en países desarrollados (Huyghe et al., 2003; Globocan 2018). En general el riesgo a desarrollar TGCT es mayor en poblaciones caucásicas que en la población africana y asiática (Bray, Ferlay y Devesa, 2006; Jemal et. al., 2011; Mclover, Roman, Nixon, Loveland y McLaughlin, 2014). Se ha postulado que el fondo genético de cada población juega un papel importante en la susceptibilidad del TGCT (Looijenga, Gillis, Stoop, Biermann y Oosterhuis, 2011; Mannuel, Mitikiri, Khan y Hussain, 2012; Trabert, Chen, Devesa, Bray y McGlynn, 2015).

El GLOBOCAN en el 2018 documenta una incidencia mundial de TGCT de 2.8 por cada 100,000 varones recién nacidos vivos (vrnv), en tanto que en nuestro país esta incidencia es de 11.1 por cada 100,000 vrnv (Globocan 2018). La clasificación del TGCT es compleja, el 95% del TGCT se presenta en células germinales testiculares, el resto son neoplasias no germinales extragonadales, del tipo estromales o de soporte (Winter y Alberts, 2010). El TGCT se presenta por un aumento del volumen testicular y por lo general de manera unilateral (Namiki et al., 1999; Mosbech, Rechnitzer, Brok, Meyst y Hoei, 2013; Nymann et al., 2013).

Se cree que el TGCT es derivado de células germinales que no se diferenciaron en la vida fetal (Gashaw et al., 2007). Generalmente el TGCT se clasifica en seminomas y no seminomas, aproximadamente el 55% del TGCT son seminomas, el 45% son no seminomas y el resto son variedades mixtas donde se encuentran diferencias histológicas en un mismo tumor, éstos son considerados como no seminomas, es importante distinguir entre los diferentes histotipos, pues de esto dependerá el pronóstico y el tratamiento (Sheikine et al., 2012). Algunos autores han relacionado al

seminoma como el más frecuente en pacientes CO, sin embargo, actualmente se conoce que pacientes con CO podrían desarrollar también no seminomas o incluso un tumor testicular mixto (Ferguson y Agoulnik, 2013).

Pacientes con diagnóstico de TGCT son tratados con orquiectomía (retiro del o los testículos afectados), dependiendo de la histología y el estado clínico se ofrece tratamiento de radioterapia y quimioterapia subsecuente (Oosterhuis y Looijenga, 2005; Bouljelbene et al., 2011). En tanto que el 25% de los pacientes pueden desarrollar metástasis (Horwich, Shipley y Huddart, 2006). Hasta la fecha no se cuenta con métodos disponibles para la detección y diagnóstico oportuno de éste tipo de padecimiento, a pesar de que la cuantificación de los niveles de proteínas como la alfafetoproteína (AFP), la gonadotropina coriónica humana (HCG) y lactato deshidrogenasa (LDH) son utilizados como marcadores tumorales en un 60% de los pacientes con TGCT, a nivel clínico patológico existen todavía ciertas limitantes importantes para definir el pronóstico y tratamiento oportuno e individualizado en el TGCT (Spiekermann et al., 2014; Syring et al., 2014).

Por otro lado, al igual que otros tipos de cáncer, los antecedentes familiares de TGCT aumentan el riesgo, por lo que se considera uno de los cánceres con una heredabilidad alta (con rangos de 37 a 49%) (Wan et al., 2018). El TGCT es una patología rara en donde aún se desconocen las causas por las que se puede desarrollar el TGCT, se sabe que hay factores de riesgo como el haber cursado con criptorquidia y antecedentes familiares de TGCT, si un hombre tiene un padre o un hijo con TGCT, tiene un riesgo de desarrollarlo de 4 a 6 veces más que la población general, de igual manera aumenta el riesgo de 8 a 10 veces en hermanos de

hombres con TGCT (Kratz et al., 2011). Sin embargo, los factores genéticos y polimorfismos implicados en el desarrollo del TGCT en pacientes con CO aún no son muy claras (Ferguson y Agoulnik, 2013).

En los últimos años se han estudiado los microRNA (miRNA) como una nueva clase de biomarcadores en el TGCT (Allegra et al., 2012), debido a que los biomarcadores convencionales como la  $\alpha$ -fetoproteína, la gonadotropina coriónica humana y lactato deshidrogenasa no son tan sensibles y específicos llegando a ser detectados en varios tipos de cáncer y en ocasiones en tejido sano, por lo que surgió la necesidad de contar con nuevos biomarcadores pronóstico no invasivos con especificidad y sensibilidad más alta de detectar en las primeras etapas la enfermedad (Gillis et al., 2013; Murray, 2016; Agthoven y Looijenga, 2017; Batool, et al., 2019).

### **1.3. microRNA (miRNA)**

Los miRNAs fueron descubiertos por primera vez en *Caenorhabditis elegans* en la década de 1990 (Lan, Lu, Wang y Jin, 2015). A partir de entonces se han realizado varias investigaciones de su función en el control de la regulación post-transcripcional en procesos fisiológicos y patológicos (Arroyo y Salloum, 2013).

Los miRNAs son moléculas pequeñas de RNA con una longitud promedio de 22 nucleótidos, con importantes funciones regulatorias a nivel postranscripcional, tanto en plantas como en animales (Yao, 2016). Su regulación y su función biológica no han sido descritas completamente, aunque el estudio de su red de interacción es complicado, como de muchas otras biomoléculas. Se ha documentado que juegan

un papel importante en muchas células en desarrollo y en regular muchas vías de señalización controlando la expresión génica mediante regulación negativa postranscripcional, como degradación, desestabilización o represión de la traducción mediante la unión al RNAm diana (Yao, 2016).

Los miRNAs tienen funciones regulatorias en el desarrollo, la proliferación, diferenciación, promoviendo o inhibiendo el ciclo celular, inducen la apoptosis para proteger al organismo del daño del DNA, metabolismo de grasas, diferenciación hematopoyética, en la tumorigénesis, modulando genes endógenos que controlan la expresión proteínica por escisión o represión de la traducción del RNAm (Wahid, Shehzad, Khan y Young, 2010). Los miRNA se sintetizan y procesan en el núcleo, se exportan al citoplasma donde se unen a secuencias complementarias de RNAm, modificando su expresión, a través de un complejo silenciador o inductor de RNA (*RISC, RNA-induced silencing complex*) (Cordoba, Guadarrama, Rodríguez y Hidalgo, 2014).

### **1.3.1. BIOGÉNESIS DE miRNAs**

El procesamiento de miRNAs inicia en el núcleo y termina en el citoplasma en donde efectúan sus funciones. En su mayoría son transcritos por la polimerasa II (algunos miRNAs son transcritos por la polimerasa III), produciendo una larga molécula de RNA llamada miRNA primario (pri-miRNA) de aproximadamente 1kb, formado por una estructura de forma de horquilla, que es cortada por DROSHA una RNasa tipo III junto con su cofactor DGCR8, esto resulta en una molécula de 60-70 nucleótidos

aproximadamente conocida como pre-miRNA. Este pre-miRNA es transportado mediante la exportina 5 dependiente de RAN-GTP hacia el citoplasma para finalizar su maduración.

Una vez en el citoplasma, el pre-miRNA es recortado por DICER una endonucleasa asociada a las proteínas TRBP y PACT en mamíferos, dando lugar a un RNA de doble cadena conocida como miRNA dúplex, posteriormente las cadenas se separan y sólo una de ellas se convertirá en el miRNA maduro de aproximadamente 22 nucleótidos que será cargada por el complejo ribonucleoprotéico RISC (complejo de silenciamiento inducido por RNA). El complejo RISC unido a un miRNA se le conoce como miRISC y es el responsable de la degradación o inhibición del RNAm, mientras que la otra cadena del dúplex del miRNA es degradada (Garzon, Fabbri, Cimmino, Calin y Croce, 2006; Martínez, Matelot, Vaucheret, 2011; O'Brien, Hayder, Zayed y Peng, 2018) (Figura 2).

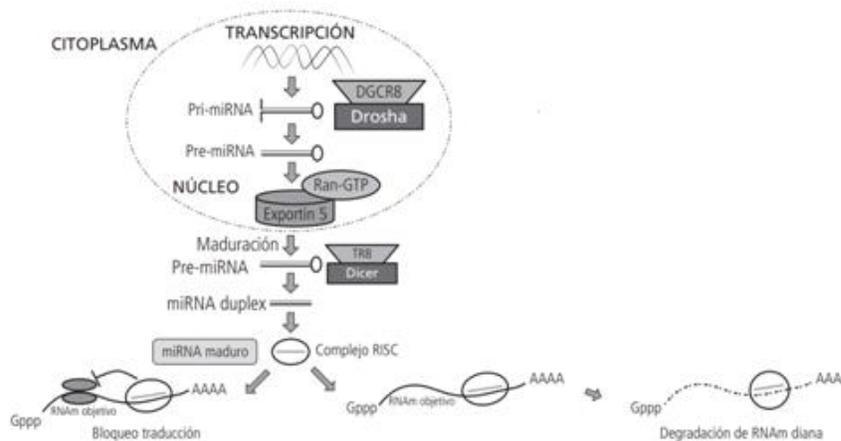


Fig. 2. Biogénesis de miRNAs. Los miRNAs son procesados en el núcleo y en el citoplasma por las RNAsas Droscha y Dicer respectivamente, para producir el miRNA maduro y junto con el complejo RISC se unirá a su RNAm blanco para inhibir su traducción o provocar su degradación (Bascuñan et al., 2014).

### 1.3.2. Regulación de miRNAs

La hebra madura 3' o 5' es seleccionada dependiendo de la estabilidad termodinámica de los extremos del miRNA de doble cadena, así que la cadena de miRNA que sea menos estable en el extremo 5' es la que será seleccionada por el complejo RISC (O'brien et al., 2018). Por último, la hebra de miRNA seleccionada se unirá junto con el complejo RISC a un RNAm de manera específica, mediante complementariedad perfecta de la secuencia semilla del miRNA la zona más importante que determina el sitio donde se va a unir con su RNAm diana; la unión de la región semilla se da del segundo nucleótido al octavo nucleótido del extremo 5'UTR del miRNA con el extremo 3'UTR del RNAm, lo que permite degradarlo o suprimir su traducción, a través del bloqueo del paso de iniciación, de la inhibición de la elongación o causando la detención del ribosoma (O'brien et al., 2018). Los sitios de unión del miRNA principalmente se realizan en la región 3'UTR del RNAm, aunque el sitio de unión también puede darse en otras regiones como el 5'UTR con efecto de silenciamiento en la expresión, unirse a regiones promotoras de genes donde inducen la traducción o también se puede unir a la secuencia de codificación del RNAm (Martínez et al., 2011; O'brien et al., 2018). Cada miRNA puede regular hasta más de 100 RNAm, así como un mismo RNAm puede ser regulado por múltiples miRNAs (Yao, 2016). Cabe señalar que de forma alternativa o no clásica se puede presentar la biogénesis para los miRNAs derivados de stem-loops procedentes de secuencias intrónicas; en este caso se procesan por Dicer pero no por Drosha (Yang y Lai, 2011). La dirección de la doble cadena del miRNA es la que

determina el nombre en su forma madura, del extremo 5' de la horquilla del premiRNA surge la cadena 5p y del extremo 3' surge la cadena 3p, ambas cadenas pueden ser transportadas por las proteínas Ago eligiendo la cadena con menor estabilidad en la parte 5' o con un Uracilo en 5', y esta se considera la hebra guía (O'brien et al., 2018). Es importante hacer mención que tanto la hebra sentido como la anti-sentido del ADN pueden funcionar como molde para producir los miRNAs (Yang y Lai, 2011).

### **1.3.3. Localización de miRNAs**

Se han registrado aproximadamente 2,588 miRNAs en humanos y actualmente se estima que hasta el 30% de los genes humanos están regulados por mecanismos dependientes de miRNAs (Polakovicová, Musil, Laczo, Hamar y Kyselovic, 2016). La expresión de los miRNAs que se encuentran en genes en zonas intergénicas es producida por sus propios elementos y la expresión de los miRNAs en regiones intrónicas o exónicas se encuentra relacionada con la del propio gen (Fernández, De Gonzalo, Diez, Dávalos y Iglesias, 2016). Los miRNAs se clasifican dependiendo de su origen, reportándose miRNAs intragénicos ubicados en los intrones de los genes huésped y los miRNAs que se encuentran ubicados en regiones exónicas (Di Leva, Garofalo y Croce, 2014).

La mitad de todos los miRNAs que han sido descubiertos se organizan en *cluster* (grupo) comúnmente formados por dos o tres grupos de genes y son transcritos como transcripciones primarias policistrónicas. Por lo que, estos *cluster* de miRNA se

encuentran relacionados entre sí y son controlados por un mismo promotor (Melo y Melo, 2014).

#### **1.3.4. miRNAs en el cáncer**

Los miRNAs se expresan diferencialmente en muestras de tumor y muestras normales, esto puede deberse a varios factores. Por ejemplo, puede tener su origen en la biogénesis, debido a mutaciones genéticas en algunos de sus componentes lo que puede alterar varias vías celulares llevando al desarrollo de enfermedades como cáncer (Garzon et al., 2006; Yao, 2016). La abundancia de pri-miRNA y la escasez de miRNA maduros se genera en el cáncer humano, lo que sugiere una alteración en su biogénesis. Se han encontrado variaciones en los genes que codifican los elementos de la maquinaria de biogénesis de los miRNA como Dicer, DGCR8, exportin 5 y TARBP2 lo que enfatiza la importancia de estos componentes en el cáncer, además se ha documentado que varios genes influyen en la biogénesis de miRNA, algunos de esos genes son p68, p72, p53 participando en la asociación de DROSHA con el pri-miRNA, y donde al ser mutado p53 suprime la actividad de Drosha ya sea secuestrando a p68 o uniéndose a p72 inhibiendo la actividad del procesamiento del miRNA disminuyendo sus niveles. Por lo que significa que existe un vínculo entre la biogénesis de miRNAs y el cáncer (Gurtner, Falcone, Garibaldi y Piaggio, 2016). Algunos miRNA se expresan de manera específica y muchos otros miRNAs se expresan de manera ubicua en tejidos (Graves y Zeng, 2012).

La ubicación de miRNA en sitios frágiles del genoma, que son sensibles a variaciones como traslocaciones, deleciones, amplificaciones y modificaciones

epigenéticas pueden afectar la expresión de los miRNA y éstos a su vez afectan el estado epigenético (Martínez et al., 2013). Los miRNA pueden actuar como miRNA oncogénicos con regulación positiva facilitando la progresión celular y regulando negativamente a genes supresores de tumores. En cambio, los miRNA supresores de tumores que se dirigen a los oncogenes, se encuentran en sitios frágiles sensibles a mutaciones, provocando que haya una disminución de los miRNA supresores de tumores y por consiguiente una sobreexpresión de sus oncogenes diana (Jansson y Lund, 2012; Khan et al., 2019).

## **2. ANTECEDENTES**

### **miRNAs como biomarcadores para el cáncer**

Los biomarcadores pueden generarse por alteraciones bioquímicas, moleculares o celulares (Wagner y Sivrastava, 2012), y son utilizados para evaluar y medir procesos biológicos normales y patogénicos, así como respuestas a fármacos (Lan et al., 2015). Los miRNAs se caracterizan por tener una gran estabilidad tanto en tejidos embebidos en parafina (FFPE) como en fluidos corporales, esto aumenta su potencial uso como biomarcador. En un estudio para evaluar la expresión de miRNA en muestras de FFPE de cáncer colorrectal con almacenamiento de 10 años, la expresión fue muy parecida a la de miRNAs de tejido fresco, por lo que se determinó que los miRNA son estables por varios años. Algunas de las explicaciones de la estabilidad de los miRNAs se basa en su pequeño tamaño, que tienden a estar menos propensos a degradación durante su procesamiento, a diferencia de otros RNAs. El estudio de los perfiles de expresión de miRNA, podría apoyar en el

establecimiento de biomarcadores específicos de pacientes con cáncer en muestras en fresco o en muestras de FFPE y proporcionar la información importante para predecir y detectar el cáncer en etapas tempranas. (Lan et al., 2015). La expresión de miRNAs ha sido estudiada con la intención de utilizarlos como biomarcadores relacionados al TGCT (Schearfer et al, 2010; Nguyen y Chang, 2017) logrando identificar miRNA sensibles y específicos para la detección del TGCT como lo son el *cluster* de miR-371-373 y el miR-367 relacionados entre sí y que se encuentran asociados al TGCT (Murray et al., 2011; Syring et al., 2014; Rijlaarsdam et al., 2014; Harel et al., 2015; Batool et al., 2019; Myklebust et al., 2019).

### **miR-371-373 y miR-367**

Los miR-371, miR-372 y el miR-373 en conjunto forman parte de un *cluster* ubicado en el cromosoma 19q13.4 y el miR-367 forma parte de un *cluster* junto con miR-302 ubicados en el cromosoma 4q25 (Anokye et al., 2011; Baroni, Arato, Mancuso, Calafore y Luca, 2019). Ambos *cluster* se expresan normalmente en células embrionarias y por ser parte de una misma familia pueden compartir varios genes objetivo, así como también varias funciones biológicas (Myklebust et al., 2019) y a pesar de formar parte de un *cluster* no se expresan de manera similar en el cáncer. Se ha visto que los miembros de estos dos *cluster* solo se expresan a niveles altos de manera coordinada en el TGCT sin importar el subtipo histológico, sitio anatómico y edad del paciente (Rijlaarsdam et al., 2014; Harel et al., 2015; Batool et al., 2019; Myklebust et al., 2019).

### **El miR-367**

Fue identificado en células madre embrionarias participando en mantener su pluripotencia y en el desarrollo de cáncer (Gao, Zhu y Dou, 2015). Se ha propuesto una sobrerregulación de éste miRNA tanto en tejido como en suero de pacientes con cáncer testicular (Gillis et al., 2013; Pelloni et al., 2016). Por lo que se ha sugerido como biomarcador en la detección del TGCT.

### **El miR-371**

En el 2011 el nivel sérico de miR-371 fue sugerido como nuevo biomarcador para seminoma y no seminoma (Murray et al., 2011). Investigaciones previas han reportado una sensibilidad alta de 80% y una especificidad del 90%, siendo el miRNA que tiene la mayor sensibilidad y especificidad en el TGCT de su grupo, con excepción del teratoma; sin embargo, el teratoma puede presentar elementos de carcinoma embrionario o de carcinoma *in situ*. (Rijlaarsdam et al., 2014; Myklebust et al., 2019). Aunque para obtener la máxima sensibilidad y especificidad es recomendable utilizar el *cluster* completo junto con el miR-367, debido a que la sobreexpresión coordinada de estos miRNA solo se ha visto en el TGCT (Murray et al., 2016).

**Los miR-372 y miR-373** participan en el desarrollo embrionario, en el crecimiento celular y su alteración promueve la metástasis del TGCT a través de la regulación negativa del gen *LATS2* (supresor tumoral grande homólogo 2), cuyo papel es inhibir el ciclo celular en respuesta a CDK2. Se ha visto que las células que expresan los miR-372 y 373 funcionan regulando a la baja a p53, esto provoca un bloqueo en la

senescencia celular inducida por RAS (McIver, Roman, Nixon y McLaughlin 2011; Syring et al., 2014; Kent y Mendell, 2006; Das, Kleppa y Haugen, 2019)

Los niveles de estos miRNA como biomarcadores disminuyen a la normalidad en sangre 24 horas después de la orquiectomía del TGCT (Spiekermann et al., 2014). Por lo que el *cluster* 371-373 y el miR-367 pueden ser marcadores específicos y sensibles al tumor de células germinales, se esperaría que estuvieran ligeramente altos en pacientes con carcinoma *in situ* (CIS, progenitor del TGCT) en comparación de niveles normales, ya que el CIS se encuentra presente en el testículo durante muchos años antes de que el tumor de células germinales se vuelva invasivo (Spiekermann et al., 2014).

El diagnóstico del TGCT se basa en estudios clínicos, de imagen y de medición de los niveles séricos de biomarcadores como alfa-fetoproteína, lactato y la beta gonadotropina corionica humana, estos marcadores solo se detectan en un 60% de los pacientes con TGCT, teniendo una baja sensibilidad general y especificidad principalmente en las primeras etapas de los pacientes con TGCT. En el 2011 se sugirió como biomarcadores al *cluster*371-373 y al miR-367 revelando su sensibilidad y especificidad como nuevos biomarcadores en el TGCT (Murray et al., 2011; Anheuser et al, 2017).

El primer reporte de la expresión de los miRNA en el TGCT mostró que el grupo miR-371-373 fue sobreexpresado en el tumor testicular (Voorhoeve et al., 2006). Los cambios en la sobreexpresión de los miRNAs se han identificado en la Neoplasia Intratubular de Células Germinales, esto puede representar un cambio molecular

temprano que podría repercutir en la patogénesis del tumor de células germinales (Murray, Huddart y Coleman, 2016).

Existen estudios que sugieren que los miR-371-373 y miR-367 podrían considerarse como biomarcadores sensibles y específicos al TGCT, incluso argumentan que éste conjunto de miRNAs no se sobreexpresa de forma coordinada en otro tipo de cáncer incluso en otras enfermedades, lo cual aumenta su potencial de biomarcadores reportados por Dieckmann et al., (2012); Gillis et al., (2013); Spiekermann et al., (2014); Rijlaarsdam et al., (2015) Murray et al., (2016), estos autores analizan la sobreexpresión de éstos miRNAs en suero y tejidos de pacientes con TGCT, contrastando niveles basales en individuos sanos. Incluso Palmer et al., (2010), así como Anthoven et al, 2016, afirman que se sobreexpresan independientemente del subtipo histológico [(tumor del saco vitelino (YST)/seminoma/embrionario carcinoma (EC)], sitio (gonadal/extragenital) o edad del paciente (pediátrico/adulto).

Otros estudios afirman que este conjunto de miR-371-373 y miR-367 participan en el desarrollo del TGCT, pues realizan este análisis en el tejido específico en pacientes con seminoma y no seminoma, corroborando un nivel de expresión alto en comparación con tejidos testiculares sanos (Voorhoeve et al.,2006); en este sentido Palmer et al., (2010), afirman ésta sobreexpresión del mismo conjunto de dichos miRNA, argumentando que regulan negativamente los RNA mensajeros implicados en vías biológicas de éste tipo de tumor.

Resulta muy interesante remarcar que algunos de los autores que analizaron la expresión de miR-371-3 como biomarcadores potenciales en TGCT, identificaron de igual manera, niveles de expresión altos de miR-367, tanto en muestras de suero

como en muestras de tejido de pacientes con seminoma y no seminoma (Murray et al., 2011; Gillis et al., 2013; Rijlaarsdam et al., 2015; Spiekermann et al., 2014; Syring et al., 2014; Murray et al., 2016). Por lo que éstos miRNAs son considerados como biomarcadores universales y altamente sensibles y específicos para el TGCT, con una alta sensibilidad para la detección de recaídas (Murray et al., 2016; Palmer et al., 2010). Así al analizar los perfiles de expresión de los miRNAs: miR-371-373 y miR-367 en los pacientes con CO y TGCT se podría aportar información fundamental, con la perspectiva de otorgar un diagnóstico temprano y tratamiento individualizado en pacientes mexicanos con CO aislada con un alto riesgo al desarrollo del tumor testicular.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La CO o no descenso testicular es el defecto congénito genitourinario al nacimiento más frecuente en varones a término. En nuestro país no se cuentan con estudios epidemiológicos de la CO y es considerada como uno de los factores de riesgo mejor documentado para el TGCT, individuos con CO presentan un riesgo relativo a nivel mundial (RR) de 4.8 (con intervalo de confianza del 95% 4.0-5.7) de desarrollar TGCT, en relación a la población general. El riesgo de TGCT en hombres con testículos no descendidos se eleva de 2 a 8 veces y se informa antecedentes de CO en 5 a 10% de todos los hombres con TGCT (Kratz et al., 2010). Actualmente se desconoce la relación molecular entre ambas entidades, incluso se documentan resultados discordantes, sin identificar factores genéticos involucrados en ambos padecimientos. En nuestro país existen algunos estudios sobre TGCT,

específicamente sobre búsqueda de marcadores polimórficos que correlacionen con respuesta al tratamiento. Sin embargo, resulta imprescindible un estudio basado en la búsqueda de biomarcadores que nos apoyen en la predicción del riesgo o susceptibilidad a presentar TGCT, sobre todo en una población con un riesgo elevado a presentar esta malignidad, como son los pacientes pediátricos con CO.

### **3.1. JUSTIFICACIÓN**

Actualmente múltiples estudios proponen a los miRNAs, como biomarcadores universales séricos no invasivos para el TGCT, debido a que los miR-371-373 y miR-367 presentan una especificidad y sensibilidad diagnóstica del 98% respecto a los marcadores séricos convencionales (HCG, AFP y LDH) con un 60%. El estudio de estos marcadores es de carácter relevante y de aplicación inmediata, respondiendo a las necesidades de investigación clínica aplicada al paciente tanto en el INP como en otras dependencias de salud en el país. Así los niveles de expresión elevados de los miRNAs: miR-371-373 y miR-367 relacionados con TGCT que se localicen en los pacientes con CO, podrían aportar información fundamental, con la perspectiva en un futuro de otorgar un diagnóstico temprano y tratamiento oportuno e individualizado en pacientes pediátricos con CO aislada, con un manejo adecuado para prevenir la progresión de TGCT invasivo, evitar tratamientos costosos, como la quimioterapia adyuvante y la radioterapia, así como el riesgo de desarrollar complicaciones a largo plazo.

## **PREGUNTA PROBLEMA**

¿Cuáles son los niveles de expresión del *cluster* miR-371-373 y el miR-367 asociados al TGCT en pacientes pediátricos con criptorquidia aislada?

### **3.2 HIPÓTESIS:**

- Con el antecedente de que el 10% de los pacientes con criptorquidia tiene riesgo de desarrollar TGCT, entonces se espera que al menos ese mismo porcentaje de pacientes con criptorquidia presente un perfil de expresión elevado del *cluster* miR-371-373 y del miR-367 asociados al TGCT.

### **3.3. OBJETIVO GENERAL:**

- Determinar los niveles de expresión de los miR-371-373 y miR-367 asociados con el riesgo a TGCT en pacientes pediátricos con criptorquidia aislada.

### **3.4 OBJETIVOS PARTICULARES:**

- Analizar el perfil de expresión de los miR-371-373 y miR-367 en individuos pediátricos con CO aislada, pacientes con TGCT con antecedentes de CO y el grupo control.
- Realizar el análisis ontológico de los miRNAs que resulten con mayor expresión en el grupo de pacientes pediátricos con CO.
- Identificar genes blanco de los miRNAs que tenga relación con ambas patologías.

## **4. MATERIAL Y METODO**

### **4.1 Captación de pacientes**

Para la realización de este trabajo se captaron tres grupos de estudio y se contó con 12 muestras de tejido embebido en parafina (FFPE) de cada uno de los grupos de estudio:

**Grupo 1)** Pacientes pediátricos con diagnóstico confirmado de CO aislada. Las muestras fueron referidas del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Pediatría (INP).

**Grupo 2)** Pacientes con TGCT y antecedentes de CO, los cuales fueron referidos por el Departamento de Patología del Instituto Nacional de Cancerología (INCan). Cabe mencionar que este grupo de pacientes se captó por factibilidad, dado que como antecedente se tiene una búsqueda retrospectiva de 1485 expedientes del Instituto Nacional de Cancerología del año 2006 al 2013 y únicamente se logró identificar 12 pacientes con TGCT que cursaron con CO.

**Grupo 3)** Un grupo control correspondientes a individuos sanos, las muestras fueron referidas del Instituto de Ciencias Forenses (bloques de tejido testicular utilizados de un proyecto previo en el Laboratorio).

### **4.2 CRITERIOS DE SELECCIÓN**

#### **4.2 1 Criterios de inclusión**

- Pacientes provenientes de la República Mexicana.
- Pacientes con diagnóstico de criptorquidia aislada.

- Pacientes con TGCT sea tumor primario, virgen al tratamiento con o sin antecedentes de CO.
- Pacientes con cariotipo normal, sin ningún síndrome genético.

#### **4.2.2 Criterios de exclusión**

- Pacientes que hayan sido transfundidos los últimos tres meses.
- Pacientes con testículo retráctil.
- Pacientes con antecedente de cirugía inguinal.
- Pacientes con alguna otra anomalía genital.
- Pacientes con algún síndrome.

#### **4.3 Extracción de miRNA de FFPE**

Para obtener el perfil de expresión de miRNAs se realizó la extracción de los miRNAs a partir de muestras de tejido testicular embebido en parafina (FFPE) de nuestros grupos de estudio: 1) pacientes con CO (n=12), 2) pacientes con TGCT/CO (n=12), y 3) individuos sanos (n=12). La extracción se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante miRNeasy FFPE Kit, de QIAGEN.

Se utilizaron 4 cortes de 5-20  $\mu\text{m}$  de espesor de cada muestra de FFPE de los tres grupos de estudio. A cada muestra se agregó 1mL de xilol como solución de desparafinar, se agitaron en un vórtex y se incubaron a 56°C durante 5 min. Se centrifugaron 1 min a 10,000 rpm para llevar las muestras al fondo y se decantaron

con cuidado sin llevarse el *pellet* (se repitió el proceso). Posteriormente a las muestras se agregaron 1 mL de etanol, se agitaron en un vórtex y se incubaron a 56°C durante 5 min. Se centrifugaron 1 min a 10,000 rpm (se repitió el proceso).

Se agregaron 240 µL de Buffer PKD a cada muestra, se mezclaron y se centrifugaron durante 1 min a 10,000 rpm. Se agregaron 10 µL de proteinasa K y se mezclaron suavemente. Se incubaron a 56°C durante 15 min, luego a 80°C durante 15 min., mezclando brevemente en vórtex cada 3-5 min. Se incubaron en hielo durante 3 min., luego se centrifugaron durante 15 min a 13,500 rpm. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo microtubo y se agregaron 25µl DNase *Booster Buffer* y 10 µL de solución de DNasa I. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. Se añadieron 500µL de Buffer RBC (para ajustar las condiciones de unión), más 1750µL de etanol (100%), se mezclaron bien mediante pipeteo y las muestras se transfirieron a una columna de centrifugación miRNeasy MinElute colocada en un tubo de recolección y se centrifugó durante 15s a  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10,000$  rpm). Se descartó el desecho de la columna. Se adicionaron 500µL de Buffer RPE a cada columna de miRNeasy MinElute y se centrifugaron durante 15s a 10,000 rpm. Luego se agregaron 500µL de Buffer RPE a cada columna de miRNeasy MinElute y se centrifugaron durante 2 min a 10,000 rpm para lavar la membrana de la columna de centrifugado. Se colocaron las columnas de centrifugación miRNeasy MinElute en un nuevo tubo de centrifugación y con la tapa abierta se centrifugaron a toda velocidad durante 5 min. Se desechó el tubo de recolección con el flujo continuo. Por último, cada columna fue colocada en un tubo cónico y se añadieron 10µL de agua libre de RNasa directamente a la membrana de la columna de centrifugado y se dejó

incubar por 10 min y se centrifugaron durante 1 min a toda velocidad para eluir el RNA. Se repitió este último paso obteniéndose un total de 20µL de cada una de las muestras con la extracción de miRNA.

Enseguida de la extracción de miRNAs se analizó la pureza y cuantificación de las muestras por medio de espectrofotometría (Nanodrop 2000, Thermo Scientific) mediante la relación de absorbancia  $A_{260nm}/A_{230nm}$  y  $A_{260nm}/A_{280nm}$ , con el NanoDrop 2000UV-Vis SpectrophotometerThermoScientific®. Posteriormente las muestras se almacenaron a -80°C hasta realizar la transcripción.

#### **4.4 Obtención de cDNA mediante Transcriptasa Reversa Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR).**

Se realizó la transcripción reversa de cada una de las muestras para obtener el cDNA. La retrotranscripción se llevó a cabo mediante el TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). Para cada reacción se agregaron 0.15µL de 100mM dNTPs, 0.5µL de MultiScribe™ Reverse Transcriptase 50U/µL, 2.0µL de 10×Reverse Transcription Buffer, 0.19µL de RNase Inhibitor 20 U/µL, 13.16µL de Agua libre de nucleasas, 3µL de RT Primers y 1µL de muestra de miRNA, para un volumen total de 20µL por reacción. Para obtener niveles detectables de miRNA en qPCR es preciso partir de al menos 100ng. Se incubaron en el termociclador bajo el siguiente programa:

Tabla 1. Programa de termociclado para la RT

<b>TIEMPO</b>	<b>TEMPERATURA</b>
<b>30 min</b>	16°C
<b>30 min</b>	42°C
<b>5 min</b>	85°C
$\infty$	4°C

Los primers Taqman utilizados para la retrotranscripción fueron específicos tanto como para los miRNAs de interés como para los controles endógenos RNU44 y RNU6B (Tabla 2).

Tabla 2: Localización cromosomal y secuencia de los miRNA.

<b>miRNA</b>	<b>Localización cromosomal</b>	<b>Secuencia de 5' a 3'</b>
hsa-miR-371a-3p	19q13.41	AAGUGCCGCCAUCUUUUGAGUGU
hsa-miR-372-3p	19q13.41	AAAGUGCUGCGACAUUUGAGCGU
hsa-miR-373-3p	19q13.41	GAAGUGCUUCGAUUUUGGGGUGU
hsa-miR-367-3p	4q25	AAUUGCACUUUAGCAAUGGUGA

## 4.5 Cuantificación de los miRNA mediante Reacción en cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RT-qPCR)

La cuantificación de miRNAs fue detectada mediante la RT-qPCR. En la reacción se utilizan sondas Taqman complementarias a las secuencias de interés, las cuales llevan unidas una molécula llamada *quencher* y un fluoróforo. La fluorescencia emitida por el fluoróforo es absorbida por el *quencher* de forma que no es detectada por el equipo hasta que la polimerasa amplifica la secuencia con la sonda Taqman hibridada en la secuencia de interés, el *quencher* se separa de la sonda y el fluoróforo emite fluorescencia siendo detectada por el equipo (Fig. 3)

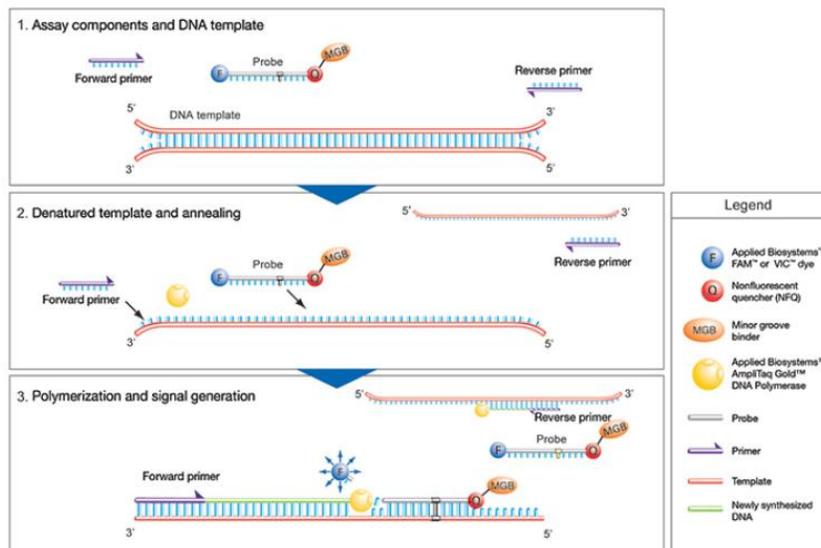


Fig. 3. Proceso de amplificación detectada a tiempo real (PCR). (Imagen tomada del protocolo Taqman® Gene Expression Assays, Applied Biosystem).

Para la preparación de la mezcla para la cuantificación de miRNA mediante RT-qPCR se realizó por triplicado utilizando un volumen final de 10µl.

Tabla 3. Reactivos y cantidad usada para la cuantificación de miRNA

REACTIVO	VOL (µl)
Agua libre de nucleasas	3.5
TaqMan® Universal PCR Master Mix II	5
Primers qPCR(TaqMan MicroRNA Assay)	0.5
DNAc	1
Volumen Final	10

Las muestras fueron procesadas en un termociclador de tiempo real de Applied Biosystem bajo el siguiente programa:

Tabla 4. Ciclos para la obtención de la cuantificación relativa de miRNAs

	Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclo
1		50°C	2 min	1
2	Activación AmpliTaq Gold® DNA Polymerase	95°C	10 min	1
3	Desnaturalización	95°C	15 seg	40
	Alineamiento y Extensión	60°C	1 min	
4	Mantenimiento	4°C	∞	1

Tras la amplificación, se obtuvo el parámetro ciclo umbral (*Threshold cycle*, Ct o ciclo de cuantificación Cq), que representa el número de ciclos necesarios para que la señal fluorescente alcance el nivel umbral. El método 2 delta-delta Ct expresa la proporción obtenida de la relación entre los valores Ct de la muestra y los valores Ct del control:  $\text{Ratio} = 2^{-(\Delta\text{Ct muestra} - \Delta\text{Ct referencia})} \Rightarrow \text{ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ , para obtener el valor de *Fold Change*. Esta fórmula permite calcular la cantidad relativa respecto al miRNA con los endógenos. Para obtener una cuantificación relativa más exacta de los miRNA es indispensable evaluarla con un control endógeno que se exprese de manera constante. Los controles endógenos utilizados para este experimento fueron el RNU44 y RNU6B. Normalizar frente al miRNA endógeno permitió normalizar los resultados y comparar la expresión de los miRNA. El propósito de la normalización es reducir la variación técnica de cada reacción. Algunos factores que pueden causar la variación son las diferencias en la cantidad del cDNA, la integridad del RNA y errores de pipeteo. Es importante elegir correctamente el control endógeno para obtener datos fiables. Además, se ha visto que el uso de un control endógeno es susceptible a tener errores en la interpretación de los resultados por lo cual se recomienda utilizar más de un control endógeno.

#### **4.6 Predicción de los genes blanco de los miRNA candidatos**

Se realizó la búsqueda de los posibles genes diana que podrían estar regulados por los miRNAs analizados. Existe una gran variedad de bases de datos que proporcionan información de las rutas biológicas y de genes blancos de los miRNAs. Algunos programas que se utilizaron para el análisis *sílico* fueron los siguientes:

- miRtarbase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/index.php>)
- GeneCodis (<http://genecodis.cnb.csic.es/>)
- DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>),
- KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>)
- PANTHER (<http://www.pantherdb.org/pathway/>)
- DIANA miRPath v2. (<http://diana.imis.athena-innovation.gr>)

#### **4.7. Análisis estadístico**

El análisis estadístico se basó en la aplicación de la prueba de ANOVA con el fin de comparar los niveles de expresión de los tres grupos de estudio. El análisis de normalización se realizó mediante la prueba de Shapiro-Wilk.

La comparación de expresión entre los pacientes con CO y controles se realizó mediante la prueba de t-Student con corrección de Welch. Las diferencias de expresión se consideraron estadísticamente significativas si eran menores al nivel de significancia 0,05. El programa utilizado para este análisis fue el paquete estadístico R versión 3.6.1.

### **5. RESULTADOS**

#### **5.1 Evaluación de la extracción de miRNA**

Como resultado de la extracción de miRNA, se obtuvo adecuada cantidad y calidad de miRNA (Tabla 5), tanto en pacientes con CO (n=12), pacientes con TGCT que cursaron con CO (n=12) y en los individuos control (n=12). Obteniéndose un rango entre de 1.6 a 2.0 de  $A_{260nm}/A_{230nm}$  y de 1.8 a 2.0 de  $A_{260nm}/A_{280nm}$ .

Tabla 5. Cantidades obtenidas de la extracción de miRNAs de los grupos de CO, TGCT y controles

	CO		TGCT		CONTROLES	
	Muestra	ng/uL	Muestra	ng/uL	Muestra	ng/uL
1	CO1	165.0	TGCT1	350.1	TS4	59.7
2	CO3	32.0	TGCT2	159.1	TS10	160.3
3	CO4	59.1	TGCT3	135.2	TS12	259.9
4	CO5	49.4	TGCT4	108.9	TS14	207.7
5	CO6	73.3	TGCT5	139.9	TS15	298.5
6	CO8	85.9	TGCT6	432.7	TS16	89.9
7	CO9	30.8	TGCT7	676.0	TS17	160.3
8	CO10	60.2	TGCT8	47.8	TS22	76.3
9	CO11	111.11	TGCT9	872.0	TS25	208.3
10	CO12	83.6	TGCT10	110.9	TS26	94.7
11	CO13	174.2	TGCT12	34.4	TS27	152.6
12	CO14	110.5	TGCT13	437.0	TS28	72.3

## 5.2 Cuantificación por RT-qPCR de los miRNAs del *cluster* miR-371-373 y miR-367 y normalización con respecto a RNU44 y RNU6B

Se analizó la expresión del grupo miR-371-373 y el miR-367 en tejido embebido en parafina en los tres grupos de estudio. Todos los ensayos presentaron amplificación, y para los valores de cuantificación relativa se utilizó el método de  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , para observar los cambios de expresión de las muestras, que se incluyeron por triplicado, normalizadas con los controles endógenos RNU44 y el RNU6B. Para determinar los

niveles de significancia entre las comparaciones de los tres grupos, se realizó la transformación logarítmica, es decir la conversión de los datos originales en logaritmos para disminuir la diferencia de la magnitud de los datos y así facilitar la interpretación de los resultados. El análisis de normalización mediante la prueba de Shapiro-Wilk, con los datos normalizados con el control endógeno RNU44 se obtuvo un valor de  $p=0.0001385$  y con los datos normalizados con el control endógeno RNU6B un valor de  $p=0.000001023$ .

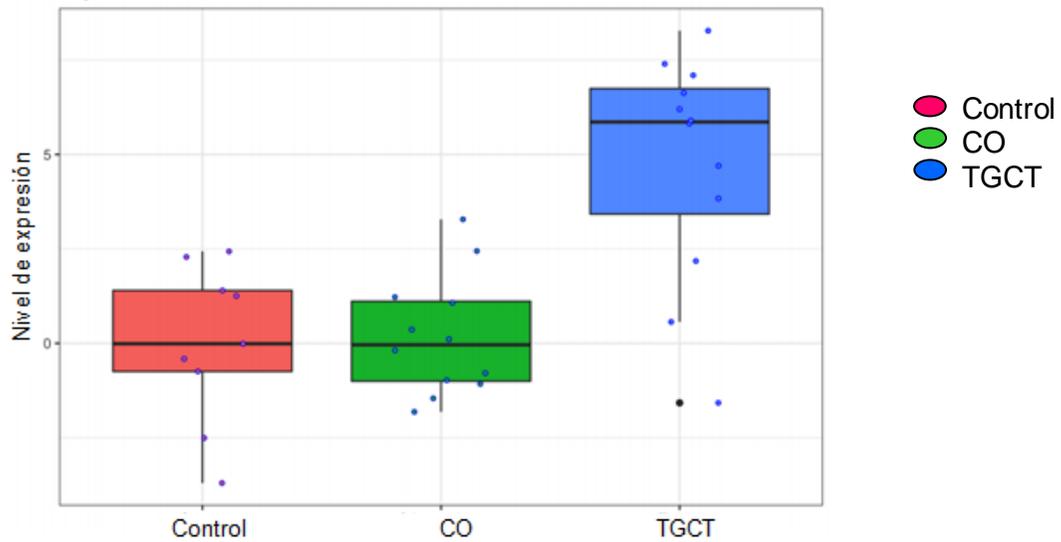
La prueba estadística de ANOVA, se realizó para comparar las diferencias de medias y la varianza entre los grupos utilizando un valor de  $p<0.05$  con transformación logarítmica a  $p<0.00001$ , Los resultados se presentan como diagramas de box plot superpuestos con el diagrama de puntos.

#### **Comparación de la expresión del miR-371-373 y miR-367 en los tres grupos de estudio normalizados con el RNU44**

Al realizar la comparación de los niveles de los miRNA entre los tres grupos normalizados con el control endógeno RNU44, se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de miR-372( $p=0,00000108$ ), miR-373( $p=0,000313$ ) y miR-367( $p=0,0000000718$ ) entre los grupos estudiados, sin embargo, la expresión de miR-371( $p=0.0000249$ ) no presentó diferencias significativas entre los grupos. Como se muestra en la figura 4A y 4B. En los casos de TGCT/CO la expresión de los miRNA, fue más alta en comparación del grupo de CO y del grupo control. Mientras que los niveles de expresión de los grupos con CO y controles fueron estadísticamente similares en todos los miRNA analizados con

excepción del miR-367 que presentó niveles mayores en pacientes con CO en comparación de los controles.

a) miR-371



b) miR-372

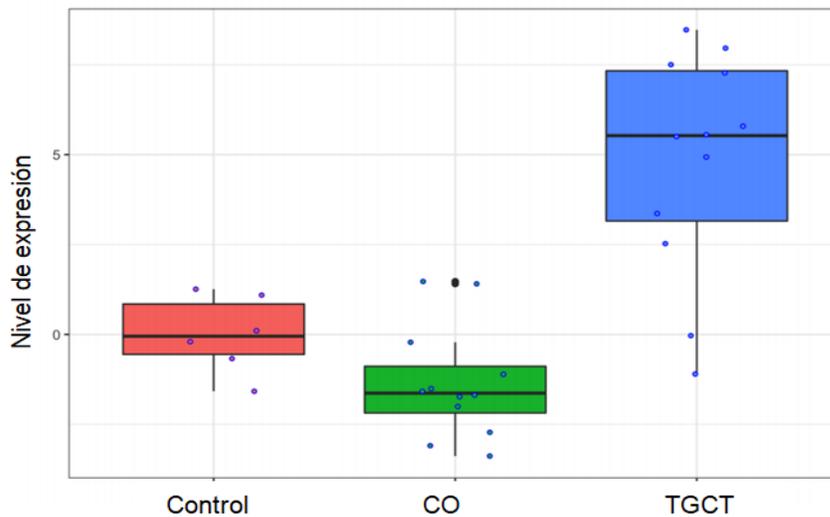
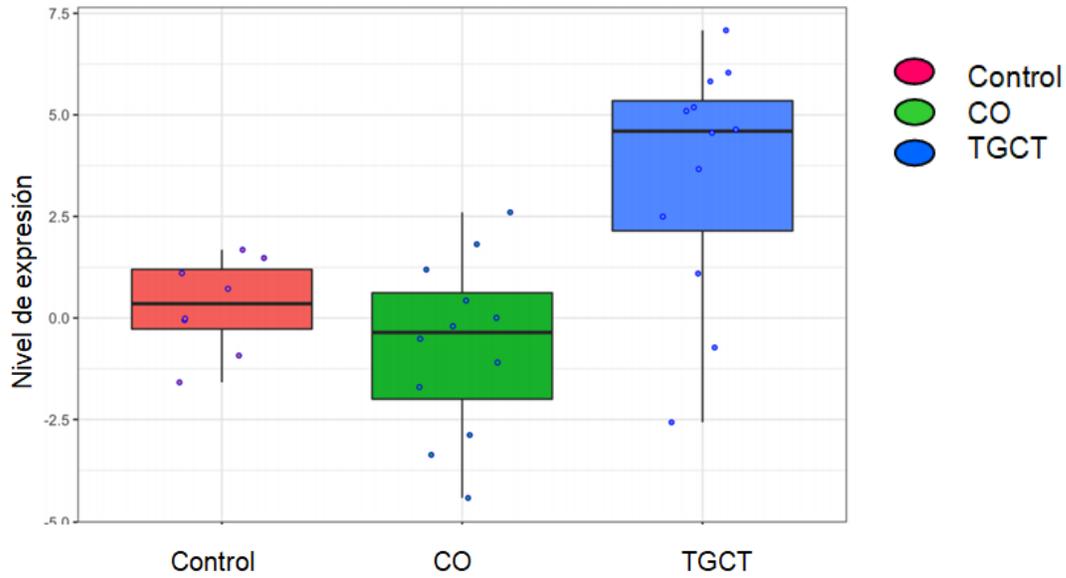


Fig. 4A. Niveles de expresión del a)miR-371( $p=0.0000249$ ) y b)miR-372 ( $p=0,00000108$ ) de las muestras de los grupos CO, TGCT/CO y control. Los valores de expresión son mostrados en transformación logarítmica, representado en graficas box plot. Los puntos muestran la dispersión de los datos de las muestras.

c) miR-373



d) miR-367

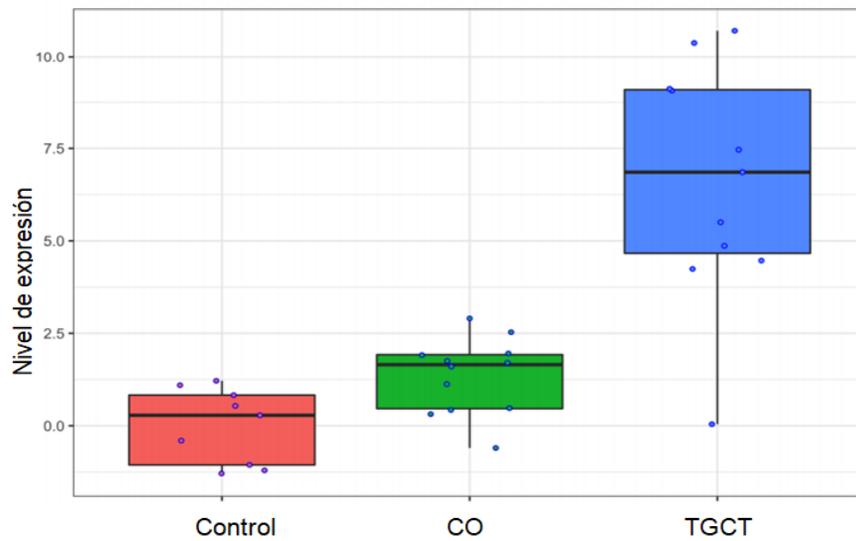
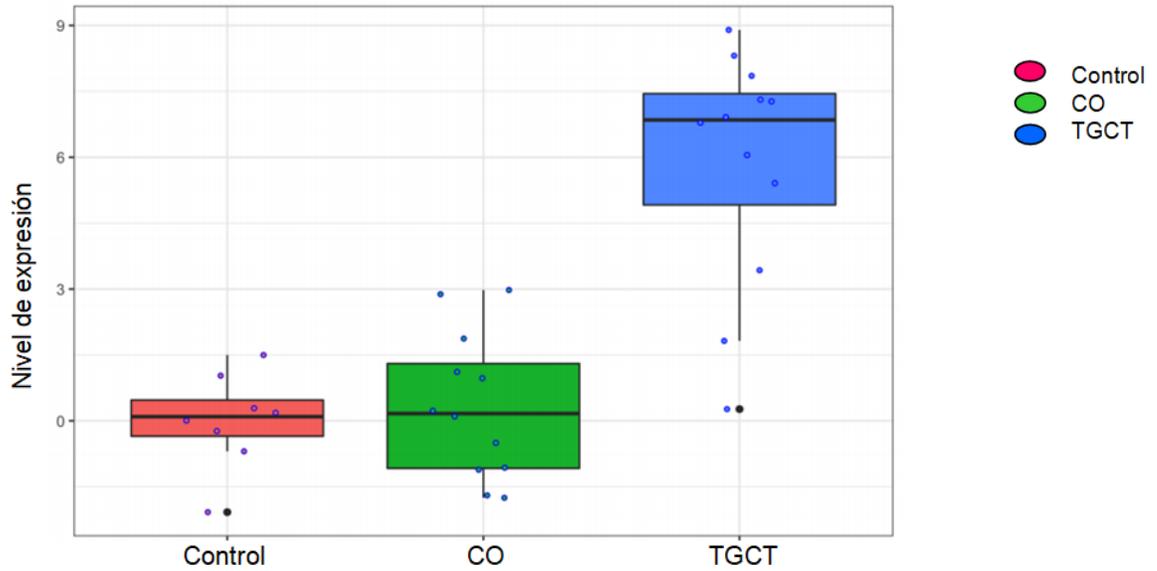


Fig. 4B. Niveles de expresión del c)miR-373 ( $p=0,00313$ ) y d)miR-367( $p=0,0000000718$ ) de las muestras de los grupos CO, TGCT/CO y control. Los valores de expresión son mostrados en transformación logarítmica, representado en graficas box plot. Los puntos muestran la dispersión de los datos de las muestras

### **Comparación de la expresión del miR-371-373 y miR-367 en los tres grupos de estudio normalizados con el RNU6B**

Los niveles de los miRNAs entre los tres grupos normalizados con el control endógeno RNU6B, presentaron diferencias significativas en los cuatro miRNA: miR-371 ( $p = 0.0000000953$ ), miR-372 ( $p = 0.0000000039$ ), miR-373 ( $p = 0.00000376$ ) y miR-367 ( $p = 0.000000000764$ ). Como se aprecia en la figura 5A y 5B. En los casos de TGCT/CO la expresión de los miRNA presentó niveles altos en comparación del grupo de CO y del grupo control de igual manera que en los datos normalizados con el RNU44. También observamos que los niveles de expresión del grupo CO y controles fue estadísticamente similar en el análisis de los miRNA del *cluster*. Mientras que el miR-367 presentó niveles más altos en los pacientes con CO en comparación del grupo control.

a) miR-371



b) miR-372

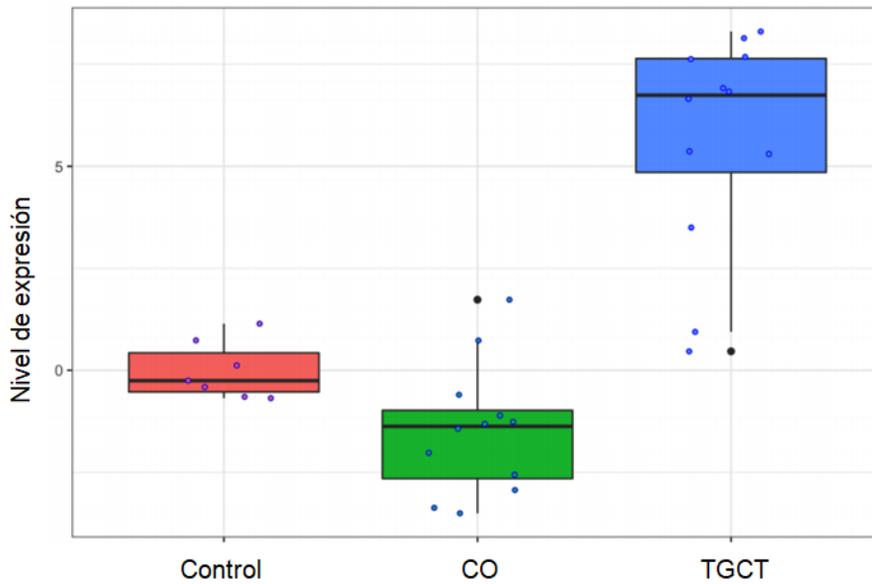
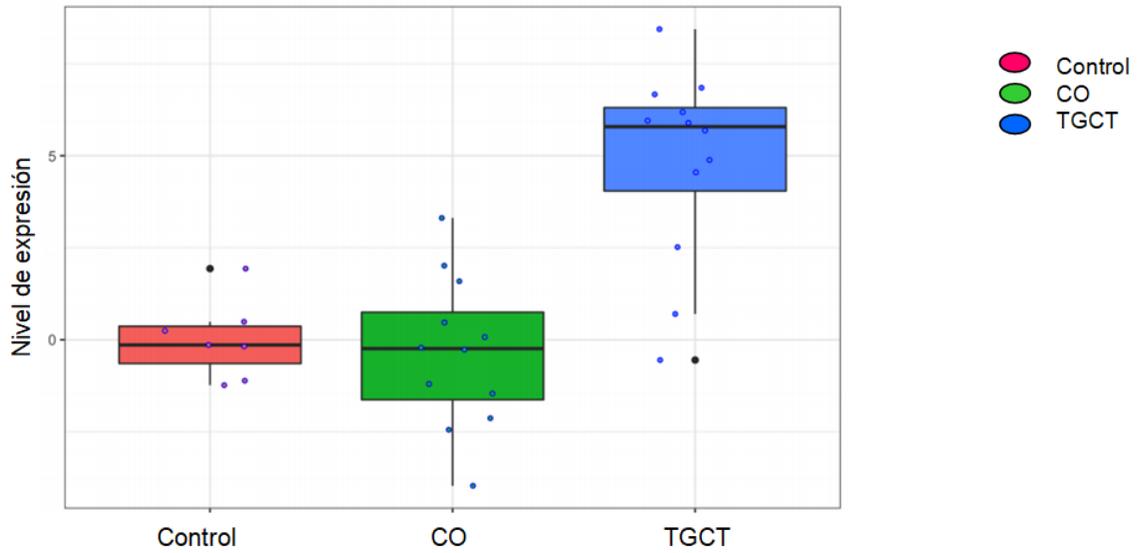


Fig. 5A. Niveles de expresión del a)miR-371( $p=0.0000000953$ ) y del b)miR-372 ( $p=0.0000000039$ ), de los grupos CO, TGCT/CO y control, normalizados con el control endógeno RNU6B. Los valores de expresión son mostrados en transformación logarítmica representado en graficas box plot. Los puntos muestran la dispersión de los datos de las muestras.

c) miR-373



d) miR-367

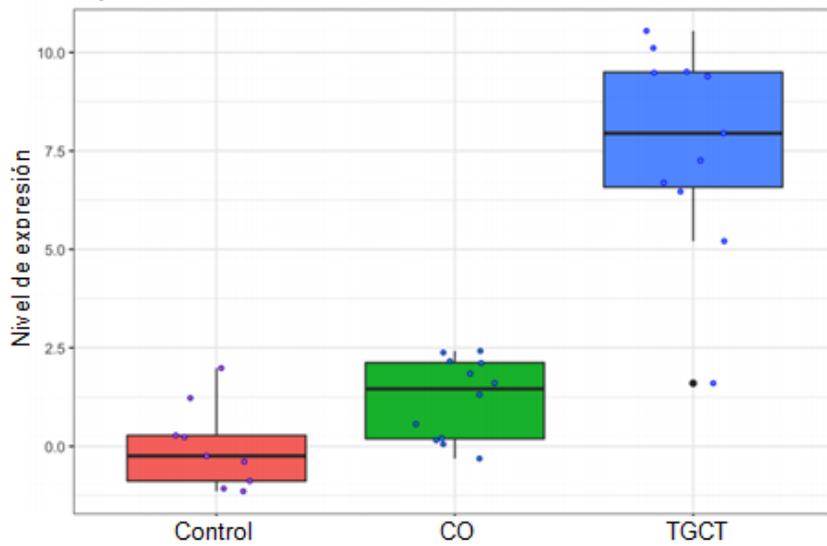


Fig. 5B. Niveles de expresión del c)miR-373( $p=0.00000376$ ) y d)miR-367 ( $p=0.0000000000764$ ) de los grupos CO, TGCT/CO y control, normalizados con el control endógeno RNU6B.Los valores de expresión son mostrados en transformación logarítmica representado en graficas box plot. Los puntos muestran la dispersión de los datos de las muestras.

### Análisis de los miR-371-373 y del miR-367 en los pacientes con CO.

En el análisis de los miRNA en los pacientes con CO observamos una expresión diferencial presentando valores significativos, siendo el miR-367 con mayor expresión en los pacientes con CO tanto en la normalización con el RNU44 ( $p=0.00135$ ) como con el RNU6B ( $p=0.00184$ ) (Fig. 8).

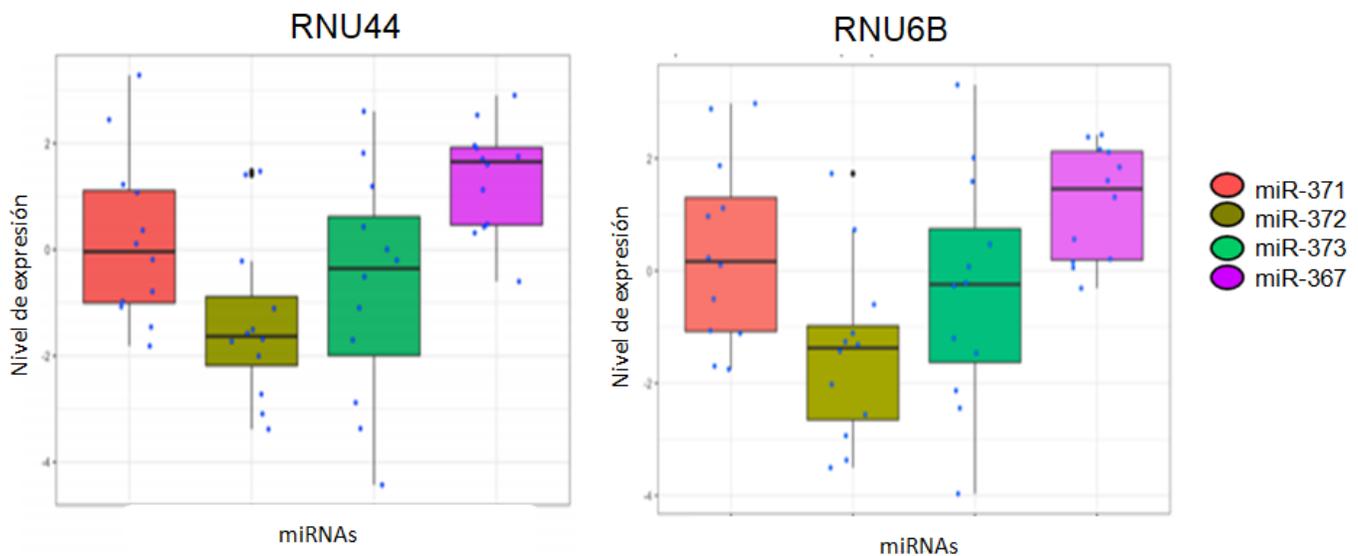


Fig.6. Niveles de expresión de los miR-371,372,-373 y 367 en el grupo CO normalizados con el RNU44 (derecha) y el RNU6B (izquierda), representado en graficas box plot superpuesto con el diagrama de puntos.

### Análisis de los miR-371-373 y del miR-367 en los pacientes con TGCT/CO.

En el análisis de los miRNAs en los pacientes con TGCT/CO presentaron una expresión muy similar sin diferencias significativas en la normalización con RNU44 ( $p=0.132$ ) y con RNU6B ( $p=0.0913$ ) respectivamente (Fig. 7).

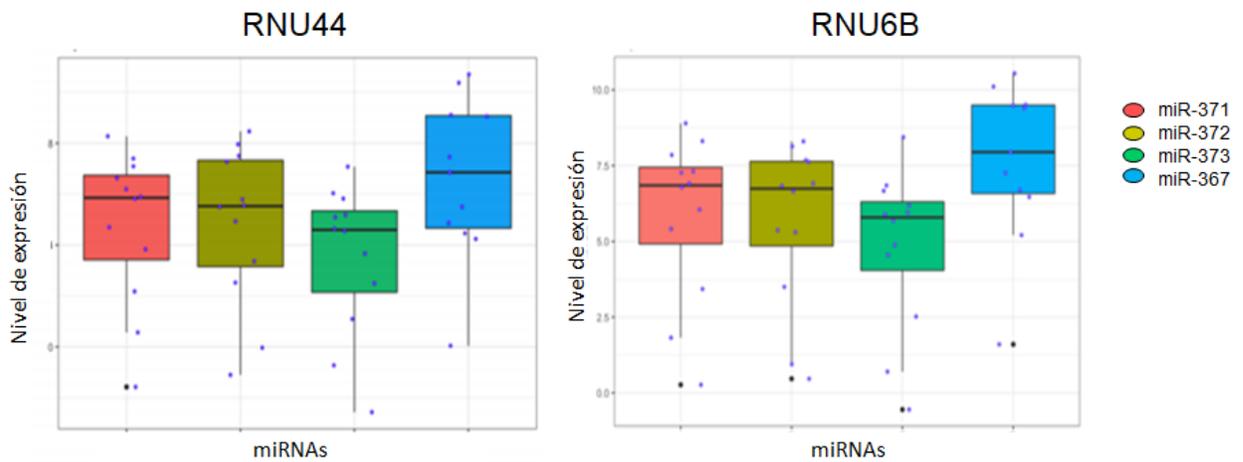


Fig.7. Niveles de expresión de los miR-371, 372,-373 y 367 en el grupo TGCT/CO normalizados con los controles endógenos RNU44 (izquierda) y el RNU6B (derecha), representado en graficas box plot con transformación logarítmica superpuesto con el diagrama de puntos.

### Análisis de los miR-371-373 y del miR-367 en el grupo control.

El análisis de expresión de los miRNA en el grupo control fue similar en la normalización con el RNU44 ( $p=0.967$ ) y con el RNU6B ( $p=1$ ) sin diferencias significativas observadas. (Fig. 8).

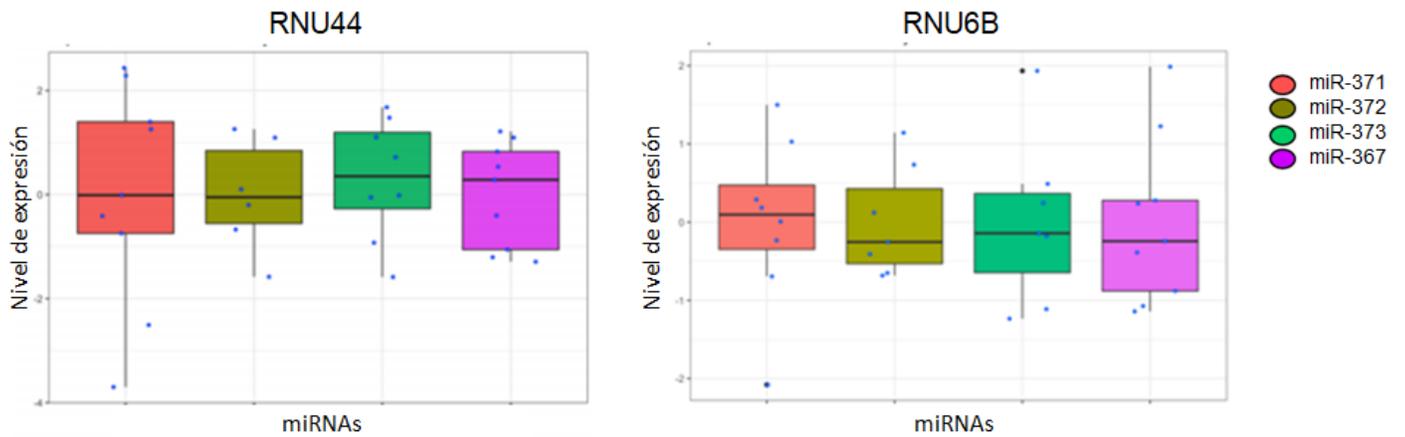


Fig.8. Niveles de expresión de los miR-371, 372, 373 y 367 en el grupo control normalizados con los controles endógenos RNU44 izquierda y el RNU6B (derecha), representado en graficas box plot superpuesto con el diagrama de puntos.

### Comparación del miR-367 en pacientes con CO y controles

El miR-367 presentó los niveles más altos en los pacientes con CO por lo que se comparó con el grupo control. Se realizó la prueba de t-Student de muestras independientes presentando diferencias significativas entre ambos grupos con valor de  $p=0.042$  para los datos normalizados con el RNU44 y un valor de  $p=0.026$  para los datos normalizados con el RNU6B. (Fig. 9)

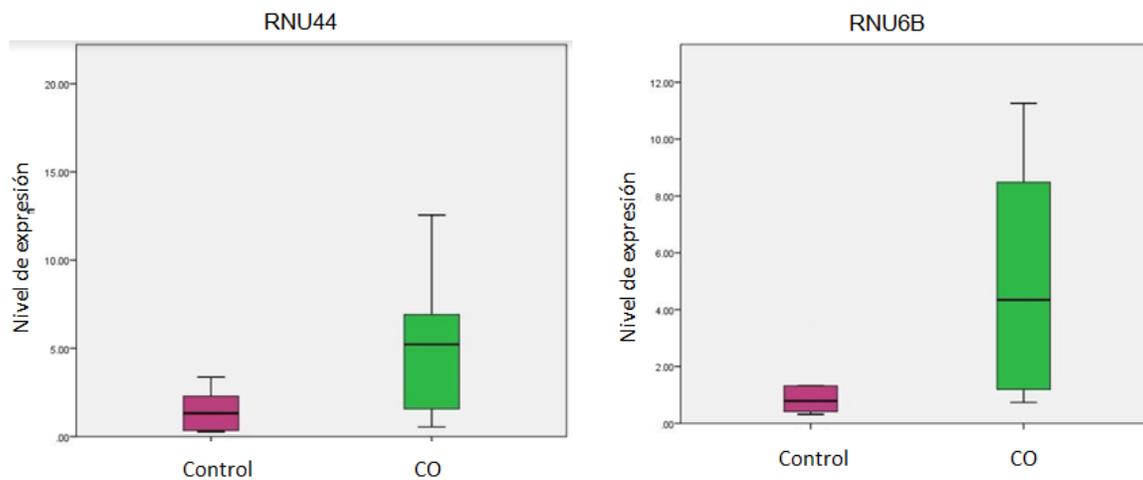


Fig. 9. Resultados de la expresión de miR-367 en muestras de pacientes con CO y de individuos control sanos normalizados con a) RNU44 y b) RNU6B, representados en gráficas de box plot.

De acuerdo a los resultados obtenidos de la expresión de los miRNAs se realizó la búsqueda de sus funciones celulares a través del análisis de sus posibles genes blanco.

### 5.3 Análisis ontológico del miR-371-373 y miR-del 367

Para la búsqueda de las funciones biológicas de los miRNAs y de sus genes blanco se consultaron varias bases de datos como: KEGG, PANTHER, Gene Codis, mirTarbase y Diana tools. A continuación, se presentan algunas funciones biológicas en las cuales podrían participar los miR-371-373 y miR-367.



Fig.10. Procesos celulares en la cuales pueden participar el *cluster* miR-371-373 y miR-367

En la siguiente tabla se muestran los posibles genes regulados por los miRNAs analizados en este estudio y que tienen relación con el cáncer.

Tabla 6. Genes regulados por los miR-371-373 y el miR-367 relacionados a vías de cáncer

<b>miRNA</b>	<b>GENES BLANCO RELACIONADOS AL CÁNCER</b>
<b>miR-371</b>	MYC, WNT9A, CDK6, FGF5, CYCS, BCL2L1, TRAF2, ITGA2, RAD51, SMAD2, LAMC, VHL, MITF, HSP90AA1, CDH1
<b>miR-372</b>	CYCS, FZD6, CCDC6, IGF1R, TGFBR2, ITGA2, CRK, CDKN1A, FZD9, CDK2, FGF7, MSH3, CCNA1, VEGFA
<b>miR-373</b>	CXCL8, STK4, CCND1, HIF1A, PTGS2, RELA, VEGFA, MTOR, CYCS, FZD6, PIK3CA, CCDC6, IGF1R, TGFBR2, ITGA2, JAK1, CRK, FZD9, MYC, RASSF1, FGF7, MSH3., NCOA4, LAMC1, MPK8, CDKN1A, SMAD4
<b>miR-367</b>	BRAF, CDKN1B, IGF1R, KRAS, E2F3, RB1, MDM2

De la lista de los genes relacionados al cáncer, se encontraron seis genes relacionados al TGCT regulados por los miRNAs de estudio, estos se presentan a continuación en la tabla 7.

Tabla 7. Función de genes relacionados al TGCT regulados por los miR-371-373 y mir-367

<b>miRNA</b>	<b>GENES BLANCO RELACIONADOS AL TGCT</b>	<b>FUNCION DE LOS GENES BLANCO RELACIONADOS AL TGCT</b>
<b>miR-371</b>	CDH1 (Cadherina 1)	El RNAm de CDH1 se expresa altamente en CIS y carcinoma embrionario

<b>miR-372</b> <b>miR-373</b>	VEGF (Factor de crecimiento endotelial vascular)	En seminomas, la expresión del factor de crecimiento vascular VEGF ha demostrado que tiene un valor predictivo del desarrollo de metástasis. Tanto el RNAm como la expresión proteica de VEGF son significativamente mayores en los TCGT que en los testículos normales, y su expresión se correlaciona con la densidad microvascular dentro de los tumores.
<b>miR-372</b> <b>miR-373</b> <b>miR-367</b>	IGFR1 (Receptor del factor de crecimiento de insulina 1)	El receptor del factor de crecimiento de insulina 1 contribuye a la supervivencia celular del TGCT.
<b>miR-373</b>	CDKN1A (inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina 1)	Varios estudios han demostrado que la expresión de la proteína p21 y del RNAm de CDKN1A se expresa de manera abundante en Cáncer Testicular como el teratoma maduro.
<b>miR-367</b>	RB1 (RB corepresor transcriptional 1)	Es un supresor tumoral. La falta de la proteína RB puede facilitar la transición de células normales a células tumorales contribuyendo a la patogénesis molecular de los TGCT.
	KRAS (KRAS proto-oncogene, GTPas)	KRAS es una pequeña GTPasa acoplada a receptor tirosina quinasas. La activación de las mutaciones KRAS conduce a su activación constitutiva que promueve la carcinogénesis. Se ha visto expresado en seminomas.

## 6. DISCUSIÓN

La criptorquidia o el no descenso testicular, es la anomalía urogenital más frecuente al nacimiento en varones recién nacidos y es un factor de riesgo que incrementa de 7 a 10 veces el desarrollo del TGCT (Komarowska et al., 2015). Aunque la asociación entre ambas patologías es establecida clínicamente, no se conocen los mecanismos que conducen a esta malignidad. Actualmente, se han realizado estudios de factores genéticos relacionados de manera independiente en ambas patologías (Ferlin et al., 2008; Turnbull y Rahman, 2011; Ferguson y Agoulnik, 2013). Varios factores genéticos han sido involucrados en el desarrollo del TCGT, en los últimos años, se han investigado genes desregulados en el TGCT como herramientas de diagnóstico como los genes: PLAP, NANOG, KIT, SOX2, POU5F1, SALL4, TP53, KRAS. Algunos de estos genes tienen funciones en la pluripotencia, en el ciclo celular, migración, sobrevivencia (Sheikine et al., 2012), por lo que el aumento del estudio molecular del TGCT podría ayudar al pronóstico oportuno, sin embargo, no se ha encontrado un factor genético en común. Factores genéticos como la expresión de miRNAs, cuya desregulación se encuentra relacionada con el desarrollo del cáncer (Khan et al., 2019), podrían ayudar a establecer el mecanismo que conduce al desarrollo TGCT en los pacientes pediátricos con CO. Se ha visto que la desregulación de los miRNAs en el cáncer, alteren su expresión, haciendo que los miRNAs puedan actuar como supresores de tumores, a niveles bajos de expresión o como oncomiR en una elevada expresión (Jansson y Lund, 2012; Khan et al., 2019); como es el caso del *cluster* miR-371-373 y el miR-367 que actúan como oncomiRs en pacientes con TGCT (Voorhoeve et al., 2006; Murray et al., 2016; et al., 2019;

Batool et al., 2019). Dichos miRNAs se han estudiado como biomarcadores del TGCT, altos niveles de expresión de estos miRNAs caracterizan a esta patología, sin embargo, la expresión de los mismos disminuye después de la orquiectomía a niveles normales por lo que son considerados biomarcadores universales para este tipo de tumores (Murray et al., 2011; Gillis et al., 2013; Spiekermann et al., 2014; Syring et al., 2014; Murray, Rijlaarsdam et al., 2015; Huddart y Coleman, 2016).

Los datos obtenidos en el análisis de expresión del *cluster* miR-371-373 y miR-367 en los pacientes con TGCT/CO presentaron niveles altos en comparación con controles sanos, por lo que la sobreexpresión de los miRNAs en los pacientes con TGCT/CO coincidió con lo reportado en pacientes con TGCT sin antecedentes de CO en otras poblaciones como Alemania, Eslovaquia, Noruega, Reino Unido, Austria y Holanda (Dieckmann et al., 2012; Gillis et al., 2013; Murray et al., 2016; Rijlaarsdam et al., 2015; Spiekermann et al., 2014; Myklebust et al., 2019; Plaza et al., 2019). La expresión de los miRNAs, en los pacientes pediátricos con CO fue baja en comparación con los pacientes con TGCT/CO. Sin embargo, en el análisis del miR-367 el nivel de expresión fue mayor en los pacientes con CO, en contraste con el grupo control; por lo que el miR-367 sería el miRNA candidato para ser estudiado más a fondo en relación con la CO y el TGCT. A pesar de que el *cluster* miR-371-373 no presentó niveles de expresión significativos en los pacientes con CO, creemos importante que también sus genes blanco, deberían ser analizados debido a que dos de las 12 muestras de pacientes con CO presentaron niveles más alto que los controles, siendo el 10% esperado con un nivel de expresión diferente,

ya que se ha reportado que ese porcentaje de pacientes llega a desarrollar el TGCT en la edad adulta (Mannuel et al., 2012).

En el grupo de pacientes con TGCT/CO, el análisis de los cuatro miRNAs, mostró niveles de expresión altos, como lo reportado en poblaciones como Alemania, Reino Unido, Eslovaquia, Noruega, Austria y Holanda (Palmer et al., 2010; Diekmann et al., 2012; Gillis et al., 2013; Siryng et al., 2014; Rijlaarsdam et al., 2014; Spiekermann et al., 2015; Agthoven y Looijenga, 2017; Radke et al., 2017; Terbuch et al. 2018. De la misma manera los pacientes con criptorquidia en el análisis de los miRNAs presentaron una expresión mayor en el miR-367. Cabe mencionar que el análisis de expresión del *cluster* miR-371-373 y del miR-367 no se ha realizado en pacientes pediátricos con CO. Por lo que la diferencia de expresión que presentaron algunas muestras de los pacientes con CO en comparación del grupo control, podría deberse en realidad a la presencia de una Neoplasia Intratubular de Células Germinales del cual se sabe que puede encontrarse en el testículo muchos años antes de ser detectado (Murray, Huddart y Coleman, 2016; Spiekermann et al., 2014). Por lo que, sería importante evaluar los genes regulados por éstos miRNAs relacionados al TGCT. Es necesario mencionar que este es un estudio preliminar en el cual sería muy importante incrementar el número de muestras de los pacientes con CO para obtener resultados más precisos en la expresión de los miRNAs.

Por otro lado, el análisis ontológico de los genes blanco a través de bases de datos como KEGG, PANTHER y miRtarbase, mostró una gran cantidad de genes posiblemente regulados por los miRNAs de estudio. De entre ellos, se eligieron los

genes que participan en vías de cáncer y de éstos seleccionamos solo los genes que participan en funciones relacionados al TGCT.

El gen seleccionado para su posterior estudio fue el gen IGF1R (Receptor del factor de crecimiento de insulina I) que es regulado por tres de los cuatro miRNAs: miR-372, miR-373 y miR-367. El gen IGF1R contribuye a la supervivencia, el crecimiento y la proliferación celular. Participa activando las vías MAPK y PI3K/AKT, provocando la absorción de calcio, glucosa y aminoácidos (Das et al., 2019). Además, se encuentra involucrado en el desarrollo testicular con un papel en la proliferación y diferenciación de las células de Sertoli y las células germinales, se sabe también que es altamente expresado en espermatoцитos secundarios y espermátidas tempranas. Se encuentra relacionado a las vía de FSH (hormona folículo estimulante) en animales, y se cree que participa en el volumen testicular en humanos (Cannarella et al., 2017; Griffeth et al., 2014). El gen IGF1R se ha visto que participa en la vía de señalización del descenso testicular, por lo que se cree que podría participar en el inicio de la CO (Cannarella et al., 2017). Su papel en el funcionamiento testicular normal es evidente, por lo que es posible, que un pequeño cambio en su regulación, sea el detonante para el desarrollo de la malignidad (Pascale et al., 2005; Selfe et al., 2019). Por lo cual, consideramos que el estudio de este gen que podría ser regulado por la mayoría de los miRNAs analizados en este trabajo, puede aportar información importante en la relación entre la CO y el TGCT.

## **7. CONCLUSIÓN**

El miR-367 presentó los niveles más altos en los pacientes con CO, siendo también el más elevado en los pacientes con TGCT/CO. Por lo que un análisis más profundo de la participación de este miRNA podría ayudarnos en un futuro, resultando en la obtención de un biomarcador pronóstico para los pacientes con un alto riesgo de desarrollar el TGCT como lo son los pacientes pediátricos con CO. Por otro lado, el análisis funcional de estos miRNAs y su participación en procesos celulares, resultaría importante caracterizar y del mismo modo validar algunos de los posibles genes blancos de los miRNAs estudiados, lo que podría proporcionar información importante acerca de la biología y tratamiento de los TGCT.

## 8. REFERENCIAS

- Agthoven**, T., Looijega L. (2017). Accurate primary germ cell cancer diagnosis using serum based microRNA detection (ampTSMiR test). *Oncotarget*, 8(35), 58037-49.
- Allegra**, A., Alonci, A., Campo, S., Penna, G., Petrunaro, A., Gerace, D., Musolino, C. (2012). Circulating microRNAs, New biomarkers in diagnosis, prognosis and treatment of cancer. *International Journal of Oncology*, 41(6),1897-1912.
- Anheuser**, P., Radtke, A., Wülfing, Kranz, J., Belge G., Dieckmann, K. (2017). Serum Levels of MicroRNA371a-3p: A Highly Sensitive Tool for Diagnosing and Staging Testicular Germ Cell Tumours: A Clinical Case Series, *Urologia Internationalis*, 99(1):98-103
- Anokye**, F., Trivedi, J., Gupta, M., Cui, Z., Tian, Y., Zhang, Y., Yang, W., Gruber, P., Epstein, J., Morrisey E. (2011). High efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells stop pluripotency. *Cell Stem Cell*, 8(4), 376-88.
- Arroyo**, A., Salloum, S., (2013). MicroRNAs circulantes. ¿Nuevos biomarcadores en cáncer?. *Eubacteria*, 32, 1-7.
- Ashley**, R., Ashley MD., Barthold JS., Thomas F., Kolon MSD. (2010). Cryptorchidism Pathogenesis, Diagnosis, Treatment and Prognosis. *Urol. Clin. N. Am.*, 37(2), 183-93.
- Baroni**, T., Arato, I., Mancuso, F. Calafiore, R. Luca, G. (2019). On the Origin of Testicular Germ Cell Tumors: From Gonocytes to Testicular Cancer. *Frontiers in Endocrinology*, 10(343), 1-8.

- Bascuñan, K., Araya, M., Pérez, F., (2014).** MicroRNAs, mecanismo epigenético para estudiar la enfermedad celiaca, *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 106(5), 325-33
- Bezan, A., Gerger, A., Pichler M. (2014).** MicroRNAs in Testicular Cancer: Implications for Pathogenesis, Diagnosis, Prognosis and Therapy. *Anticancer research*, 34, 2709-14.
- Bouljelbene N, Cosinschi A, Bouljelbene N, Khanfir K, Bhagwati S, Herrmann E, Mirimanoff R, Ozsahim M, Zouhair A. (2011).** Pure seminoma: A review and update, *Radiation Oncology*, 6(90), 1-12.
- Bray, F., Ferlay, J., Devesa, S., (2006).** Interpreting the international trends in testicular seminoma and nonseminoma incidence, *Nat Clin Pract Urol*, 3(10):532-43
- Cordoba, S., Guadarrama, I., Rodríguez, M., Hidalgo, A. (2014).** miRNA biogenesis: Biological impact in the development of cáncer. *Cancer Biology & Therapy* 15(11), 1444-1455.
- Das, M., Kleppa L., Haugen, B. (2019).** Functions of genes related to testicular germ cell tumour development. *Andrology*, 7, 527-535
- Dieckmann, K., Pichlmeier, U. (2004).** Clinical epidemiology of testicular germ cell tumors. *World J Urol* , 22, 2–14
- Dieckmann, K., Spiekermann, M., Balks, T., Flor, I., Bullrdiek, J., Belge, G. (2012).** MicroRNAs miR-371-3 in serum as Diagnostic tools in the management of testicular germ cell tumour. *British Journal of Cancer*, 107, 1754-1760.
- Di Leva, G., Garofalo, M., Croce, C. (2014).** microRNAs in cáncer. *Annu Rev Pathol*; 9, 287–314.

- Fawzy, F., Hussein, A., Mahmoud, M., Mahmoud, A., Khairy, H. (2015).** Cryptorchidism and Fertility. *Clinical Medicine Insight. Reproductive Health*, 9, 39-43.
- Ferguson L, AgoulNIK, A. (2013).** Testicular cancer and Cryptorchidism. *Frontiers in Endocrinology* 2013, 4,1-9.
- Ferlin, A., Zuccarello, D., Zucarello B., Chirico, M., Franco, G., Foresta, C. 2008.** Genetic alterations associated with cryptorchidism. *American Medical Association*, 300(19), 2271-76.
- Fernández, M., De Gonzalo, D., Diez, S., Dávalos, A., Iglesias, E. (2016).** MicroRNA circulantes como reguladores de la respuesta molecular al ejercicio en personas sanas. *Arch Med Deporte*, 33(6):394-403
- Foresta C., Zucarello D., Garolla A., Ferlin A. (2008).** Role of Hormones, Genes, and Environment in Human. *Endocrine Reviews*, 29(5), 560–580.
- Gao, Z., Zhu, X., Dou, Y. (2015).** The miR-302/367 *cluster*: a comprehensive up date on its evolution and functions. *The Royal Society*, 5(12), 1-7.
- Garzon, R., Fabbri, M., Cimmino, A., Calin, G., Croce, M. (2006).** MicroRNA expression and function in cáncer, *Trends in Molecular Medicine*, 12(12), 580-87.
- Gashaw, I., Dushaj, O., Behr, R., Biermann, K., Brehm, R., Rubben, H., Grobholz, R., Schmid, K., Bergmann, M., Winterhager, E. (2007)** Novel germ cell markers characterize testicular seminoma and fetal testis. *Molecular Human Reproduction*, 13, 721-727
- Gillis, A., Rijlaarsdam, M., Eini, R., Dorssers, L., Biermann, K., Murray, ..., Looijenga, L. (2013).** Targeted serum miRNA (TSmiR) test for dianosis and follow-up of

(testicular) germ cell cancer patients: A proof of principle. *Molecular Oncology*, 7,1083-92.

**Globocan** 2018: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2018, (13 de Julio de 2018) Recuperado de <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>

**Graves**, P., Zeng, Y. (2012). Biogenesis of Mammalian MicroRNAs: A Global View. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 10(5), 239-45.

**Grinspon**, R., Gottlieb, S., Bedecarrás, P., Rey, R. (2018). Anti-Müllerian Hormone and Testicular Function in Prepubertal Boys With Cryptorchidism. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 1-14.

**Gurney**, J., McGlynn, K., Stanley, J., Merriman, T., Signal, V., Shaw, C., ..., Sarfati, D. (2017). Risk factors for cryptorchidism. *Nat Rev Urol*, 14, 534-548.

**Gurtner**, A., Falcone, E., Garibaldi, F., Piaggio, G. (2016). Dysregulation of microRNA biogenesis in cancer: the impact of mutant p53 on Drosha complex activity. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 35(45), 1-9.

**Harel**, S., Ben-Moshe, N., Aylon, Y., Bublik, D., Moskovits, N., Toperof, G., ... Oren, M. (2015). Reactivation of epigenetically silenced miR-512 and miR-373 sensitizes lung cancer cells to cisplatin and restricts tumor growth. *Cell Death and Differentiation*, 22(8), 1328-40.

**Horwich** A, Shipley J, Huddart R. (2006). Testicular germ-cell cancer. *Lancet*. 367(9512), 754-65.

**Hutson** M., Balic, A., Nation, T., Southwell, B. (2010). Cryptorchidism. *Seminars in Pediatric Surgery*, 19, 215-24.

**Huyghe**, E., Matsuda, T., Thonneau, P. (2003). Increasing incidence of testicular cancer worldwide: a review. *Journal Urologic*, 170, 5-11.

**Jansson** M., Lund, A. (2012). MicroRNA and Cancer. *Molecular Oncology*, 6(6),590-610

**Jemal**, A., Bray, F., Center M., Farlay J., Ward E, Forman D. (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer Journal Clinical*. 61, 69-90.

**Kent**, O., Mendell, J. (2006). A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes. *Oncogene*, 25(46), 6188-96.

**Khan**, A., Ahmed, E., Elareer, N., Junejo,K., Steinhoff, M., Uddin , S. (2019). Role of miRNA-Regulated Cancer Stem Cells in the Pathogenesis of Human Malignancies. *Cells*, 8(8), 1-33.

**Kojima**, Y., Mizuno, K., Kohri, K., Hayashi,Y. (2009). Advances in Molecular Genetics of Cryptorchidism, *Urology*, 74(3):571-8.

**Komarowska**, M., Hermanowicz, A., Debek, W. (2015). Putting the pieces together: cryptorchidism – do we know everything?. *De Gruyter*, 28, 1-10.

**Kratz**, C., Mai, P., Green, M. (2010). Familial Testicular Germ Cell Tumors. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 24(3), 503-13.

**Kratz**, C., Han, S., Rosenberg, P., Berndt, S., Burdett, L., Yeager, M., Korde , A., Mai, P., Pfeiffer, R., Greene, M. (2011). Variants in or near KITLG, BAC1, DMRT1, and TERT-CLPTM1L predispose to familial testicular Germ Cell Tumour. *J Med Genet*, 48 (7), 473-76.

**Kurpisz**, M., Havryluk, A., Nakonechnyj, A., Chopyak, V., Kamieniczna, M. (2010). Cryptorchidism and long-term consequences. *Reproductive Biology*, 10(1), 19-35.

**Lan, H., Lu, H., Wang, X., Jin, H. (2015).** MicroRNAs as Potential Biomarkers in Cancer: Opportunities and ,Challenges. *BioMed Research International*, 2015(125094), 1-17.

**Looijenga, L., Gillis A., Stoop, H., Biermann, K., Oosterhuis, J. (2011).** Dissecting the molecular pathways of (testicular) germ cell tumor pathogenesis; from initiation to treatment-resistance. *International. Journal of Andrology*, 34, e234-e251.

**Mannuel, H., Mitikiri, N., Khan, M., Hussain, A. (2012).** Testicular germ cell tumors: biology and clinical update, *Current Opinion*, 24(3), 266-71.

**Martínez, A., Matelot, E., Vaucheret, H. (2013).** Gene silencing in plants: A diversity of pathways, *Biochimica et Biophysica Acta*, 829(12),1300-8

**Massart, F., Saggese G. (2010).** Morphogenetic Targets and Genetics of Undescended Testis. *Sexual Development*, 4(6), 326-35.

**McIver, S., Roman, S., Nixon, B., McLaughlin, E. (2011).** miRNA and mammalian male germ cells. *Human Reproduction Update*, 18(1), 44-59

**McIver, S., Roman, S., Nixon, B., Loveland, K., McLaughlin, E. (2014).** The rise of testicular germ cell tumours: the search for causes, risk factors and novel therapeutic targets. *F1000 Research*, 2, 1-11.

**Melo , C., Melo, S.,** Biogenesis and Physiology of MicroRNAs. *Non-Coding RNAs and Cancer*, 5-24.

**Mosbech, C., Rechnitzer, C., Brok, J., Meyst, E., Hoei, C. (2013).** Recent Advances in Understanding the Etiology and Pathogenesis of Pediatric Germ Cell Tumor. *Medical Progress*, 4, 263-270.

**Murray**, M., Halsall, D., Hook, E., Williams, D., Nicholson, J., Coleman, N. (2011). Identification of MicroRNAs from the miR-371-373 and miR-302 as Potential Serum Biomarkers of Malignant Germ Cell Tumors. *Am J Clin Pathol*, 135,119-125.

**Murray**, M., Huddart, A., Coleman, N. (2016). The present and future of serum diagnostic tests for testicular germ cell tumours. *Nature Reviews Urology*, 1-16.

**Myklebust**, M., Rosenlund, B., Gjengsto, P., Bercea, B., Karlsdottir, A., Brydoy, M., Dahl, O. (2019). Quantitative PCR Measurement of miR-371a-3p and miR-372-p is Influenced by Hemolysis. *Frontiers in genetics*, 10(463), 1-9.

**Namiki** K, Tsuchiya A, Noda K, Oyama H, Ishibashi K, Kusama H, Furusato, M. (1999). Extragonadal germ cell tumor of the prostate associated with Klinefelter's syndrome, *International Journal of Urology*, 6(3), 158-61.

**Nguyen**, D., Chang, S. (2017). Development of Novel Therapeutic Agents by Inhibition of Oncogenic MicroRNAs. *Molecular Sciences*, 17, 1-20.

**Nymann**, C., Damgaard, G., Rajpert-De, E., Skakkebaek, N., Holm, J., Jorgensen, N. (2013). Sperm Concentration, Testicular Volume and Age Predict Risk of Carcinoma In Situ in Contralateral Testis of Men with Testicular Germ Cell Cancer. *The Journal of Urology*, 190, 2074-80.

**Oosterhuis** J, Looijenga L. (2005). Testicular germ-cell tumours in a broader perspective, *Nature Reviews Cancer*. 5(3),10-22.

**O'Brien**, J., Hayder, H., Zayed Y., Peng C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology*, 9(402), 1-12.

**Palmer R,** Murray J, Saini H, VanDongen S, Abreu-Goodger C, Muralidhar B, ..., Coleman N. (2010) Malignant Germ Cell Tumors Display Common microRNA Profiles Resulting in Global Changes in Expression of mRNA Targets, *Cancer Res*, 70(7), 2911-23.

**Pascale, T.,** Gashaw, I., Hasenfus, F., Hacker, A., Winterhager, E., Grobholz, R. (2005). Differential Expression of IGF Components and Insulin Receptor Isoforms in Human Seminoma Versus Normal Testicular Tissue. *Neoplasia*, 7(5), 446-56.

**Pelloni, M.,** Coltrinari, G., Paoli, D., Pallotti, F., Lombardo, F., Lnezi, A., Gandini, L. (2016). Differential expression of miRNAs in the seminal plasma and serum of testicular cancer patients. *Endocrine*, 57(3), 518-27.

**Polakovicová, M.,** Musil, P., Laczo, E., Hamar, D., Kyselovic, J. (2016). Circulating microRNAs as Potential Biomarkers of Exercise Response. *Molecular Sciences*, 17, 1-20.

**Rijlaarsdam, A.,** Van-Agthoven, T., Gillis, A., Patel, S., Hayashibara, K., Lee, K., Looijenga, L. (2014). Identification of known and novel germ cell cancer-specific (embryonic) miRs in serum by high-throughput profiling, *Andrology*, 3(1), 85-91

**Schearfer, A.,** Jung, M., Kristiansen, G., Lein, M., Schrader, M., Miller K., Stephan C., Jung K. (2010). MicroRNAs and cancer: current state and future perspectives in urologic oncology. *Urologic Oncology*, 28, 4-13

**Selfe, J.,** Shipley, M. (2019). IGF signalling in germ cells and testicular germ cell tumours: roles and therapeutic approaches. *Andrology*, 7, 536-44.

**Sheikine, Y.,** Genega, E., Melamed, J., Lee, P., Reuter, V., Ye, H. (2012). Molecular genetics of testicular germ cell tumours. *American Journal of Cancer*, 2(2), 153-167.

**Syring, I., Bartels, J., Holdenrieder, S., Kristiansen, G., Muller, S., Ellinger, J. (2014).** Circulating serum microRNA (miR-367-3p, miR-371a-3p, miR-372-3p, miR-373-3p) as biomarkers for patients with testicular germ cell cancers, *The Journal of Urology*, 193(1), 331-7

**Skakkebaek, N., Rajpert-De Meyts, E., Main, K. (2001).** Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod*; 16, 972-78.

**Spiekermann, M., Belge, G., Winter, N., Ikogho, R., Balks, T., Bullerdiek, J., Dieckmann, K. (2014).** MicroRNA miR-371a-3p in serum of patients with germ cell tumours: evaluations for establishing a serum biomarker. *Andrology*, 3, 78-84

**Syring, I., Bartels, J., Holdenrieder, S., Kristiansen, G., Muller, S., Ellinger, J. (2014).** Circulating serum microRNA (miR-367-3p, miR-371a-3p, miR-372-3p, miR-373-3p) as biomarkers for patients with testicular germ cell cancers. *The Journal of Urology*, 1-16.

**Tasian, G., Hittleman, A., Kim, G., DiSandro, M., Baskin, L. (2009).** Age at orchiopey and testis palpability predict germ and Leydig cell loss: clinical predictors of adverse histological features of cryptorchidism. *J. Urology*; 182(2), 704-09.

**Trabert, B., Chen, J., Devesa, S., Bray, F., McGlynn, K. (2015).** International patterns and trends in testicular cancer incidence, overall and by histologic subtype. *Andrology*, 3(1), 4-12.

**Urh, K., y Kunej, T. (2016).** Molecular mechanisms of cryptorchidism development: update of the database, disease comorbidity, and initiative for standarization of reporting in scientific literatura. *Andrology*, 4, 1-9.

**Virtanen**, H, Bjerknes, R, Cortes, D, Jorgensen, N, Rajpert-De Meyts, E, Thorsson, A, Thorup J, Main, K . (2007). Cryptorchidism: classification, prevalence and long-term consequences. *Acta Paediatric*, 96(5), 611-6.

**Voorhoeve**, P., Le Sage, C., Schrier, M., Gillis, A., Stoop, H., Nagel, R., ..., Agami, R. (2006). A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Elsevier*, 124, 1169-81.

**Wahid**, F., Shehzad, A., Khan, T., Young, Y. (2010). MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1803, 1231-43.

**Wagner** P., Srivastava, S. (2012). New Paradigms in Translational Science Research in Cancer Biomarkers. *Institute National of health*, 159(4), 343-353.

**Wei**, Y., Wang, Y., Tang, X., Liu, B., Shen, L., Long, C., Lin, T., He, D., Wu, S., Wei, G. (2018). Efficacy and safety of human chorionic gonadotropin for treatment of cryptorchidism: A meta-analysis of randomised controlled trials *Journal of Pediatrics and Child Health*, 0, 1-7.

**Winter** C, Alberts P. (2010). Testicular germ cell tumors: pathogenesis, diagnosis and treatment, *Nature Reviews Endocrinology*, 7(1),43-53.

**Yang**, J., Lai, E. (2011). Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. *Molecular cell*, 43(6), 892-903.

**Yao**, S., (2016), MicroRNA biogenesis and their functions in regulating stem cell potency and differentiation. *Biological Procedures Online* 18(8), 2-10.

**Yasar, M., Sahin, S., Zengin, K., Seckin, S., Gurdald, M. (2018).** Detection of insulin-like growth factor receptor-1 in the human cremaster muscle and its role in the etiology of the undescended testis. *Asian Journal of Surgery*, 42(1), 290-296



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

### ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00209

Matricula: 2173801548

Perfil de expresión de los miRNAs: miR-371-373 y miR-367 en pacientes pediátricos con criptorquidia aislada.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 15:00 horas del día 29 del mes de noviembre del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA
- DRA. ROSA MARIA VIGUERAS VILLASEÑOR
- DR. DIDDIER GIOVANNI PRADA ORTEGA
- DR. EDMUNDO BONILLA GONZALEZ



FABIOLA GARCIA ANDRADE  
ALUMNA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: FABIOLA GARCIA ANDRADE

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

*Aprobado*

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

REVISÓ

MTRA. ROSALIA BERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

*[Signature]*  
DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

*[Signature]*  
DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA

VOCAL

*[Signature]*  
DRA. ROSA MARIA VIGUERAS VILLASEÑOR

VOCAL

*[Signature]*  
DR. DIDDIER GIOVANNI PRADA ORTEGA

SECRETARIO

*[Signature]*  
DR. EDMUNDO BONILLA GONZALEZ