



División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Posgrado en biología experimental

“Caracterización del nivel de expresión del clúster mir-371-373 y del mir-367 en un grupo de pacientes pediátricos con criptorquidia aislada”

T E S I S

Que para obtener el grado de
DOCTORA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:

MBE. FABIOLA GARCÍA ANDRADE

Matrícula: 2173801648

ORCID: 0000-0003-2267-2302

Correo: fabigarcia3378@gmail.com

COMITÉ TUTORAL

CO-DIRECTORA:

DRA. ROSA MARÍA VIGUERAS VILLASEÑOR,
Instituto Nacional de Pediatría (INP)

CO-DIRECTOR:

DR. IVÁN URIEL BAHENA OCAMPO,
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I)

ASESOR:

DR. DANIEL ADRIAN LANDERO HUERTA,
Instituto Nacional de Pediatría (INP)

JURADO

Presidente:

Dr. Edmundo Bonilla González

Secretario:

José de la Luz Díaz Chávez

Vocal:

Dr. Isidro Xavier Pérez Añorve

Vocal:

Dr. Daniel Adrian Landero Huerta

Iztapalapa, Ciudad de México, 22 de mayo, 2024.

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

La que suscribe Fabiola García Andrade alumna del posgrado en Biología Experimental, de la división de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autora de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada **“Caracterización del nivel de expresión del clúster mir-371-373 y mir-367 en un grupo de pacientes pediátricos con criptorquidia aislada”**

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el H. jurado para la obtención del grado de Doctora en Biología Experimental es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si esta no fuese mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 22 de mayo del 2024.

Atentamente



Fabiola García Andrade

CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

Ciudad de México, a 22 de mayo de 2024.

Comisión Académica del Posgrado

Presente

La que suscribe Fabiola Garcia Andrade alumna con número de matrícula 2173801648, del doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), manifiesto mi compromiso de mantener de forma confidencial y de no utilizar, divulgar o difundir por ningún medio, en beneficio propio o de terceros, la información, la documentación y datos de toda índole a los que tenga acceso y reciba con motivo del proyecto de investigación **“Caracterización del nivel de expresión del clúster mir-371-373 y mir-367 en un grupo de pacientes pediátricos con criptorquidia aislada”** a desarrollar en el Laboratorio de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Pediatría lo anterior en términos del artículo 6, fracción V, de los Lineamientos para el Acceso a la Información de la Universidad Autónoma Metropolitana. Esta obligación subsistirá incluso después de haber obtenido el grado.

Así mismo reconozco que toda información o dato obtenido dentro del proyecto que desarrolle pertenece a la Universidad Autónoma Metropolitana.

En caso de que contravenga este compromiso, la Universidad se reserva el derecho de ejercer las acciones civiles y penales que procedan, y en consecuencia, asumo cualquier responsabilidad por el manejo indebido o sin la previa autorización expresa de la UAM-I de la referida información o resultados, así como por los eventuales perjuicios que pudiese ocasionarse a esta Casa de Estudios.



Fabiola Garcia Andrade

“El programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Excelencia del CONACyT (PNPC), registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

El presente trabajo se realizó gracias al apoyo proporcionado por el CONACyT a través de la beca otorgada a El presente trabajo se realizó gracias al apoyo proporcionado por el CONACyT a través de la beca otorgada a la alumna Fabiola Garcia Andrade con el Número de Becario 637704.

MIEMBROS DEL JURADO

Los miembros del jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, abajo firmantes aprobaron la tesis titulada **"CARACTERIZACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DEL CLÚSTER hsa-miR-371-373 Y DEL hsa-miR-367 EN UN GRUPO DE PACIENTES PEDIÁTRICOS CON CRIPTORQUIDIA"**, que presentó la Mbe. Fabiola Garcia Andrade el día 22 de mayo del 2024.

Dr. Edmundo Bonilla González
Profesor Titular de Carrera Nivel C
Departamento de Ciencias de la Salud, UAM-I
mundo@xanum.uam.mx



Presidente

Dr. José De La Luz Díaz Chávez, Investigador en
Ciencias Médicas Subdirección de Investigación Básica,
Instituto Nacional de Cancerología
josediaz030178@hotmail.com



Secretario

Dr. Isidro Xavier Pérez Añorve
Profesor del Departamento de Ciencias Naturales
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa
xperez@cua.uam.mx



Vocal

Dr. Daniel Adrian Landero Huerta
Investigador en Ciencias Médicas "C"
Laboratorio de Biología de la Reproducción
Instituto Nacional de Pediatría
qdanielfadrianb@hotmail.com



Vocal

COMITÉ TUTORAL

Co-Directora Externa

Dra. Rosa María Viguera Villaseñor
Investigador en Ciencias Médicas "D"
Laboratorio de Biología de la Reproducción
Instituto Nacional de Pediatría
rmviguera@yahoo.com.mx



Co-Director Interno

Dr. Iván Uriel Bahena Ocampo
Investigador Titular "C"
Laboratorio de Biología Molecular y
Toxicología de la Gametogénesis,
CBS, UAM-Iztapalapa
ivan.bahena@gmail.com



Asesor

Dr. Daniel Adrian Landero Huerta
Investigador en Ciencias Médicas "C"
Laboratorio de Biología de la Reproducción
Instituto Nacional de Pediatría
qdanielfadrianb@hotmail.com



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado de Biología Experimental de la **Universidad Autónoma Metropolitana de la Unidad Iztapalapa** dentro del cual la MBE. Fabiola García Andrade con matrícula 2173801648 desarrolló sus estudios de Doctorado.

Al Coordinador del Posgrado en Biología Experimental el Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz, que bajo su noble cargo me brindó en todo momento las facilidades y el apoyo necesario para la realización de mis estudios de posgrado.

Este trabajo se realizó bajo la codirección interna del Dr. Iván Uriel Bahena Ocampo; perteneciente al Laboratorio de Biología Molecular y Toxicología de la Gametogénesis de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, así como, bajo la codirección externa de la Dra. Rosa María Viguera Villaseñor y de la asesoría del Dr. Daniel Adrian Landero Huerta; pertenecientes al Laboratorio de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Pediatría.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al **Instituto Nacional de Pediatría S.S.**, debido a que este trabajo se realizó en el **Laboratorio de Biología de la Reproducción** de este instituto, en la Torre de Investigación “Dr. Joaquín Cravioto” de la Subdirección de Medicina Experimental, bajo la dirección de la Dra. Rosa María Vigueras Villaseñor.

La realización de esta tesis se logró con el apoyo económico del **Fondo Federal** otorgado por el Instituto Nacional de Pediatría S.S. al proyecto general “Perfil de expresión de los miRNAs, miR-135a y el clúster miR-371-373 en pacientes con criptorquidia aislada” con número de registro **INP: 063/2018**, del cual deriva la presente Tesis.

A la Dra. Sara Elva Espinosa Padilla; Directora de Investigación, al M. en C. Heriberto Caballero Ortega; Subdirector de Medicina Experimental y a la Dra. Rosa María Vigueras Villaseñor; responsable del Laboratorio de Biología de la Reproducción; quienes bajo su noble cargo me brindaron todas las facilidades y el apoyo necesario para la realización de mis estudios de posgrado.

Al Dr. Iván Uriel Bahena Ocampo de la **Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa**, por su invaluable colaboración y apoyo.

Al Dr. Daniel Adrian Landero Huerta del **Instituto Nacional de Pediatría**, por su gran apoyo en todo momento.

Al **Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCyT)**, por otorgar la beca número 63770, para la realización de los estudios de Doctorado de la MBE. Fabiola García Andrade, registrada con el número de matrícula 2173801648 dentro del Posgrado en Biología Experimental de la UAM Iztapalapa.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Dra. Rosy, gracias por todo su apoyo, aprendí mucho con sus consejos y gracias por demostrar todo el tiempo interés en mi formación profesional y también en la parte personal.

Dr. Iván, gracias por sus consejos, por el tiempo que dedicó en la mejora de este trabajo y por su apoyo en todo momento.

Dr. Daniel, gracias por estar conmigo en cada momento, por guiarme, brindarme su amistad, por compartir su conocimiento, por todo el gran apoyo que recibí tanto en lo académico como en lo personal, por sus palabras de aliento y motivación, las cuales me ayudaron a cumplir esta meta.

Gracias al Dr. José, Dr. Xavier y al Dr. Edmundo, por haber aceptado ser parte del jurado en mi examen, muchas gracias por las preciadas correcciones y por su tiempo.

A todos los compañeros del laboratorio gracias por su compañía, su ayuda y apoyo, en especial a Itan, Norma y Jair gracias por los momentos que compartimos durante este camino.

Dr. Julio gracias por sus consejos y comentarios durante todo mi trayecto, los cuales fueron de gran ayuda para mi formación académica.

Pedro Medina, gracias por su gran apoyo en la técnica de inmunohistoquímica, en los cortes de parafina y por compartir sus conocimientos.

Agradezco a la M. en C. Lucero Cortés Trujillo por la selección de las muestras de los pacientes pediátricos con Criptorquidia.

A mi hermana Miriam, muchas gracias por estar siempre a mi lado, por escucharme y por comprenderme.

A mis queridos y hermosos meymis en especial a Diego por sus cariños y amor incondicional.

Un gracias muy especial a mi querida Dra. Margarita por el apoyo y amistad que me brindó desde que empecé todo este camino, del cual estaré eternamente agradecida y siempre la llevaré en mi corazón.

ABREVIATURAS

| | |
|--------------------------------|---|
| 3'UTR | Región no traducida 3' |
| ADAR | Adenosina desaminasa específica de ARN |
| AFP | α -fetoproteína |
| AGO2 | Argonauta RISC componente catalítico 2 |
| AKT | Serina/treonina quinasa 1 |
| AP-2γ | Factor de transcripción AP-2 Gamma |
| ARID4B | Proteína 4B que contiene un dominio interactivo rico en AT Birmingham |
| CCNA1 | Ciclina A1 |
| CDK | Cinasa dependiente de ciclina |
| CDK2 | Cinasa dependiente de ciclina 2 |
| CDK4 | Cinasa dependiente de ciclina 4 |
| CDK6 | Cinasa dependiente de ciclina 6 |
| cDNA | ADN complementario |
| CH | Coriocarcinoma |
| circRNA | RNA circulares |
| CO | Criptorquidia |
| CNV | Variación en el número de copias |
| CO- | Pacientes con criptorquidia sin inmuno-positividad a POU5F1, PLAP y |
| CO+ | Pacientes con criptorquidia con inmuno-positividad a POU5F1, PLAP y |
| CpG | Islas CpG (regiones de ADN) |
| D2-40 | Anticuerpo monoclonal D2-40 |
| DICER | Ribonucleasa miembro de la familia de las ARNasas. |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DNMT | DNA metiltransferasas |
| dNTP | Desoxinucleótido trifosfato |
| DROSHA | Enzima de clase 2 ribonucleasa III. |
| dsRNA | RNA de doble cadena |
| EC | Carcinoma embrionario |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| EpimiRNAs | Clase recientemente reconocida de miARN con capacidad para reprimir enzimas involucradas en la maquinaria epigenética. |
| FSH | Hormona foliculoestimulante |
| GALNT3 | Polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 3 |
| GAPDH | Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa |
| GCNIS | Neoplasia <i>in situ</i> de células germinales |
| GEO | Ómnibus de expresión genética |
| GEPIA | Análisis interactivo de perfiles de expresión genética |
| HE | Hematoxilina eosina |
| hsa-miR | microRNA humano |
| IGF1R | Receptor del factor 1 de crecimiento similar a la insulina |
| lncRNA | RNA largos no codificantes |

| | |
|------------------|---|
| INSL3 | Hormona peptídica similar a la insulina 3 |
| KEGG | Enciclopedia de genes y genomas de Kioto |
| KIT | Receptor tirosina cinasa |
| KPNA6 | Subunidad alfa 6 de carioferina |
| LARP7 | Ribonucleoproteína 7, reguladora transcripcional |
| LAST2 | Cinasa 2 supresora de tumores grandes |
| LDH | Lactato deshidrogenasa |
| LIN28 | Homologo A de Lin-28 |
| miRDB | Base de datos para la predicción de objetivos de miARN |
| miRISC | Complejo silenciador inducido por RNA |
| miRNAs | microRNAs |
| mRNA | RNA mensajero |
| mTOR | Mamífero objetivo de la rapamicina |
| ncRNAs | RNA no codificantes |
| nsTGCT | Tumor testicular de células germinales no seminomatoso |
| OMIM | Online Mendelian Inheritance in Man |
| p53 | Proteína supresora de tumor conocida como el guardián del genoma |
| p63 | Proteína tumoral p63 |
| PCG | Células germinales primordiales |
| pH | Potencial de hidrógeno |
| PIK3 | Fosfatidilinositol 3-quinasas |
| PLAP | Fosfatasa alcalina placentaria |
| POU5F1 | Factor de transcripción 1, clase 5, dominio POU |
| pre-miRNA | Precursor de miRNA |
| pri-miRNA | miRNA primario |
| PTEN | Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa |
| RISC | Complejo de silenciamiento inducido por ARN |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| RNU44 | ARN nucleolar pequeño, caja C/D 44 |
| RNU6B | ARN nuclear pequeño U6B |
| RR | Riesgo relativo |
| RT-PCR | Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa |
| RT-qPCR | Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real |
| RXFP2 | Receptor 2 del péptido de la familia relaxina/similar a la insulina |
| SALL4 | Factor de transcripción tipo spalt 4 |
| sdg | Semanas de gestación |
| SNV | Variante de un solo nucleótido |
| SPSS | Paquete estadístico para ciencias sociales |
| sTGCT | Tumor testicular de células germinales seminomatoso |
| T | Teratoma maduro |
| TAC | Software de consola de análisis de transcriptomas |
| TDS | Síndrome de disgenesia testicular |
| TGCT | Tumor testicular de células germinales |
| UALCAN | Portal de análisis de datos cáncer de la Universidad de Alabama en |
| Wnt | Sitio de integración relacionado con Wingless |

| | |
|-------------------------------|---|
| XPO5 | Exportina 5 |
| YST | Tumor de saco vitelino |
| β-hCG | β -gonadotropina coriónica humana |

RESUMEN

Antecedentes. La criptorquidia (CO) o no descenso testicular, es la malformación genitourinaria más frecuente en varones recién nacidos y representa un factor de riesgo importante para el desarrollo de tumor testicular de células germinales (TGCT) en edad adulta. Por lo que, resulta de gran relevancia el identificar los factores genéticos que sustentan la relación molecular entre la CO y el TGCT, lo que permitiría diagnosticar de manera temprana a los pacientes con CO, que presentan un riesgo más elevado de desarrollar esta neoplasia respecto a la población general. Dentro de dichos factores genéticos se encuentran los microRNAs (miRNAs). Particularmente, el clúster hsa-miR-371-373 y el hsa-miR-367 han sido propuestos como biomarcadores diagnósticos del TGCT. Por lo tanto, se propone que algunos pacientes con CO podrían presentar niveles de expresión altos de estos miRNAs, de manera similar a lo reportado en pacientes con TGCT. **Objetivo.** Se determinó la expresión relativa del clúster hsa-miR-371-373 y del hsa-miR-367, y su relación con la expresión de los transcritos *LAST2*, *IGF1R* y *PTEN* en pacientes con CO. **Materiales y métodos.** Se obtuvieron 36 muestras de tejido testicular distribuidas en tres grupos de estudio 1) CO, 2) TGCT y 3) Control. A partir de estos, se realizó la descripción histológica y mediante ensayos de inmunohistoquímica se evaluó la inmuno-positividad para POU5F1, KIT y PLAP. Seguido de esto, se determinó la expresión relativa del clúster hsa-miR-371-373, hsa-miR-367, *LAST2*, *IGF1R* y *PTEN* mediante RT-qPCR. **Resultados.** El 16.7% de los pacientes con CO (2/12) presentaron células germinales sugerentes de gonocitos inmuno-positivos para POU5F1, KIT y PLAP. Estos mismos pacientes mostraron un aumento en la expresión del clúster hsa-miR-371-373, del hsa-miR-367, así como, la disminución en la expresión de los genes *LAST2* e *IGF1R*. Finalmente, se identificó a los genes *ARID4B*, *GALNT3*, y *KPNA6* como posibles transcritos regulados por los miRNAs evaluados en el presente trabajo. **Conclusión.** Hasta el momento este trabajo es el primer reporte que muestra datos de expresión génica, que apoyan la teoría del gonocito como blanco de malignidad para el desarrollo del TGCT en pacientes pediátricos con CO.

ABSTRACT

Background. Cryptorchidism (CO), or undescended testis, is the most common genitourinary malformation in newborn males and represents an important risk factor for the development of testicular germ cell tumor (TGCT) in adulthood. Therefore, it is important to identify genetic factors that support the molecular relationship between CO and TGCT, which would also allow early diagnosis of CO patients who have a higher risk of developing this neoplasia than the general population. Some of these genetic factors are microRNAs (miRNAs). Particularly, the hsa-miR-371-373 cluster and hsa-miR-367 have been proposed as diagnostic biomarkers for TGCT. Therefore, we propose that some CO patients could present high expression levels of these miRNAs, similar to what has been reported in patients with TGCT. **Objectives.** The relative expression of the hsa-miR-371-373 and hsa-miR-367 clusters, and their relationship with the expression of *LAST2*, *IGF1R* and *PTEN* transcripts in CO patients was determined. **Methods.** 36 testicular tissue samples were obtained and distributed into three groups 1) CO, 2) TGCT and 3) Control. From these, the histological description was carried out and immune-positivity for POU5F1, KIT and PLAP was evaluated using immunohistochemistry. Following this, the relative expression of the hsa-miR-371-373 cluster, hsa-miR-367, *LAST2*, *IGF1R* and *PTEN* was evaluated by RT-qPCR. Finally, in silico assays were performed to identify other possible transcripts regulated by these miRNAs. **Results.** 16.7% of CO patients (2/12) presented germ cells suggestive of immune positive gonocytes for POU5F1, KIT and PLAP. These two patients showed increased expression levels of the hsa-miR-371-373 and hsa-miR-367 clusters, as well as decreased expression levels of *LAST2* and *IGF1R* transcripts. Finally, *ARID4B*, *GALNT3*, and *KPNA6* were identified as possible transcripts regulated by the miRNAs evaluated in the present work. **Conclusion.** This is the first report that shows gene expression data, which support the theory of the gonocyte as a target of malignancy for the development of TGCT in pediatric CO patients.

| ÍNDICE | PÁGINA |
|--|---------------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 19 |
| 2. ANTECEDENTES | 20 |
| 2.1 CRIPTORQUIDIA | 20 |
| 2.2 GONOCITO | 23 |
| 2.3 NEOPLASIA IN SITU DE CÉLULAS GERMINALES | 24 |
| 2.4 TUMOR TESTICULAR DE CÉLULAS GERMINALES | 26 |
| 2.5 CARACTERÍSTICAS DE LOS microRNAs | 29 |
| 2.6 DESREGULACIÓN DE LOS microRNAs EN EL CÁNCER | 32 |
| 2.7 EL CLÚSTER hsa-miR-371-373 Y EL hsa-miR-367 EN EL TGCT | 36 |
| 3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 38 |
| 4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN | 38 |
| 5. HIPÓTESIS | 38 |
| 6. OBJETIVO GENERAL | 38 |
| 6.1 OBJETIVOS PARTICULARES | 38 |
| 7. MATERIALES Y MÉTODOS | 39 |
| 7.1 CLASIFICACIÓN DEL ESTUDIO | 39 |
| 7.1.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO | 39 |
| 7.1.2 POBLACIÓN OBJETIVO | 39 |
| 7.1.3 POBLACIÓN ELEGIBLE | 39 |

| | | |
|-------|---|----|
| 7.2 | CRITERIOS DE SELECCIÓN | 40 |
| 7.2.1 | CRITERIOS DE INCLUSIÓN | 40 |
| 7.2.2 | CRITERIOS DE EXCLUSIÓN | 40 |
| 7.3 | CONSIDERACIONES ÉTICAS | 40 |
| 7.4 | DISEÑO EXPERIMENTAL | 41 |
| 7.5 | DESCRIPCIÓN EXPERIMENTAL DEL ESTUDIO | 42 |
| 7.5.1 | MUESTRAS BIOLÓGICAS | 42 |
| 7.5.2 | ANÁLISIS HISTOLÓGICO | 42 |
| 7.5.3 | ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO | 42 |
| 7.5.4 | AISLAMIENTO DE RNA TOTAL | 44 |
| 7.5.5 | EXPRESIÓN RELATIVA DEL hsa-miR-371-373 Y DEL hsa-miR-367 | 45 |
| 7.5.6 | SELECCIÓN DE TRANSCRITOS CANDIDATOS | 46 |
| 7.5.7 | EXPRESIÓN RELATIVA DE LOS TRANSCRITOS <i>LATS2, IGF1R Y PTEN</i> | 46 |
| 7.5.8 | ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO | 47 |
| 7.5.9 | ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 48 |
| 8. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 48 |
| 8.1 | CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOLÓGICAS DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO | 48 |
| 8.2 | ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO | 50 |

| | | |
|------|--|----|
| 8.3 | ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL CLÚSTER hsa-miR-371-373 Y DEL hsa-miR-367 | 54 |
| 8.4 | SELECCIÓN DE GENES CANDIDATOS | 61 |
| 8.5 | EXPRESIÓN RELATIVA DE LOS TRANSCRITOS <i>LATS2</i> , <i>PTEN</i> e <i>IGF1R</i> | 63 |
| 8.6 | ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO | 67 |
| 9. | CONCLUSIÓN | 73 |
| 10. | BIBLIOGRAFÍA | 74 |
| 11. | ANEXOS | 88 |
| 11.1 | ARTÍCULO CIENTÍFICO ORIGINAL | 89 |

1. INTRODUCCIÓN

La búsqueda de biomarcadores genéticos resulta de gran relevancia para apoyar la relación a nivel molecular entre la CO y el TGCT con el fin de obtener un biomarcador diagnóstico oportuno para los pacientes con CO que tienen un mayor riesgo de desarrollar el TGCT en la edad adulta.

Por lo que la presente tesis doctoral tuvo como objetivo determinar algunos marcadores inmunohistoquímicos característicos del TGCT (POU5F1, KIT y PLAP) en un grupo de pacientes con CO no sindrómica. Y con base en la inmuno-positividad clasificar los resultados de expresión génica (*hsa-miR-371-373*, *hsa-miR-367*, *LAST2*, *IGF1R* y *PTEN*) entre los pacientes pediátricos con CO. Permitiendo identificar a los pacientes pediátricos con CO con mayor riesgo de desarrollar TGCT en el futuro. Además de contribuir al conocimiento de posibles vías moleculares reguladas por los microRNAs involucradas en el desarrollo del TGCT.

Diversos estudios han demostrado que estos microRNAs pueden ser determinados en muestras de suero sanguíneo, mostrando mayor sensibilidad y especificidad diagnóstica respecto a los marcadores séricos utilizados convencionalmente para el diagnóstico, pronóstico y para determinar la respuesta al tratamiento del TGCT. Hasta la fecha este estudio el primer reporte que demuestra la sobre expresión del clúster *hsa-miR-371-373* y del *hsa-miR-367* en 16.7% de pacientes con CO. Por lo que estos resultados, abren a futuro, la posibilidad de replicar los resultados de este trabajo en una cohorte más amplia de pacientes; así como, evaluar si estos microRNAs pudieran identificarse de manera menos invasiva, en muestras de suero, apoyando su posible aplicación como marcador diagnóstico temprano.

2. ANTECEDENTES

2.1. CRIPTORQUIDIA

La criptorquidia o no descenso testicular (CO; OMIM 219050) es la malformación genitourinaria más frecuente en varones en edad pediátrica. Se estima que la CO afecta aproximadamente del 2.4 al 9% de los varones recién nacidos vivos a término a nivel mundial (Rodprasert et al., 2020). Sin embargo, su frecuencia varía entre las poblaciones, siendo Dinamarca el país con mayor frecuencia (9%) y Finlandia el país con la frecuencia más baja (2.4%), mientras que en México no se cuentan con datos epidemiológicos al respecto. Se ha descrito que factores poblacionales genéticos y ambientales juegan un papel importante en el desarrollo de esta malformación, lo que explica en parte estas diferencias epidemiológicas (Ferguson & Algounik, 2013).

La CO se puede clasificar de acuerdo al grado de afección como unilateral o bilateral; como se observa en la Figura 1, con base en su localización; como abdominal, inguinal o supraescrotal; como se observa en la Figura 2, con base en su origen; como congénita o adquirida (Rodprasert et al., 2020; Facer et al., 2022); o con base en la integridad del genoma; como sindromática o no sindromática (Barthold, 2008).

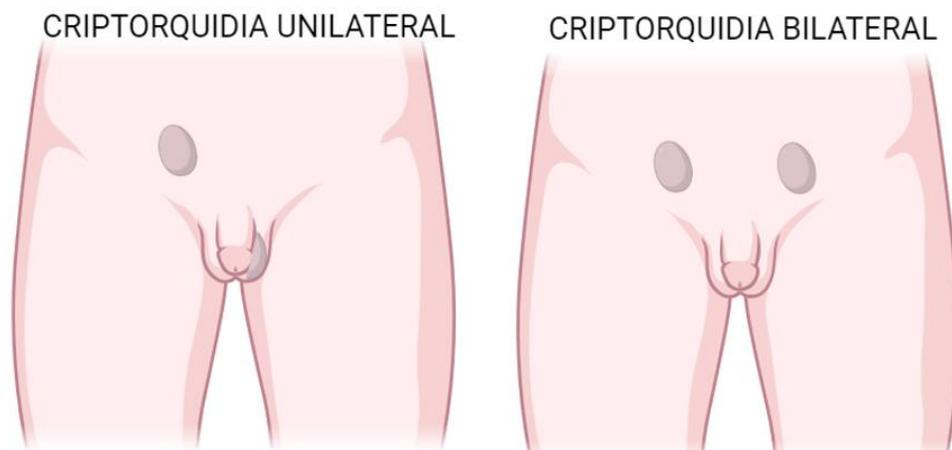


Figura 1. Clasificación de la CO con base en el grado de afección. Imagen creada con Biorender.com

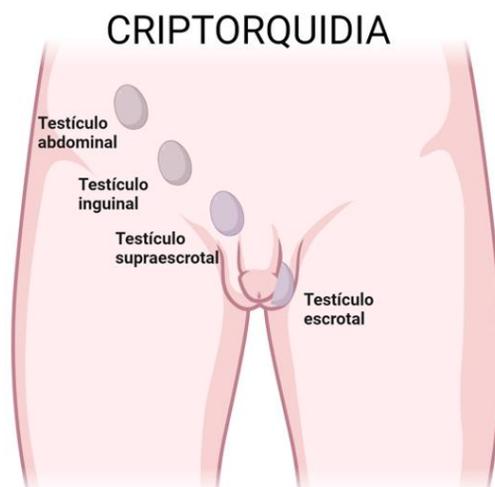


Figura 2. Clasificación de la CO con base en su localización. Imagen creada con Biorender.com

Para comprender la etiología de esta malformación y sus efectos a largo plazo, resulta necesario conocer el proceso de descenso testicular, este se divide en dos fases; la fase transabdominal y la fase inguino-escrotal. La primera fase ocurre entre las semanas de gestación (sdg) 8 a la 15, en la cual se da la regresión del ligamento suspensorio craneal que une a los testículos con los riñones. También se presenta un crecimiento del gubernáculo mediado por la acumulación de glicosaminoglucanos y ácido hialurónico, permitiendo la dilatación del canal inguinal para facilitar el descenso testicular desde el abdomen hacia la cavidad inguinal. En esta etapa participa INSL3 es sintetizada por las células de Leydig y se une al receptor acoplado a proteínas G, el receptor 2 del péptido de la familia relaxina/similar a la insulina (RXFP2). La segunda fase ocurre entre la sdg 25 y 35, durante este tiempo se lleva a cabo la regresión del gubernáculo y el cierre del anillo inguinal, permitiendo el paso del testículo a través del canal inguinal hacia el escroto. Esta fase es mayoritariamente dependiente de los andrógenos. La falla en alguna de las dos fases, tiene como resultado el desarrollo de la CO, siendo la fase inguino-escrotal la que se encuentra más comúnmente alterada en los pacientes con CO (Ferguson & Algounik, 2013; Ludwikowski & González, 2013; Gurney et al., 2017; Rodprasert et al., 2020).

Se ha descrito que, entre más tiempo el testículo se encuentre fuera del escroto, las células germinales pueden verse más afectadas (Rodprasert et al., 2020). De manera

habitual, los testículos deben encontrarse a 33°C, por lo que, una temperatura más alta favorece la muerte celular; generando una disminución en el número de células de Sertoli, germinales y de Leydig. Esto disminuye la calidad espermática; mediante la afección en la diferenciación de las espermatogonias, el retraso en el desarrollo de espermatocitos primarios y la reducción en el tamaño de los túbulos seminíferos (Ferguson & Algounik, 2013; Rodprasert et al., 2020). Sin embargo, otros reportes proponen que la pérdida de células germinales que lleva a la infertilidad en los pacientes con CO, se debe a la activación de transposones y la desregulación de la vía PIWI, que a su vez han sido relacionados con defectos en la minipubertad de roedores. Dichas alteraciones llevan a las células de Leydig a producir niveles bajos de testosterona, afectando la diferenciación de los gonocitos a espermatogonias. Por lo que, una fertilidad adecuada depende de una mini pubertad normal (Hadziselimovic et al., 2015).

A nivel clínico, se ha descrito que los pacientes con CO presentan un riesgo relativo (RR) de 4.8 (con intervalo de confianza al 95% de 4.0-5.7) de desarrollar el TGCT en edad adulta, respecto a la población general (Dieckmann & Pichlmeier, 2004). A su vez, se ha estimado que aproximadamente el 10% de los pacientes con TGCT presentaron antecedentes de CO en edad pediátrica (Batra et al., 2021; Yu et al., 2019). Actualmente, la relación clínica entre ambos padecimientos, podría explicarse por diversos reportes que demuestran que algunos pacientes con CO mantienen gonocitos pluripotentes de manera persistente más allá del periodo normal de diferenciación de estos (12 meses de edad) (Vigueras et al., 2015; Kvist et al., 2018). Por ejemplo, Clase-Linden et al., (2015), evaluaron marcadores de pluripotencia como POU5F1, LIN28 y D2-40 en 192 testículos de pacientes con CO de entre 2 a 14 años, encontrando que el 2% presentó células inmuno-positivas para estos marcadores. Por su parte, Vigueras et al., (2015), evaluaron en tejido testicular proveniente de pacientes pediátricos con CO, la presencia de marcadores característicos de la neoplasia *in situ* de células germinales (GCNIS, del inglés germ cell neoplasia *in situ*) y de la neoplasia testicular como POU5F1, KIT, PLAP, AP2 y SALL4 mediante inmunohistoquímica,

encontrando que el 21.6% de los pacientes evaluados (mayores a dos años de edad) mostraron células germinales inmuno-positivas para al menos una de las proteínas evaluadas, mientras que el 5.4% de los pacientes mostró células germinales inmuno-positivas para los 5 marcadores evaluados en el estudio. Por lo que, los hallazgos anteriores podrían apoyar a la teoría del gonocito como blanco de malignidad para el desarrollo del TGCT.

2.2. GONOCITO

Los gonocitos son los precursores fetales/neonatales de las espermatogonias indiferenciadas, el reservorio de por vida de células troncales germinales. El término gonocito fue acuñado en 1957 por Clemont y Perey, para designar a las células germinales primordiales (PGCs, del inglés primordial germ cells) que residen en la gónada en desarrollo (Culty, 2009). Morfológicamente, son células con un núcleo grande, esférico y eucromático, con uno o dos nucléolos, presentan una membrana celular bien delimitada y un citoplasma transparente casi vítreo que es menos eosinofílico que las espermatogonias de tipo A (Baillie, 1964).

Durante la segunda semana de gestación, células del epiblasto se derivarán hacia PGC, que son las células precursoras de los gonocitos fetales. Posteriormente, las PGC migrarán hacia la región extraembrionaria del saco vitelino cerca de alantoides, y luego hacia la cresta gonadal; denominándose gonocitos fetales. Durante la décima semana de gestación, los gonocitos fetales representan a las células germinales más abundantes, ubicándose centralmente dentro de los cordones seminíferos. Posteriormente, estos se convertirán en células intermedias con morfología similar y se ubicarán en la periferia de los cordones seminíferos. Una vez alcanzada la lámina basal por estas células, los gonocitos perderán su capacidad pluripotente y comenzarán a diferenciarse hacia espermatogonias tipo A (Baroni et al., 2019). Finalmente, entre los 3 a 6 meses de nacido, se favorecerá la diferenciación de los gonocitos neonatales, marcando como fecha límite de diferenciación de estas células a los 12 meses de edad. Durante este proceso, de manera paralela ocurre la mini

pubertad, que se caracteriza por la elevación en la concentración de hormonas como la gonadotropina coriónica humana (hCG) y de la testosterona, favoreciendo la proliferación de células de Sertoli, de Leydig y germinales (Loebenstein et al., 2020; Rodprasert et al., 2020;). Dicho proceso, permitirá consolidar nichos de espermatogonias que deberán proliferar y diferenciarse hacia espermatocitos, para que, durante la pubertad estas células se diferencien hacia espermátidas y subsecuentemente a espermatozoides.

2.3. NEOPLASIA *IN SITU* DE CÉLULAS GERMINALES

La GCNIS presenta células atípicas con citoplasma abundante, con un núcleo esférico o irregular con 1 o 2 nucléolos y estas se encuentran en contacto con la membrana basal (Baroni et al., 2019). De acuerdo con evidencia reciente, se propone que los gonocitos son los responsables de desarrollar la GCNIS, que es considerada como la lesión precursora del tumor testicular de células germinales (*TGCT*, del inglés testicular germ cell tumor) (Vigueras et al., 2015). Esta hipótesis se basa en las similitudes morfológicas entre los gonocitos y células atípicas del GCNIS, así como, en la presentación de una estructura de la cromatina permisiva, lo que se traduce en una actividad transcripcional elevada mediada por la presencia de factores de transcripción y proteínas como POU5F1, PLAP, NANOG, SALL4 y AP2 γ que regulan la capacidad pluripotente y proliferativa (Hoei et al., 2005; Almstrup et al., 2010; Landero et al., 2017). De tal manera que, si los gonocitos no se diferencian hacia espermatogonias y persisten más allá de la etapa neonatal en el testículo, estos deben ser programados para morir mediante apoptosis; lo que reflejará problemas de fertilidad en el futuro, si este mecanismo falla; los gonocitos se mantendrán como blancos de la transformación maligna en el testículo (Tien et al., 2020), como se muestra en la Figura 3.

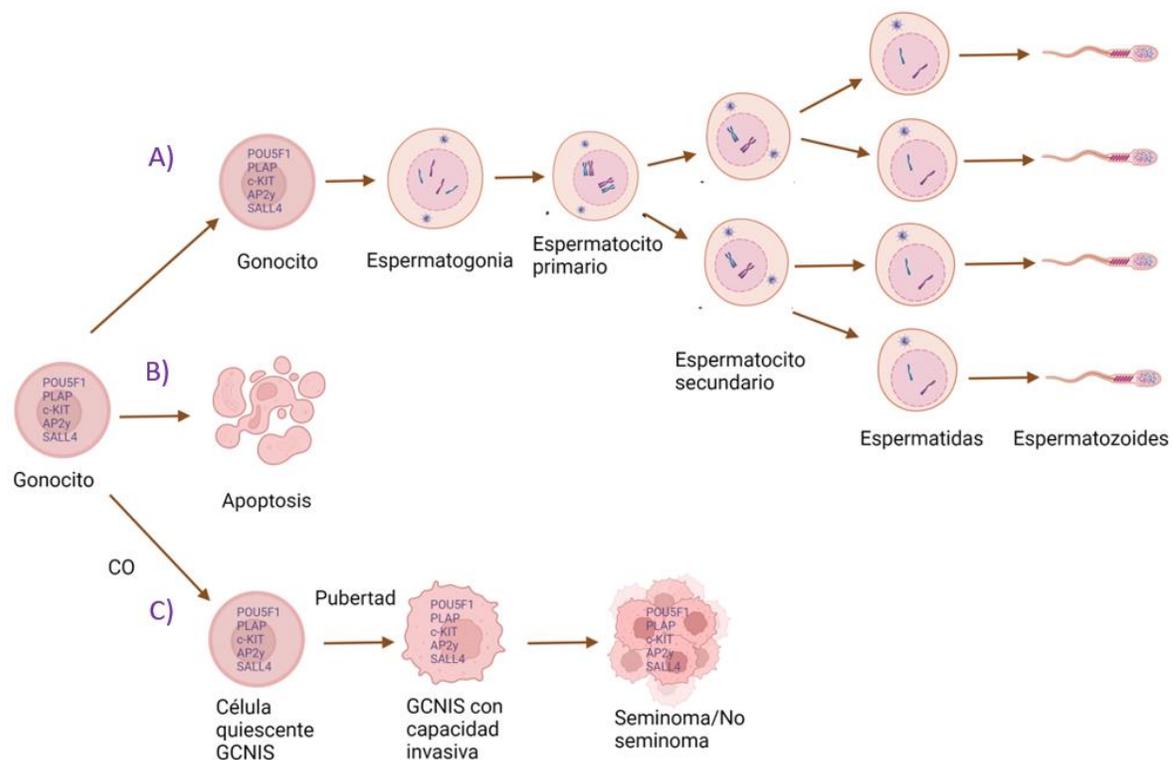


Figura 3. Teoría del gonocito como posible blanco de malignidad para el desarrollo del TGCT. A) Diferenciación normal del gonocito para el establecimiento de la espermatogénesis. B) Programación hacia la muerte celular de gonocito incapaz de diferenciarse. C) Gonocito persistente con capacidad pluripotente que durante la pubertad dará paso al establecimiento del GCNIS y el desarrollo subsecuente del TGCT. Imagen creada con Biorender.com

Se ha descrito que las células atípicas de la GCNIS presentan una proliferación invasiva del 50% dentro de los 5 años y del 70% dentro de los 7 años posteriores al diagnóstico (Hoei et al., 2005). Se ha propuesto que la transformación maligna del GCNIS puede ser provocada por la alteración en el microambiente testicular, que es estrictamente regulado y sensible a las hormonas (Rajpert-De Meyts, 2006; Ferguson & Algounik, 2013). Favoreciendo su progresión hacia el seminoma, carcinoma embrionario, tumor de saco vitelino, coriocarcinoma o teratoma. (Rijlaarsdaam et al., 2015).

Se ha descrito que las células atípicas de la GCNIS presentan una proliferación invasiva del 50% dentro de los 5 años y del 70% dentro de los 7 años posteriores al diagnóstico (Hoei et al., 2005). Se ha propuesto que la transformación maligna de

gonocitos hacia GCNIS puede ser provocada por la alteración en el microambiente testicular, que es estrictamente sensible a las hormonas (Rajpert-De Meyts., 2006; Ferguson & Algounik, 2013). Es decir, la desregulación en los niveles hormonales favorece la progresión de GCNIS hacia distintos tumores testiculares.

2.4. TUMOR TESTICULAR DE CÉLULAS GERMINALES

Los tumores testiculares se clasifican en dos grupos importantes. El primero corresponde a los tumores estromales; estos se originan del mesotelio proliferativo, y derivan hacia tumores de células de Sertoli y tumores de células de Leydig, estos se presentan en pacientes pediátricos y adultos y entre ambos tumores representan el 5% de los tumores testiculares. El segundo grupo corresponde al TGCT; estos se originan de las células germinales y derivan en un grupo heterogéneo de neoplasias, estos se presentan de igual manera en pacientes pediátricos y adultos y representan el 95% restante de los tumores testiculares (Hoei et al., 2005; Oosterhuis et al., 2005; Van agthoven & Looijenga, 2016).

Debido a su gran heterogeneidad, el TGCT se clasifica a su vez, en tres tipos diferentes. El TGCT tipo I, este no se encuentra relacionado a la GCNIS y se origina a partir de PGC tempranas o de gonocitos, derivando hacia tumores de saco vitelino y teratomas inmaduros, los cuales se presenta en sitios extragonadales, a lo largo de la línea media del cuerpo, como en las regiones retroperitoneal, el mediastino y la línea media del cerebro en pacientes neonatos o prepuberales. (Oosterhuis et al., 2005; Spiekermann et al., 2015).

El TGCT tipo II, se encuentra relacionado a la GCNIS presente durante la pubertad y se origina a partir de PGC o de gonocitos. Se presenta en pacientes de entre 15 y 45 años de edad y son considerados los tumores más comunes y más estudiados (Skakkebaek et al., 1987; Osterhuis et al., 2005; Facer et al., 2022). Estos se clasifican en el TGCT seminomatoso (sTGCT); que se origina del gonocito y deriva hacia el seminoma clásico (Fukawa et al., 2018), y en el TGCT no seminomatoso (nsTGCT); se origina de PCG, que son células troncales pluripotentes que derivan hacia el

carcinoma embrionario (EC), considerado como el paso de transición hacia el desarrollo de otros tipos de tumores germinales en el testículo (Semjén et al., 2020). Otro origen se desarrolla a partir de PGC o gonocitos ubicados en el saco vitelino; lo que deriva hacia el tumor de saco vitelino (YST) o también conocido como tumor del seno endodérmico (Zhu et al., 2020), también puede originarse a partir de células citotrofoblásticas y sincitiotrofoblásticas; lo que deriva hacia el coriocarcinoma (CH) (Shinoda et al., 2004), y finalmente, a partir de las tres capas germinales; conteniendo elementos derivados del ectodermo como el epitelio y tejido neural, derivados del mesodermo como músculo, cartílago, hueso y derivados del endodermo como intestino, páncreas y aparato respiratorio, derivando en el teratoma maduro (T).

Por último, se encuentra el TGCT tipo III, este tampoco se encuentra relacionado a la GCNIS, se origina a partir de espermatogonias o espermatocitos y deriva hacia el seminoma espermatocítico. Se presenta en hombres mayores de 50 años y son considerados como tumores benignos. Sin embargo, algunos pueden progresar hacia sarcomas (Oosterhuis et al., 2005), como se muestra en la Figura 4.

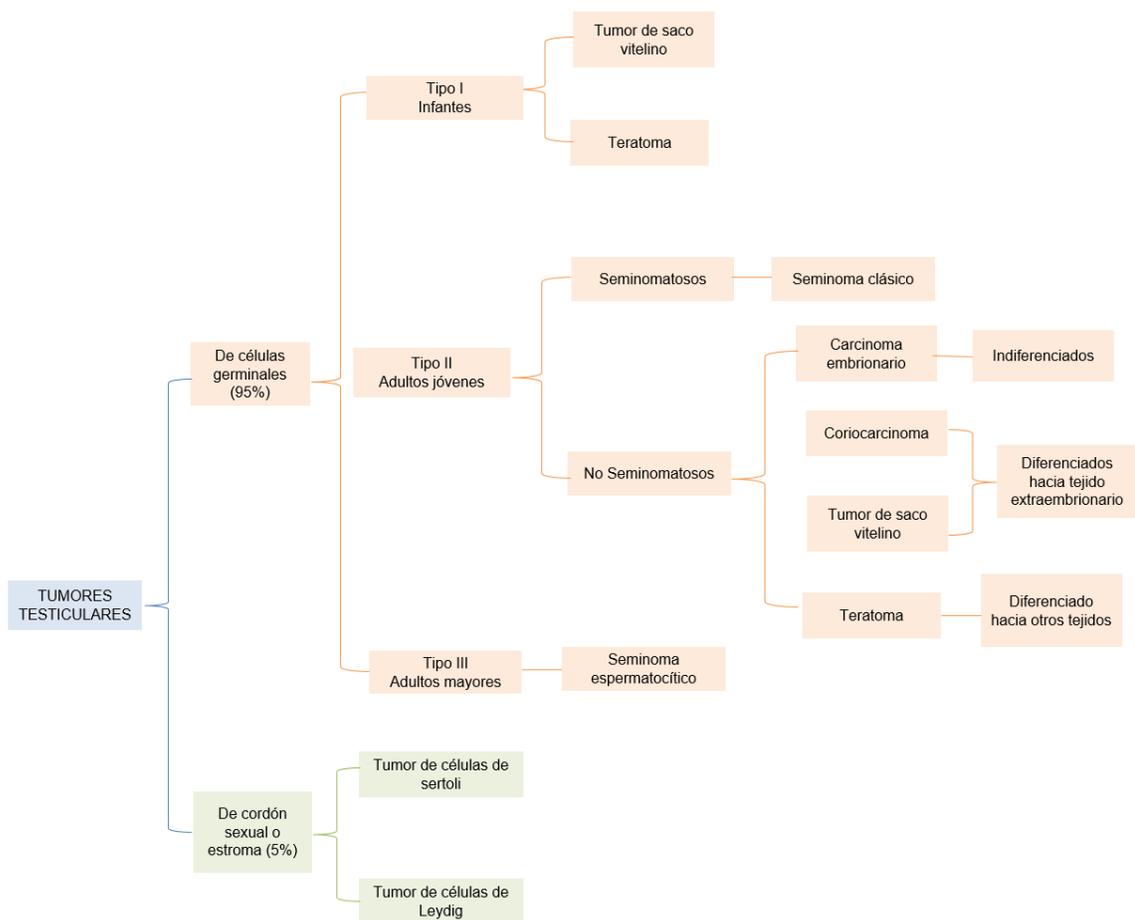


Figura 4: Clasificación del tumor testicular.

Algunos de los factores de riesgo relacionados al TGCT son el bajo peso al nacer, algunos síndromes cromosómicos, hernia inguinal, antecedentes familiares y personales de TGCT; así como, antecedentes personales de CO, hipospadias, microlitiasis o infertilidad, los cuales en conjunto con el TGCT componen al síndrome de disgenesia testicular (TDS, del inglés Testicular Dysgenesis Syndrome) (Dieckmann & Pichlmeier, 2004; Hoei et al., 2005; Rajpert-De Meyts, 2006). Se ha relacionado al TDS con la exposición a disruptores endocrinos que son sustancias químicas capaces de afectar la regulación endocrina y por lo tanto, el desarrollo gonadal en el útero (Oosterhuis et al., 2005; Rajpert et al., 2006; Rodprasert et al., 2020; Znaor et al., 2022;).

El TGCT es la neoplasia sólida más frecuente en varones jóvenes de entre 15 y 45 años de edad (Van agthoven & Looijenga., 2016). A nivel mundial afecta al 1% de la población masculina (Ferguson & Algounik, 2013). Para el año 2022, se diagnosticaron 2,831 nuevos casos de TGCT (tasa de 9.3 por cada 100,000 varones recién nacidos vivos) siendo el tumor con mayor incidencia en México. A su vez, se reportaron 525 nuevas muertes (tasa de 1.7 por cada 100,000 varones recién nacidos vivos) siendo el segundo cáncer más mortal en el país (Globocan 2022). Estos datos establecen la importancia de un diagnóstico temprano certero.

Actualmente, los marcadores convencionales utilizados para el diagnóstico del TGCT son la α -fetoproteína (AFP), β -gonadotropina coriónica humana (β -HCG) y lactato deshidrogenasa (LDH), aunque solo el 60% de todos los pacientes con TGCT tienen elevación de estos marcadores (Dieckmann et al., 2012; Murray et al., 2016). Además, la elevación de estos marcadores convencionales puede ser ocasionada por tumores en otros tejidos como el de hígado, páncreas, estómago, riñón o incluso por el consumo de marihuana, lo que puede complicar el diagnóstico, por lo que resulta importante la búsqueda de nuevos marcadores más sensibles y específicos que puedan medirse a partir de muestras poco invasivas y aportar información valiosa para el manejo clínico del paciente (Rijlaarsdaam et al., 2015; Regouc et al., 2020; Pajares et al., 2021).

2.5. CARACTERÍSTICAS DE LOS microRNAs

Los microRNA (miRNA) son RNA no codificantes (ncRNA) de aproximadamente 22 nucleótidos (Allegra et al., 2012). Se descubrieron por primera vez en 1990 en *Caenorhabditis elegans* y desde entonces se han reportado una amplia variedad de organismos incluyendo a los humanos. Los miRNAs se han conservado evolutivamente y se encuentran en regiones intergénicas, intrónicas o exónicas (Allegra et al., 2012). Un solo miRNA puede dirigirse a muchos genes blancos potenciales, participando en la regulación post transcripcional (Shah et al., 2021).

Los miRNAs regulan la expresión génica inhibiendo la traducción o desestabilizando al RNA mensajero (mRNA). Estos son procesados inicialmente como transcritos primarios (pri-miRNA) por la RNA polimerasa II o III. Posteriormente, se escinden en precursores de 65 a 70 nucleótidos (pre-miRNA) por la RNA Drosha. Los pre-miRNA se presentan como estructuras en horquilla termodinámicamente estables que se exportan al citoplasma a través de la proteína exportina y se procesan en miRNA maduros activos de 21 a 22 nucleótidos mediante la endonucleasa de RNA DICER dentro del complejo de silenciamiento de RNA (RISC). Los miRNA maduros se procesan aún más en RISC seleccionando una de las dos cadenas (-5p o -3p) y los guían a sus mRNA afines donde facilitan la desestabilización y eventual degradación del objetivo, evitan la traducción mediante el reclutamiento de factores inhibidores o, en algunos casos, pueden mejorar la estabilidad del RNA (Chen et al.,2015). De tal manera que, el miRISC (complejo de silenciamiento inducido por miRNA) participa induciendo la degradación del mRNA y la inhibición de la traducción mediante la interacción con la secuencia complementaria con la región 3' no traducible (3'UTR) del mRNA diana (Aly Syeda et al., 2020), como se observa en la Figura 5. Dicha regulación se determina por la secuencia semilla del miRNA que se une a la región complementaria de la región 3'UTR del mRNA. La región semilla comprende los nucleótidos del 2 al 8 del miRNA, siendo esta región la más crítica para la especificidad de unión, como se observa en la Figura 6.

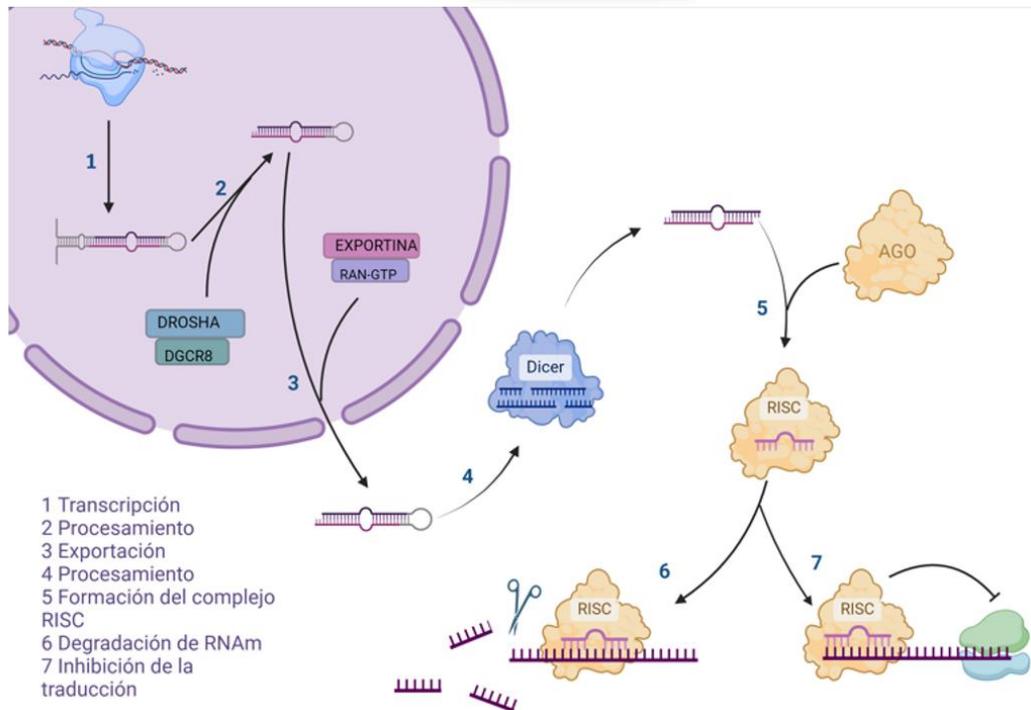


Figura 5. Biogénesis de los miRNAs. Imagen creada con Biorender.com

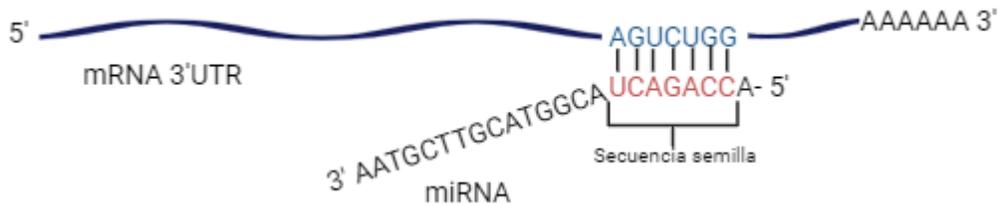


Figura 6 Reconocimiento de la secuencia semilla del miRNA con la región 3'UTR de su mRNA blanco.

Imagen creada con Biorender.com

En el ser humano se hasta ahora se han informado 1917 precursores de miRNA Y 2654 secuencias de miRNA maduros (Kozomara et al., 2019). Cuando se realizó el mapeo de miRNAs, encontraron que el 30% de éstos se encontraban ubicados muy cerca de otros miRNAs, a lo que llamaron clúster de miRNAs. Se cree que estos clústeres pudieron haber surgido de la duplicación de genes o por la aparición de

nuevas horquillas (Chen et al., 2015). Se ha visto que estos miRNAs son estables en diferentes tipos de tejido, resistentes a diferentes temperaturas de incubación de 4 o 37°C, a ciclos de congelación o descongelación, a la actividad de RNAsas y a las variaciones extremas en el pH (Allegra et al., 2012).

Los miRNA participan en la regulación de varios procesos biológicos como la diferenciación, proliferación, migración y muerte celular (Shah et al., 2021). También participan en la respuesta celular al estrés ambiental, como la inanición, la hipoxia, el estrés oxidativo y el daño al DNA, además de estar implicados en enfermedades humanas como en el cáncer, en donde los miRNAs pueden funcionar como oncogenes llamados oncomiRNAs o supresores de tumores llamados miRNAs supresores tumorales. Por lo que, la desregulación de los miRNAs está relacionada con el inicio, progresión y metástasis del cáncer (Spiekermann, et al., 2015; Ali Syeda et al., 2020). Estas biomoléculas, son específicas de tejido y han demostrado ser confiables para identificar el órgano de origen de metástasis (Rosenfeld et al., 2008; Allegra et al., 2012).

2.6 DESREGULACIÓN DE LOS microRNAs EN EL CÁNCER

Una gran cantidad de miRNA se encuentran relacionados al cáncer y las principales causas de su desregulación en células malignas puede deberse a diversos mecanismos (Pajares et al., 2021). Uno de los mecanismos que explica la alteración en los niveles de expresión de los miRNAs se debe a variaciones de *loci* como la pérdida o amplificación de regiones cromosómicas que contienen miRNAs (Calin & Croce, 2007).

A nivel de secuencia, podemos encontrar la edición de nucleótidos del RNA mediante las adenosinas desaminasas, las cuales actúan sobre el RNA (ADAR) convirtiendo la adenosina (A) en inosina (I) en RNA de doble cadena (dsRNA). Este dsRNA puede ser editado en la región del tallo y modificar su estructura secundaria ocasionando que los miRNAs se unan a blancos diferentes (Ali Syeda et al., 2020), como se muestra en la Figura 7A y B. Por otro lado, a nivel de DNA se pueden generar variantes de un solo

nucleótido (SNV) afectando el procesamiento y la estructura de los pri-miRNA o pre-miRNA, así como, modificaciones en la región semilla de los miRNAs, afectando la afinidad y el reconocimiento de estos con sus mRNA blanco, como se muestra la Figura 7C.

Otras alteraciones a nivel de *loci*, pueden explicarse mediante alteraciones cromosómicas estructurales o numéricas. Así como, por la generación de variaciones en el número de copias (CNV), las cuales favorecen la variación de la expresión de los miRNAs en función a la dosis génica (Ali Syeda et al., 2020). Adicionalmente, se ha demostrado que la presencia de SNV y CNV en algunos genes implicados en la biogénesis de los miRNAs, pueden afectar la expresión de estos mismos. Por ejemplo, se han reportado en cáncer de colon, endometrio, estómago y mama algunas mutaciones, así como, ganancias y pérdidas en el número de copias que afectan a *DICER*, *DROSHA*, *XPO5* y *AGO2*, favoreciendo la expresión aberrante de miRNAs, así como, la supresión de la exportación de pre-miRNAs, por mencionar algunos ejemplos (Ali Syeda et al., 2020) (Voorhoeve et al., 2006).

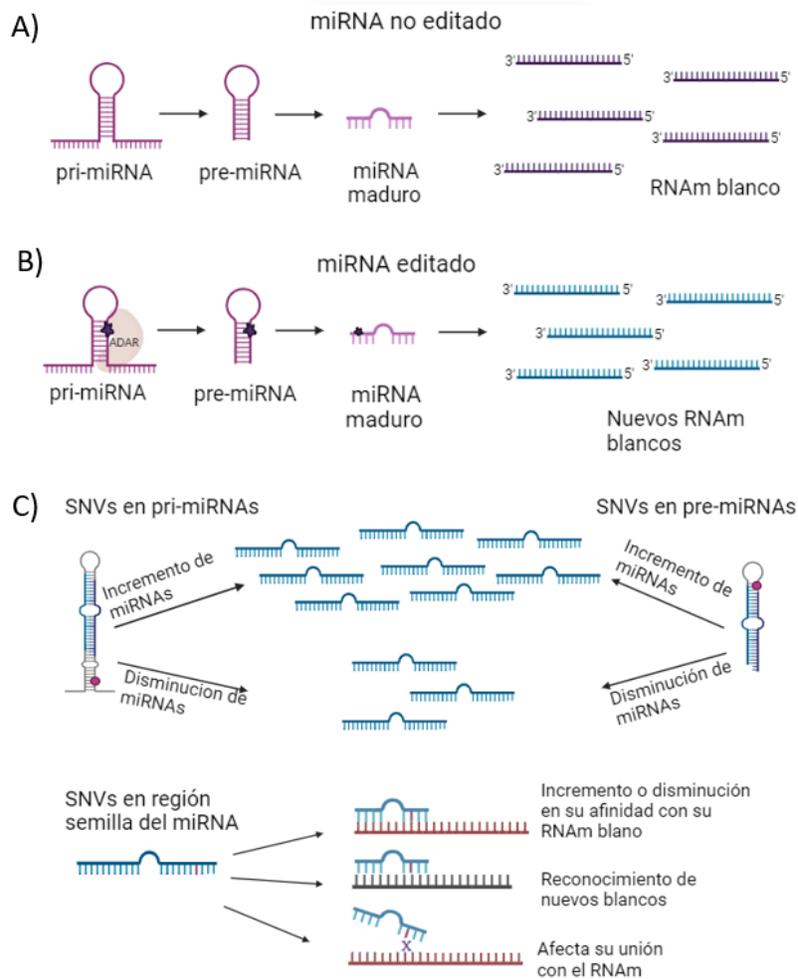


Figura 7. Efecto de la modificación de nucleótidos sobre la función de los miRNAs, (A) miRNA sin modificación por ADAR, B) Modificación en la secuencia ADAR de adenosina o inosina en pri-miRNAs y pre-miRNAs afectando su procesamiento, uniéndose a nuevos blancos, C) SNVs en pri-miRNAs y pre-miRNAs pueden afectar el procesamiento y la estructura secundaria y SNVs en la región semilla puede afectar la afinidad por sus genes blanco o reconocer nuevos blancos. Imagen creada por Biorender

Otro de los mecanismos que explican la alteración en los niveles de expresión de los miRNAs en diferentes tumores, se deben a la presencia de ejes de regulación que actúan a nivel postranscripcional o mediante mecanismos epigenéticos. Se han reportado RNA no codificantes (ncRNAs) como los RNA circulares (circRNA) y los RNA largos no codificantes (lncRNA), los cuales afectan la unión de los miRNAs con sus blancos, actuando como competidores endógenos, como se muestra en la Figura 8A. Por otro lado, dentro de los mecanismos epigenéticos, se ha descrito como la hipo e hipermetilación de las islas CpG, así como, las modificaciones de las histonas

modifican los patrones de expresión de los miRNAs en el cáncer. Sumado a esto, se ha demostrado como algunos miRNAs, denominados como epimiRNAs, pueden regular la expresión de enzimas encargadas de modificar químicamente el DNA e histonas, como las DNMT, entre muchas otras, y afectar así, en los patrones de expresión en el cáncer (Pajares et al., 2021), como se observa en la Figura 8B.

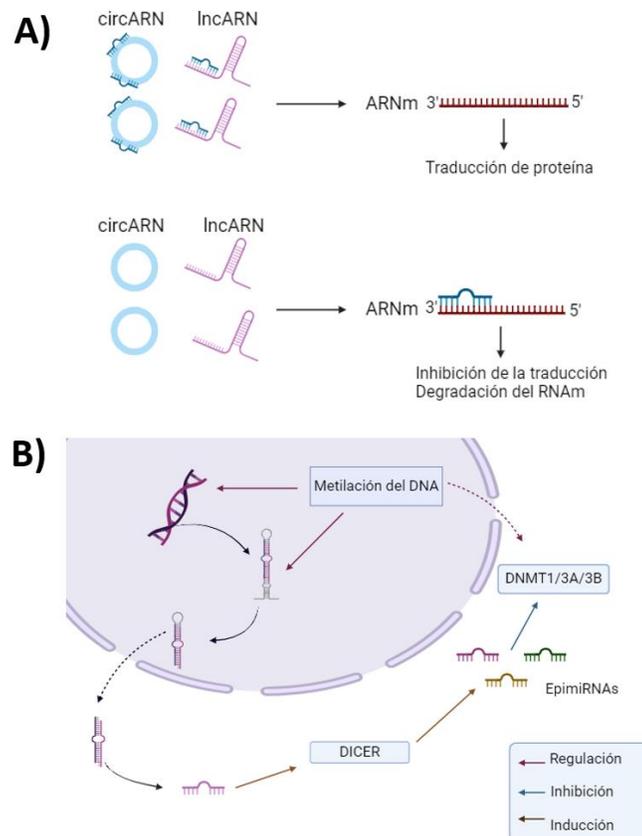


Figura 8. Regulación postranscripcional y epigenética de los miRNAs. A) RNA largos no codificantes (lncRNA) y RNA circulares (circRNA) afectan la interacción de los miRNAs con sus genes blanco al participar como competidores endógenos, B) Epi-miRNAs en la modulación de factores epigenéticos relacionados a la metilación del ADN como DNMT1, DNMT3A, DNMT3B. Imagen creada con Biorender.com.

Estos antecedentes demuestran que conocer los patrones de expresión normales de los miRNAs, así como, sus mecanismos de acción, puede ser de gran utilidad para identificar nuevos biomarcadores diagnósticos, pronósticos y de respuesta al tratamiento en el cáncer.

2.7 EL CLÚSTER hsa-miR-371-373 Y EL hsa-miR-367 EN EL TGCT

Un biomarcador ideal para el diagnóstico del TGCT, debe ser estable, capaz de discernir entre el paciente y un individuo sano, independientemente de la edad del paciente y del tipo histológico del tumor (Murray et al., 2016). Algunos de los miRNAs que han propuesto como posibles biomarcadores para el TGCT son los clústeres hsa-miR-371-373 y hsa-miR-302/367.

El clúster hsa-miR-371-373 se encuentran en el brazo largo del cromosoma 19 (Dieckmann et al., 2012). Este participa en el mantenimiento de la pluripotencia de las células troncales embrionarias (Regouc et al., 2020). La expresión de los miRNAs de este clúster ha sido propuesto como un potencial biomarcador del TGCT, debido a que, de manera conjunta los 3 miRNAs se presentan en niveles altos de expresión para esta neoplasia y su determinación ha demostrado ser adecuada para el diagnóstico y seguimiento (Murray et al., 2016). Adicionalmente, se ha reportado que este mismo clúster se presenta a niveles de expresión ligeramente aumentados en pacientes con diagnóstico de la GCNIS (Spiekerman et al., 2014; Lobo et al., 2021). Además, se ha reportado la sobreexpresión de este clúster en células germinales primordiales, gonocitos fetales/neonatales y células troncales en el testículo humano, por lo que, es importante la regulación sin alteraciones del gonocito durante la etapa neonatal, para evitar la progresión del cáncer (Voorhoeve, 2006; Wu et al., 2014).

Se ha reportado que el hsa-miR-371-3p posee mayor sensibilidad para el diagnóstico del TGCT, respecto a los miRNAs restantes del clúster y del hsa-miR-367 (Regouc et al., 2020). El hsa-miR-371 es considerado como un biomarcador prometedor para la detección, pronóstico y recurrencia del TGCT. Dieckmann et al., (2019), demostraron que el hsa-miR-371-3p se sobreexpresa en pacientes con TGCT en comparación de individuos sanos. Además, demostraron que los niveles séricos de este miRNA disminuyeron 24 horas después de la orquiectomía y de la quimioterapia (Anheuser et al., 2017; Dieckmann et al., 2012).

Así mismo, se ha reportado que el clúster hsa-miR-371-373 regula la expresión de algunos transcritos provenientes de genes implicados en la regulación del ciclo celular, como *CDK2*, *CDK4* y *CDK6*, así como, en la inhibición de la senescencia inducida por el estrés oncogénico, llevando a la transformación maligna de las células germinales (Shah et al., 2021). Específicamente, se ha reportado a *CDK2* y *CCNA1* como blancos directos del hsa-miR-372 en células Hela, regulando la progresión y proliferación del ciclo celular negativamente (Shah et al. 2021).

Por otro lado, el hsa-miR-367 forma parte del clúster hsa-miR-302/367, se ubica a nivel intrónico del gen *LARP7* en el cromosoma 4q25 y es transcrito por la RNA polimerasa II. Este clúster se expresa específicamente en células troncales embrionarias indiferenciadas y en el carcinoma embrionario, participa en el mantenimiento de pluripotencia y en la formación del cáncer, así como, en la regulación de la proliferación, reprogramación y diferenciación celular. (Van Agthoven & Looijenga, 2016; Gao et al., 2015). El clúster hsa-miR-302/367 inhibe al gen *CDKN1A* lo que aumenta la expresión del complejo ciclina E/CDK, promoviendo la transición de las células troncales embrionarias de la fase G1 a la fase S (Gao et al., 2015). También inhibe a p63 regulando la apoptosis en células troncales embrionarias y en células cancerosas (Kuo et al., 2012).

Syring et al. (2015) identificaron la sobreexpresión del hsa-miR-367 en pacientes con TGCT respecto a individuos sanos, también mostraron que este miRNA se encuentra expresado a niveles más altos en el seminoma que en el no seminoma y que la expresión del hsa-miR-367 es más alta dependiendo del estadio del TGCT, por lo que entre más avanzado sea el estadio, mayor es la expresión de este.

Hasta la fecha, únicamente se ha observado la sobreexpresión coordinada el clúster hsa-miR-371–373 y el hsa-miR-302–367 en el TGCT, la cual no se ha demostrado en otro tipo de tumor (Murray et al., 2016). Por lo que estos proporcionan una alta especificidad y son los candidatos más prometedores como biomarcadores para el diagnóstico del TGCT (Regouc et al., 2020).

3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La CO es el defecto congénito genitourinario al nacimiento más frecuente en varones a término y es considerada una anomalía urogenital frecuente y uno de los factores de riesgo mejor documentado para el desarrollo de TGCT. Actualmente, esta neoplasia representa al tumor sólido más frecuente en varones jóvenes y diversos autores proponen que el diagnóstico y pronóstico de este tumor podría beneficiarse de la determinación de los niveles de expresión del clúster hsa-miR-371-373 y del hsa-miR-367, debido a que estos miRNAs presentan mayor especificidad y sensibilidad en comparación con los marcadores séricos convencionales utilizados en la práctica clínica. Por lo que, caracterizar los niveles de expresión del clúster hsa-miR-371-373 y del hsa-miR-367 en un grupo de pacientes pediátricos con CO, nos permitirá evaluar su pertinencia como biomarcador diagnóstico temprano, en pacientes con padecimientos de riesgo a desarrollo de la neoplasia testicular en edad pediátrica.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cómo serán los niveles de expresión del clúster hsa-miR-371-373 y del hsa-miR-367 en pacientes pediátricos con CO?

5. HIPÓTESIS

Los pacientes con CO presentarán niveles altos de expresión del clúster hsa-miR-371-373 y del hsa-miR-367 de manera similar a los pacientes con TGCT.

6. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los niveles de expresión del clúster hsa-miR-371-373 y del hsa-miR-367 en un grupo de pacientes pediátricos con CO.

6.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Describir las características clínico-patológicas de los grupos de estudio.
2. Determinar la inmuno-positividad a POU5F1, PLAP y KIT en los grupos de estudio.

3. Determinar los niveles de expresión relativa del clúster hsa-miR-371-373 y del hsa-miR-367 en los grupos de estudio.
4. Determinar los niveles de expresión relativa de algunos transcritos reportados en la literatura como blancos validados del clúster hsa-miR-371-373 y del hsa-miR-367 en los grupos de estudio.
5. Integrar y describir los patrones de expresión identificados en el grupo con CO.
6. Identificar otros posibles transcritos regulados en común por el clúster hsa-miR-371-373 y por el hsa-miR-367.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 CLASIFICACIÓN DEL ESTUDIO

- Finalidad: Comparativa
- Secuencia Temporal: Transversal
- Control de asignación de los factores de estudio: Observacional
- Direccionalidad: Retrospectivo

7.1.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

7.1.2 POBLACIÓN OBJETIVO

Pacientes pediátricos mexicanos con diagnóstico confirmado de CO no sindrómica y pacientes mexicanos con diagnóstico confirmado de TGCT.

7.1.3 POBLACIÓN ELEGIBLE

Pacientes pediátricos con diagnóstico de CO aislada y pacientes con diagnóstico de TGCT que hayan acudido a recibir atención al Instituto Nacional de Pediatría y al Instituto Nacional de Cancerología entre 2013 y 2021.

7.2. CRITERIOS DE SELECCIÓN

7.2.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Pacientes provenientes de la República Mexicana con ascendencia mexicana mínima de dos generaciones.
- Pacientes con diagnóstico confirmado de CO no sindrómica.
- Pacientes con diagnóstico confirmado de TGCT primario, vírgenes al tratamiento con o sin antecedentes de CO.

7.2.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Pacientes con diagnóstico de CO adquirida.
- Pacientes con testículo retráctil o dudosamente criptorquídico.
- Pacientes con antecedente de cirugía inguinal.
- Pacientes con alguna otra anomalía genital.
- Pacientes con algún síndrome cromosómico.

7.3 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Es importante mencionar que el presente trabajo de tesis cumplió con lo estipulado en los principios de la Declaración de Helsinki y en el título segundo del Reglamento de La Ley General de Salud en materia de investigación para la salud. Según esta ley vigente en nuestro país el estudio corresponde a la categoría I. A los pacientes y sus familiares, se les explicó las características y objetivos del estudio especificando las ventajas, desventajas y posibles riesgos para los participantes.

Todos los participantes del estudio mayores de 12 años firmaron una carta de asentimiento informado, mientras que los padres de los participantes menores de 12 años firmaron una carta de consentimiento informado. La información obtenida de los pacientes durante el estudio se mantuvo con estricta confidencialidad y se mantuvo con estricto apego a la Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los derechos humanos promulgada por la UNESCO.

7.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se incluyeron 36 muestras de tejido testicular incluido en parafina, las cuales se distribuyeron en los siguientes grupos: 1) Grupo control; que corresponde a individuos sin ninguna alteración urológica, las muestras fueron obtenidas del Instituto de Ciencias Forenses (INCIFO, Ciudad de México), 2) Grupo CO y 3) Grupo TGCT, muestras referidas del servicio del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Pediatría (INP, Ciudad de México) y del Instituto Nacional de Cancerología (INCan, Ciudad de México) respectivamente. Durante la realización de este trabajo, se estableció como grupo principal de estudio al grupo CO, asignando así, al grupo Control; como control negativo de los ensayos y al grupo TGCT; como control positivo de los mismos.

Inicialmente, se realizó un análisis morfológico e inmunohistoquímico para POU5F1, PLAP y KIT. Seguido de esto, se realizaron los ensayos para determinar la expresión relativa del clúster hsa-miR-371-373 y del hsa-miR-367; así como, de los transcritos blancos reportados en la literatura para estos miRNAs (*LATS2*, *PTEN* e *IGF1R*). A partir de estos resultados, se reagrupamos los resultados de expresión relativa del grupo CO, con base en la inmuno-positividad a los anticuerpos previamente descritos. Finalmente, mediante un análisis bioinformático, se realizó la búsqueda y selección de otros posibles blancos regulados en común por los miRNAs evaluados en el presente trabajo, como se muestra en la Figura 10.

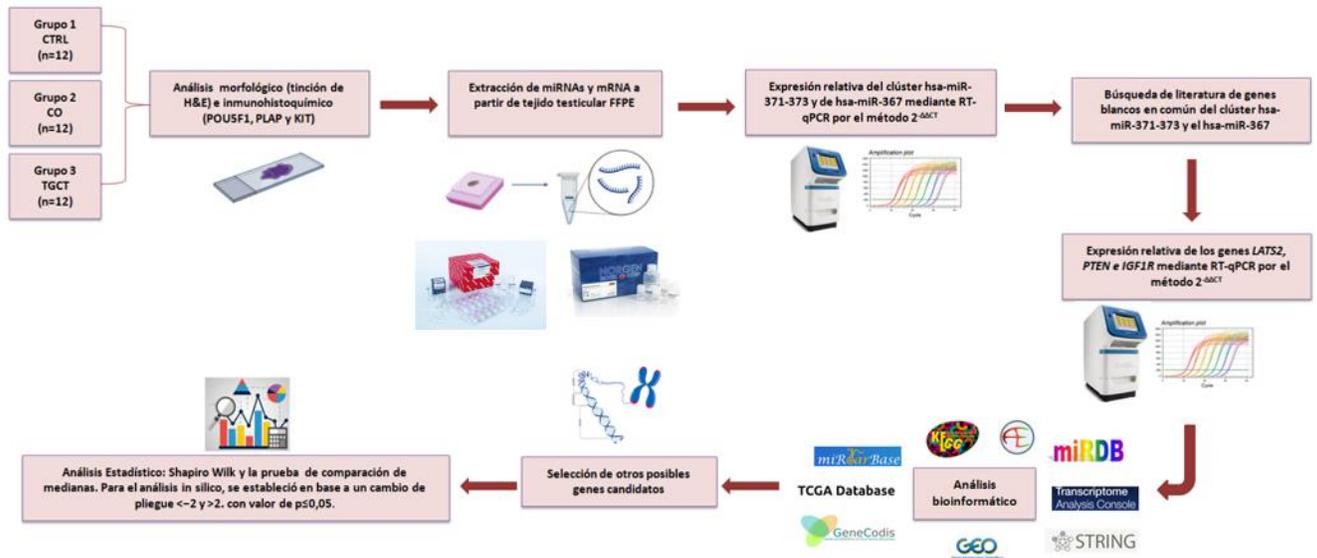


Figura 10. Diseño experimental.

7.5 DESCRIPCIÓN EXPERIMENTAL DEL ESTUDIO

7.5.1 MUESTRAS BIOLÓGICAS

El estudio se realizó a partir de muestras de tejido testicular incluido en parafina (FFPE) en todos los grupos de estudio.

7.5.2 ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Para el análisis de morfológico, se seccionaron cortes de 4 μm de grosor en un micrótopo (Leica RM 2155; Microsystems, Nussloch GmbH, Alemania). Éstos se montaron en portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, EE. UU.) y se contrastaron con la tinción de Hematoxilina-eosina (HE). Finalmente, se observaron de 5 a 10 secciones transversales de tubos seminíferos por laminilla.

7.5.3 ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO

Las secciones de tejido se desparafinaron y se hidrataron en una serie graduada de etanol. Para cada paciente, las secciones de tejidos se incubaron en EDTA 0,1 M pH 9 (recuperación inmunodual con EDTA) para POU5F1 o tampón de citrato 0,1 M, pH

6,0 (Bio SB, Sta. Barbara, CA, EE. UU.) para vimentina, KIT y PLAP en el microondas con una olla a presión (NordicWare® Microwave Tender Cooker, Biogenex, San Ramon CA, EE. UU.) durante 1 minuto a alta potencia (1000 W). Después de enfriar, las secciones de tejido se incubaron en H₂O₂ al 0,9 % en agua destilada durante 5 minutos.

Las secciones se incubaron consecutivamente con anti-vimentina (anticuerpo monoclonal de ratón a una dilución de 1:50, Dako Cytomation, Carpinteria CA, EE. UU., M 0725, lote 092) durante 45 minutos a temperatura ambiente, seguido de un anticuerpo secundario acoplado a biotina. y posteriormente se incubaron con solución de peroxidasa de rábano picante acoplada a estreptavidina durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción de diaminobencidina se usó para observar la inmuno-positividad celular. Para POU5F1 se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón a una dilución 1:50, (Santa Cruz, Biotechnology CA, USA, SC 5279, lote F2513), durante 45 minutos a temperatura ambiente seguido de un sistema libre de biotina [(Secondary Antibody anti-ratón-HRP, polímero (MACH 2 Mouse HRP-Polymer, Biocare Medicals, Concord, CA, EE. Bio SB, Santa Bárbara, CA, EE. UU.). Para KIT/CD117, se usó un anticuerpo monoclonal de ratón, dilución 1:50, (Leica Novocastra Bannock, IL, EE. UU. L-CD117, lote 6014169) durante 45 minutos a temperatura ambiente y se usó un sistema de anticuerpo secundario acoplado a biotina, solución peroxidasa de rábano picante acoplada con estreptavidina durante 30 minutos a temperatura ambiente y mezcla de sustrato de diaminobencidina (Bio SB). Para PLAP, se usó un anticuerpo monoclonal de ratón de dilución 1:50, Dako Cytomation M7191, durante 45 minutos a temperatura ambiente usando un anticuerpo secundario acoplado a biotina y estreptavidina acoplado a fosfatasa alcalina (BioGenex, CA, EE. UU., LA000-UL) durante 30 minutos y un sustrato de fosfatasa alcalina (BioGenex) según las instrucciones del fabricante. Al final de la reacción, las secciones se contrastaron con hematoxilina de Gill y se cubrieron con medio entellan (Merck, Darmstadt, Alemania).

Debemos indicar que la vimentina sirvió para verificar la integridad de los sitios antigénicos. Las secciones de control negativo se procesaron de manera idéntica, pero se omitió el paso de incubación del anticuerpo primario. Ninguno de los controles negativos mostró inmuno-positividad. El tejido tumoral sirvió como control positivo. Para la identificación de células germinales que mostraban una señal positiva, se examinaron de 5 a 10 secciones transversales de túbulos seminíferos. En los casos en que se observaron señales positivas de células germinales solo en algunos túbulos seminíferos, esta expresión focal se clasificó como un resultado positivo.

7.5.4 AISLAMIENTO DE RNA TOTAL

Se obtuvieron cuatro cortes de 4 μm de grosor de cada una de las 36 muestras incluidas en el estudio. Para la desparafinación se utilizó 1 mL de xilol, se agitó en vórtex y se incubó a 56°C durante 5 minutos. Se centrifugó 1 minuto por 10,000 rpm, y se decantó sin alterar el pellet. Seguido de esto, se agregó 1 mL de etanol, se agitó en vórtex y se incubó a 15°C por 5 minutos. Se centrifugó 1 minuto a 10,000 rpm. Posteriormente, se adicionó 240 μL de Buffer PKD y se centrifugó 1 minuto a 10,000 rpm. Se agregaron 10 μL de proteinasa K y se incubó a 56°C por 15 minutos, luego a 80°C por 15 minutos. Se colocaron las muestras en hielo por 3 minutos y fueron centrifugadas durante 15 minutos a 13,500 rpm. Se tomó el sobrenadante, se colocó en otro microtubo y se agregaron 25 μL de DNase Booster Buffer, 10 μL de solución de DNasa I y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. Se adicionaron 500 μL de buffer RBC y 1750 μL de etanol al 100%, se mezcló con ayuda de la micropipeta y se transfirió el volumen a las columnas miRNeasy MinElute, estas se centrifugaron por 30 segundos a 10,000 rpm. Se descartó la elución y se agregaron 500 μL de Buffer RPE, se centrifugó por 30 segundos a 10,000 rpm. Se descartó nuevamente la elución y se agregaron 500 μL de Buffer RPE, se centrifugó durante 2 minutos a 10,000 rpm. Seguido de esto, se colocó la columna en un nuevo microtubo de colecta y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos. Por último, se adicionaron 20 μL de agua libre de RNasa y se centrifugó por 1 minuto para eluir el RNA total.

Posteriormente, se cuantificaron las muestras de RNA con espectrofotometría considerando la relación de absorbancia A260nm/A230nm y A260nm/A280nm con ayuda del NanoDrop 2000UV-Vis Spectrophotometer ThermoScientific®.

7.5.5 EXPRESIÓN RELATIVA DEL CLÚSTER hsa-miR-371-373 Y DEL hsa-miR-367

La transcripción inversa del clúster hsa-miR-371-373 y del hsa-miR-367 se realizó acorde a lo especificado en el kit de transcripción inversa TaqMan® MicroRNA, Lituania (Applied Biosystems) para obtener cDNA. La reacción contenía 0.15 µL de dNTP 100 mM, 0.5 µL de 50 U/µL de transcriptasa inversa MultiScribe™, 2 µL de tampón de transcripción inversa 10X, 0.19 µL de 20 U/µL de inhibidor de RNasa, 13.16 µL de agua libre de RNasa, 3 µL de cebadores específicos para cada uno de los miRNAs (Tabla 1) y 1 µL de muestra de extracción de RNA total, para un volumen total de 20 µL por reacción. Se utilizaron alícuotas de 100 ng para RT-PCR y se sometieron a las siguientes condiciones de reacción: 16 °C durante 30 minutos, 42°C durante 30 minutos y 85 °C durante 5 minutos en un termociclador Applied Biosystem StepOne™, California, EE. UU.

Posteriormente, para cada ensayo, se usaron 5 µL de Taqman Universal PCR Master Mix, 0,5 µL de la sonda específica de cebador, 3.5 µL de agua libre de nucleasas y 1 µL de cDNA para un volumen total de 10 µL. Se realizaron reacciones por triplicado bajo las siguientes condiciones: 50 °C durante 2 minutos, 95 °C durante 10 minutos, 40 ciclos a 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minutos. La expresión relativa de los miRNAs se determinó mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizando a RNU44 y RNU6B como controles endógenos para la normalización de los datos de expresión relativa, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencia de los miRNAs y los controles endógenos utilizados.

| miRNA | ID | Secuencia de 5' a 3' |
|-----------------|--------|--|
| hsa-miR-371a-3p | 002124 | AAGUGCCGCCAUCUUUUGAGUGU |
| hsa-miR-372-3p | 000560 | AAAGUGCUGCGACAUUUGAGCGU |
| hsa-miR-373-3p | 000561 | GAAGUGCUUCGAUUUUGGGGUGU |
| hsa-miR-367-3p | 000555 | AAUUGCACUUUAGCAAUGGUGA |
| RNU6B | 001093 | CGCAAGGATGACACGCAAATTCGTGAAGCGTTCCATAT TTTT |
| RNU44 | 001094 | CCTGGATGATGATAGCAAATGCTGACTGAACATGAAGG TCTTAATTAGCTCTAACTGACT |

7.5.6. SELECCIÓN DE TRANSCRITOS CANDIDATOS

Inicialmente, se realizó la búsqueda en la bibliografía de aquellos transcritos subexpresados en TGCT. Una vez realizado esto, se verificó en el miRDB y TargetScanHuman que dichos transcritos ya hubieran sido descritos como dianas validadas de alguno de los miRNA analizados en este estudio, ya sea para TGCT o alguna otra condición, o que la región 3' no traducida (3'UTR) fuera reconocida por la región semilla por al menos uno de los miRNA analizados. Seguido de esto, se confirmó en el servidor web GEPIA, así como, en el portal de UALCAN los patrones de expresión de los transcritos en el TGCT y en diferentes condiciones clínico-patológicas de esta neoplasia.

7.5.7 EXPRESIÓN RELATIVA DE LOS TRANSCRITOS *LATS2*, *IGF1R* Y *PTEN*

La transcripción inversa de los genes *LATS2*, *IGF1R* y *PTEN* se realizó mediante el kit de transcripción inversa TaqMan® N8080234 (Applied Biosystems). La reacción contenía 4 µL de dNTP 2.5 mM, 1.4 µL de MgCl₂, 1 µL de MultiScribe™ 50 U/µL de transcriptasa inversa, 2 µL de tampón de transcripción inversa 10X, 1 µL de 20 U/µL de inhibidor de RNasa, 8.6 µL de agua libre de RNasa, 1 µL de cebadores específicos para cada uno de los transcritos evaluados y 100 ng de muestra de extracción de RNA total, para un volumen total de 20 µL por reacción. Para las reacciones de RT-PCR, se

tomaron en cuenta las siguientes condiciones de reacción: 16 °C durante 30 minutos, 42 °C durante 30 minutos y 85 °C durante 5 minutos en un termociclador Applied Biosystem StepOne™.

Posteriormente, para cada ensayo, se utilizaron 5 µL de Taqman Universal PCR Master Mix, 0.5 µL de la sonda específica de cebador, 3.5 µL de agua libre de nucleasas y 1 µL de cDNA para un volumen total de 10 µL en cada ensayo. Se realizaron reacciones por triplicado bajo las siguientes condiciones: 50 °C durante 2 minutos, 95 °C durante 10 minutos, 40 ciclos a 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto. La expresión relativa de los transcritos se determinó mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizando a *GAPDH* como control endógeno para la normalización de los datos de expresión relativa, como se observa en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencia de los transcritos evaluados.

| Gen | ID | Tamaño del amplicon |
|--------------|----------------|---------------------|
| <i>PTEN</i> | Hs008229813_s1 | 154 |
| <i>LATS2</i> | Hs1059009_m1 | 68 |
| <i>IGF1R</i> | Hs01075031_s1 | 98 |
| <i>GAPDH</i> | Hs04420566_g1 | 120 |

7.5.8 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Con el fin de identificar otros posibles transcritos candidatos regulados en común por el clúster hsa-miR-371-373 y por el hsa-miR-367 en TGCT, se obtuvo un conjunto de datos de expresión génica que corresponden al TGCT y de tejido testicular normal de la base de datos GEO (GSE65026) y (GSE25518) respectivamente, de la plataforma Array Express, Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0. Posteriormente, estos datos fueron procesados por el software Transcriptome Analysis Console (TAC), versión 4.0 de Applied Biosystems™, seleccionando a los transcritos diferencialmente expresados (DET) con una tasa de cambio <-2 y >2 . A partir de este perfil, se seleccionaron a los transcritos regulados a la baja. Y de este, se realizó un análisis ontológico a partir del listado de genes obtenidos mediante GO Ontology y Kyoto Encyclopedia of Genes and

Genomes (KEGG) con la finalidad de identificar los principales procesos biológicos y vías moleculares asociadas a estos transcritos. A su vez, se identificó los posibles transcritos blancos en común de los miRNAs de estudio y de manera dirigida se confirmó en el servidor web GEPIA, así como, en el portal de UALCAN los patrones de expresión de los transcritos en el TGCT y en diferentes condiciones clínico-patológicas de esta neoplasia.

7.5.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La distribución normal de los datos de expresión de los miRNAs y de los transcritos entre los grupos se verificó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. A continuación, se realizó una comparación de los niveles de expresión mediante una prueba de comparación de medianas no paramétrica en IBM SPSS Statistics para Windows, versión 21.0. (IBM Corp., Armonk, NY). Mientras que, para expresar los datos en gráficos de caja y bigotes se utilizó GraphPad Prism. En todo momento se consideraron resultados significativos valores de $p \leq 0.05$.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOLÓGICAS DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO

En cuanto a las características clínicas, todos los individuos del grupo control presentaron los testículos a nivel escrotal. Para el grupo de pacientes con CO, todos presentaron CO no sindromática, 5/12 presentaron CO bilateral y 7/12 CO unilateral. Finalmente, para el grupo TGCT, todos presentaron antecedentes pediátricos de CO no sindromática, 3/12 se clasificaron como sTGCT y 9/12 como nsTGCT. Además, 7/12 presentaron metástasis, como se observa en la Tabla 3.

Tabla 3. Características clínicas e histológicas

| A) Grupo Control | | |
|------------------|---------|-------------------------|
| Caso | Edad | Histología |
| Control 1 | 17 años | Espermatogénesis normal |
| Control 2 | 8 años | Normal para la edad |
| Control 3 | 39 años | Espermatogénesis normal |

| | | |
|------------|---------|-------------------------|
| Control 4 | 17 años | Espermatogénesis normal |
| Control 5 | 17 años | Hipo espermatogénesis |
| Control 6 | 18 años | Espermatogénesis normal |
| Control 7 | 18 años | Espermatogénesis normal |
| Control 8 | 18 años | Espermatogénesis normal |
| Control 9 | 22 años | Espermatogénesis normal |
| Control 10 | 4 años | Normal para la edad |
| Control 11 | 1 año | Normal para la edad |
| Control 12 | 14 años | Espermatogénesis normal |

B) Grupo CO

| Caso | Edad | Historia personal de CO | Lateralidad | Histología |
|-------|---------|-------------------------|-------------|--------------------------|
| CO 1 | 1 año | No sindromático | Bilateral | Normal para la edad |
| CO 2 | 2 años | No sindromático | Derecha | Atrofia tubular |
| CO 3 | 1 años | No sindromático | Izquierda | Normal para la edad |
| CO 4 | 12 años | No sindromático | Bilateral | Arresto de la maduración |
| CO 5 | 1 año | No sindromático | Bilateral | Atrofia tubular |
| CO 6 | 15 años | No sindromático | Derecha | Atrofia tubular |
| CO 7 | 1 año | No sindromático | Izquierda | Normal para la edad |
| CO 8 | 4 años | No sindromático | Izquierda | Normal para la edad |
| CO 9 | 10 años | No sindromático | Bilateral | Atrofia tubular |
| CO 10 | 5 años | No sindromático | Izquierda | Atrofia tubular |
| CO 11 | 1 año | No sindromático | Izquierda | Atrofia tubular |
| CO 12 | 8 años | No sindromático | Bilateral | Atrofia tubular |

C) Grupo TGCT

| Caso | Edad | Diagnóstico | Histología | Lateralidad (TGCT) | Estadio clínico | Metástasis | Historia personal de CO | Lateralidad (CO) |
|---------|---------|-------------|------------|--------------------|-----------------|----------------|-------------------------|------------------|
| TGCT 1 | 49 años | nsTGCT | T | Derecho | II | No | No sindromático | Bilateral |
| TGCT 2 | 27 años | sTGCT | S | Derecho | I | No | No sindromático | Bilateral |
| TGCT 3 | 17 años | nsTGCT | T | Izquierdo | II | Pelvis | No sindromático | Bilateral |
| TGCT 4 | 19 años | nsTGCT | YS + CH | Izquierdo | II | Retroperitoneo | No sindromático | Izquierda |
| TGCT 5 | 16 años | nsTGCT | T | Derecho | I | No | No sindromático | Bilateral |
| TGCT 6 | 22 años | sTGCT | S | Izquierdo | II | Retroperitoneo | No sindromático | Izquierda |
| TGCT 7 | 22 años | nsTGCT | S + T | Bilateral | II | No | No sindromático | Bilateral |
| TGCT 8 | 16 años | nsTGCT | S + T + CH | Derecho | II | Retroperitoneo | No sindromático | Bilateral |
| TGCT 9 | 23 años | nsTGCT | T | Derecho | IV | Pulmón | No sindromático | Derecha |
| TGCT 10 | 27 años | nsTGCT | T | Izquierdo | II | Retroperitoneo | No sindromático | Izquierda |
| TGCT 11 | 18 años | sTGCT | S | Derecho | I | No | No sindromático | Derecha |
| TGCT 12 | 24 años | nsTGCT | S + T | Derecho | I | No | No sindromático | Derecha |

nsTGCT, tumor testicular de células germinales no seminomatoso, sTGCT, tumor testicular seminomatoso de células germinales, S, seminoma, T, teratoma, YS, tumor del saco vitelino, CH, coriocarcinoma.

En cuanto a la descripción histológica, 11/12 individuos del grupo control presentaron un epitelio seminífero acorde a la edad, mientras que el individuo restante presentó hipoplasia de la espermatogénesis; es decir, un epitelio seminífero con presencia de todas las etapas de células germinales, incluidos los espermatozoides, pero con una clara disminución en el número de células germinales. Para el grupo de pacientes con CO, 7/12 pacientes presentaron atrofia tubular; es decir, tubos seminíferos más pequeños con pocas células adentro, 4/12 presentaron una histología normal de acuerdo a la edad y 1/12 presentó arresto de la maduración; caracterizada por una espermatogénesis incompleta, no más allá de la etapa de espermatoцитos, como se observa en la Tabla 3. Estas características fueron similares a lo reportado por Koni et al., (2014), en donde observaron que algunos pacientes con CO mostraban atrofia de los túbulos seminíferos, arresto de la maduración de las células germinales e incluso pacientes que únicamente presentaron sólo células de Sertoli.

A su vez, para el grupo TGCT, todos los pacientes mostraron alteraciones histológicas típicas de la neoplasia; caracterizadas por la presencia de células grandes, multinucleadas, con nucléolos prominentes, citoplasma claro, poco diferenciadas, lesiones en el parénquima adyacente y en el caso del teratoma, células inmaduras con componentes de diferentes tipos de tejido, como se observa en la Tabla 3. Similar a lo identificado por Howitt y Berney en 2015, en donde; además, observaron una histología celular con citoplasma anfófilo, bordes celulares indistintos, necrosis, núcleos atípicos y crecimiento anómalo.

Finalmente, debemos remarcar que; hasta este punto, el análisis histológico resultó insuficiente para encontrar diferencias importantes entre los individuos del grupo CO y la relación de algunos de estos con el TGCT, debido a que este se realizó a partir de cortes finos en parafina.

8.2 ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO

En cuanto al análisis inmunohistoquímico para las proteínas POU5F1, PLAP y KIT, no se observó inmuno-positividad en el grupo Control, mientras que para el grupo TGCT

se observó inmuno-positividad acorde a cada uno de los tipos histológicos tumorales presentes en cada paciente. Para el grupo CO, únicamente 2/12 pacientes presentaron células inmuno-positivas para las tres proteínas, como se observa en la Tabla 4.

Tabla 4. Inmuno-positividad a las proteínas POU5F1, PLAP y KIT

| Muestra | Control | | | CO | | | TGCT | | |
|---------|---------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|
| | POU5F1 | PLAP | KIT | POU5F1 | PLAP | KIT | POU5F1 | PLAP | KIT |
| 1 | Verde | Verde | Verde | Verde | Verde | Verde | Rojo | Verde | Verde |
| 2 | Verde | Verde | Verde | Verde | Verde | Verde | Rojo | Rojo | Rojo |
| 3 | Verde | Verde | Verde | Verde | Verde | Verde | Verde | Verde | Verde |
| 4 | Verde | Verde | Verde | Verde | Verde | Verde | Verde | Rojo | Rojo |
| 5 | Verde | Verde | Verde | Rojo | Rojo | Rojo | Verde | Verde | Verde |
| 6 | Verde | Verde | Verde | Rojo | Rojo | Rojo | Rojo | Rojo | Rojo |
| 7 | Verde | Verde | Verde | Verde | Verde | Verde | Rojo | Rojo | Rojo |
| 8 | Verde | Verde | Verde | Verde | Verde | Verde | Rojo | Rojo | Rojo |
| 9 | Verde | Verde | Verde | Verde | Verde | Verde | Verde | Verde | Verde |
| 10 | Verde | Verde | Verde | Verde | Verde | Verde | Rojo | Verde | Verde |
| 11 | Verde | Verde | Verde | Verde | Verde | Verde | Rojo | Rojo | Rojo |
| 12 | Verde | Verde | Verde | Verde | Verde | Verde | Rojo | Rojo | Rojo |

En color verde se muestra aquellos pacientes sin inmuno-positividad, mientras que, en color rojo se muestra aquellos pacientes con inmuno-positividad a POU5F1, PLAP y KIT.

Al momento de integrar los resultados histológicos con lo observado a nivel inmunohistoquímico, se evidenció entre el grupo CO que, pese a observarse una morfología relativamente similar entre todos los pacientes, como se muestra en la Figura 11 (A; B y C), 2/12 pacientes con CO presentaron abundancia de proteínas características del TGCT, como se muestra en la Figura 11 (D-O).

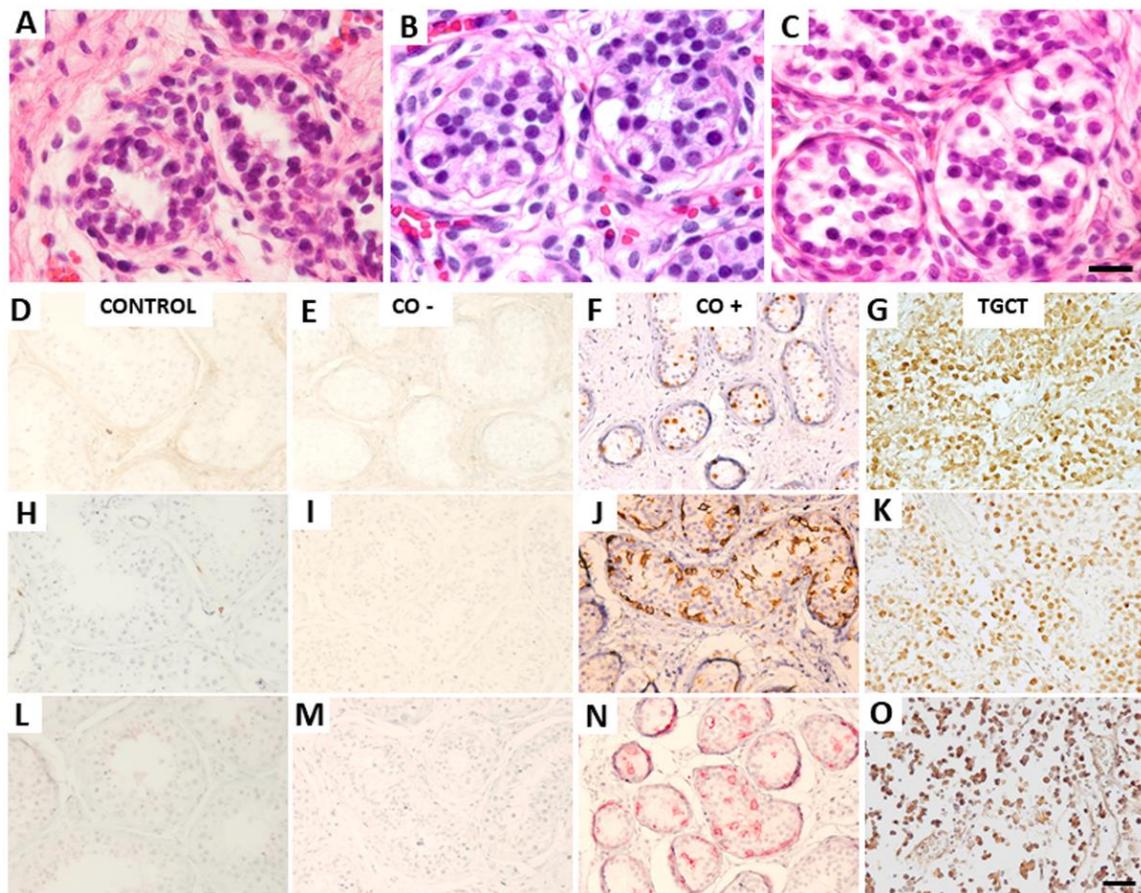


Figura 11. Análisis histológico e inmunohistoquímico. La parte superior del panel de imágenes, muestra la comparación histológica representativa entre 3 pacientes del grupo CO, mediante tinción de H/E. A) Paciente número 9 de 10 años de edad que presentó atrofia tubular. B) Paciente número 4 de 12 años de edad que presentó arresto en la maduración. C) Paciente 6 de 15 años de edad que presentó atrofia tubular. La parte inferior del panel de imágenes muestra la comparación inmunohistoquímica representativa para POU5F1 (D-G), KIT (H-K) y PLAP (L-O). De izquierda a derecha se muestra al Control 1 de 17 años de edad sin inmuno-positividad para los 3 anticuerpos, seguido del Paciente CO 4 (mostrado en la parte superior del panel) de 12 años de edad, el cual no es inmuno-positivo a los anticuerpos, posteriormente, se muestra al Paciente CO 6 (mostrado en la parte superior del panel) de 15 años de edad, el cual es inmuno-positivo para los tres anticuerpos, similar a lo observado en el Paciente TGCT 7 de 22 años de edad.
 CO; criptorquidia, CO-; criptorquidia no inmuno-positiva para POU5F1, PLAP y KIT, CO+; criptorquidia inmuno-positiva para POU5F1, PLAP y KIT, TGCT; tumor testicular de células germinales. Barra de calibración a 50 μ m.

Para el análisis inmunohistoquímico se evaluó POU5F1 (Factor de transcripción 1 de clase 5 del dominio POU), KIT (Receptor Kit del factor de crecimiento de mastocitos/células troncales) y PLAP (Fosfatasa alcalina placentaria), marcadores de riesgo para el desarrollo de neoplasia testicular. POU5F1 es un regulador transcripcional que se expresa en células pluripotentes indiferenciadas por lo que la

inhibición de la expresión de este gen induce la diferenciación del gonocito a espermatogonia (Honecker et al., 2004; Viguera et al., 2015). Esta proteína se ha detectado en GCNIS, seminoma, carcinoma embrionario con excepción del tipo no seminoma con células diferenciadas (De Jong et al., 2005). La fosfatasa alcalina (PLAP) es una proteína expresada en células germinales primordiales, gonocitos y en células seminomatosas y es el marcador inmunohistoquímico más utilizado en la clínica para detectar neoplasias testiculares (Hoei et al., 2005; Thorup et al., 2013). Mientras que la proteína KIT participa en la supervivencia, proliferación y migración de las células germinales primordiales y su expresión disminuye cuando la célula se diferencia a espermatogonia, también se encuentra relacionada con la patogénesis del TGCT (Rajpert et al., 2006).

Una mayor abundancia de estas proteínas se ha encontrado en pacientes con TGCT y en algunos pacientes con CO, por lo que se cree que los testículos no descendidos tienen un mayor riesgo de desarrollar el TGCT a pesar de haberse corregido el testículo quirúrgicamente (Viguera et al., 2021). Facer et al., (2022) reportaron que pacientes con CO no corregida a la edad de 12 años pueden presentar túbulos seminíferos con diámetros disminuidos, un epitelio poco desarrollado y un número bajo de espermatogonias y a la edad de 16 años pueden presentar daño en el epitelio germinal, en los túbulos seminíferos y en el crecimiento de células germinales. Por lo que, el riesgo del TGCT en los pacientes con CO aumenta de acuerdo a la edad en que se realiza la orquidopexia, siendo la pubertad la de mayor riesgo (Tang et al., 2018). A pesar de esto la relación molecular a fondo entre la CO y el TGCT aún se desconoce.

En nuestros resultados inmunohistoquímicos se observó que el grupo control no presentó células inmuno-positivas y por el contrario casi todos los pacientes del grupo de TGCT presentaron células inmuno-positivas con excepción de tres pacientes posiblemente debido a que tenían TGCT del tipo teratoma maduro con células diferenciadas, estos resultados era lo esperado en ambos grupos y fue similar a lo que ha sido reportado por Honecker et al., (2004); Cheng et al., (2007) y Steiner et al.,

(2010). En el caso del grupo de CO, solo el 16,7% (2/12) presentaron células inmuno-positivas, concretamente para el paciente CO 5 (paciente de 1 año y 8 meses de edad) y para CO 6 (paciente de 15 años de edad).

Debido a estos resultados, se realizó la distinción entre los pacientes con CO que presentaron positividad para las proteínas evaluadas (CO+) de los que no presentaron positividad (CO-). Se ha reportado que algunos pacientes con CO además de expresar marcadores como POU5F1, PLAP y KIT, también expresan otros marcadores asociados al desarrollo del GCNIS como SALL4, AP2γ, estos han sido analizadas por varios autores como Clasen-Linde et al., (2015), Viguera et al., (2015) y Kvist et al., (2018), encontrando un aumento en la expresión de estas en algunos pacientes con CO.

Diversos autores argumentan que el aumento en la expresión de estas proteínas no garantiza el desarrollo del TGCT. Por lo que decidimos analizar miRNAs que han sido evaluados como biomarcadores del TGCT como el clúster hsa-miR-371-373 y miR-367. Se ha reportado que el grupo hsa-miR-371-373 participa en la regulación de la proliferación, diferenciación y mantenimiento de células troncales a través de la vía Wnt y se sugiere que esta vía podría estar implicada en la etiología subyacente de la CO (Harisis et al., 2013; Vilela-Salgueiro, et al., 2018; Elamo et al, 2022).

8.3 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL CLÚSTER hsa-miR-371-373 Y DEL hsa-miR-367

Independientemente del control endógeno utilizado en la determinación de la expresión relativa (RNU44 y RNU6B), se presentó un comportamiento consistente entre ambos casos, como se muestra en la Figura 12.

En cuanto a lo observado en el grupo de TGCT, el clúster hsa-miR-371-373 y el hsa-miR-367 se sobre expresaron significativamente en comparación con los grupos Control y CO, como se muestra en la Figura 12A, B, C y D. Mientras que el grupo CO, presentó niveles de expresión similares al grupo Control para hsa-miR-371 y hsa-miR-373, como se muestra en la Figura 12A y C. En el caso de hsa-miR-372, el grupo CO

presentó niveles de expresión significativamente más bajos en comparación con los del grupo control, como se muestra en la Figura 12B. Finalmente, para hsa-miR-367 no hubo diferencias significativas en los niveles de expresión entre los grupos CO y Control. Aunque se observó una tendencia a valores ligeramente superiores en el grupo CO en comparación con el grupo control siendo ligeramente similar a lo observado en el grupo TGCT, como se muestra en la Figura 12D. Sin embargo, cuando se dividió el grupo CO en no inmuno-positivos (CO-) e inmuno-positivos (CO+) para POU5F1, PLAP y KIT, este último subgrupo mostró niveles de expresión ligeramente superiores para el clúster hsa-miR-371-373 y del miR-367, similar a lo observado en el grupo TGCT como se muestra en la Figura 13A, B, C y D.

Adicionalmente, se comparó la expresión relativa de estos microRNAs en función del diagnóstico del TGCT y la lateralidad de la CO, sin encontrar diferencias significativas, como se muestra en la Figura 14.

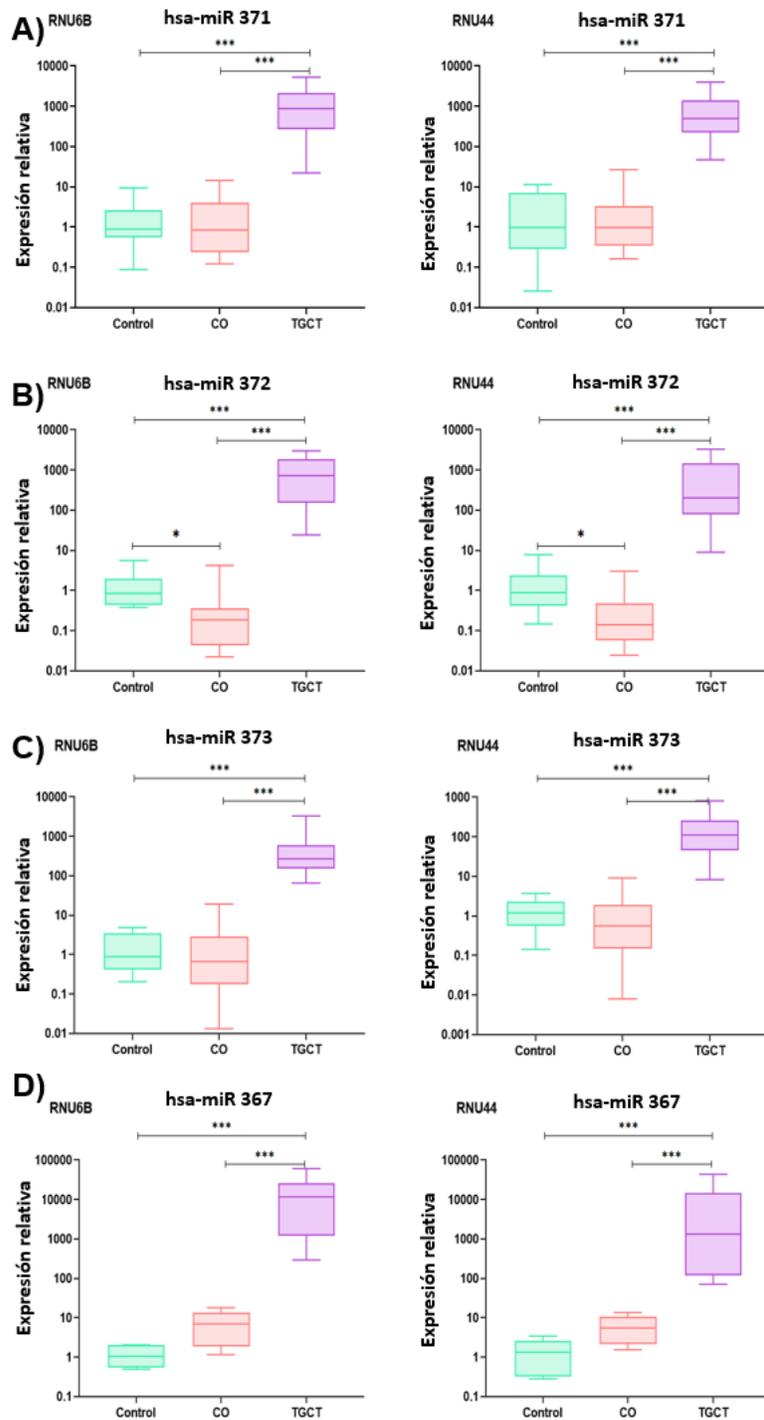


Figura 12. Expresión relativa del clúster hsa-miR-371-373 y del hsa-miR-367. A) Expresión relativa del hsa-miR-371. Se observaron valores de p similares entre los grupos al normalizar los datos con RNU6B y RNU44 (CO vs Control; p=ns, CO vs TGCT; p<0.000 y Control vs TGCT; p<0.000). B) Expresión relativa del hsa-miR-372. Para el caso de la normalización con RNU6B se observaron las siguientes diferencias: CO vs Control; p=0.05, CO vs TGCT; p<0.000 y Control vs. TGCT; p<0.000. Mientras que para la normalización con RNU44 se observaron las siguientes diferencias: CO vs control; p=0.01, CO

vs TGCT; $p < 0.000$ y Control vs TGCT; $p < 0.000$. C) Expresión relativa del hsa-miR-373. Se observaron valores de p similares entre los grupos al normalizar los datos con RNU6B y RNU44 (CO vs Control; $p = 1.0$, CO vs TGCT; $p < 0.000$ y Control vs TGCT, $p < 0.000$). D) Expresión relativa del hsa-miR-367. Para el caso de la normalización con RNU6B se observaron las siguientes diferencias: CO vs Control; $p = 0.08$, CO vs TGCT; $p < 0.000$ y Control vs TGCT; $p = 0.003$. Mientras que para la normalización con RNU44 se observaron las siguientes diferencias: CO vs Control; $p = 0.13$, CO vs TGCT; $p < 0.000$ y Control vs TGCT; $p < 0.000$.
 CO; criptorquidia, TGCT; tumor testicular de células germinales, ns; no significativo, *, $p < 0.05$, ***, $p < 0.001$.

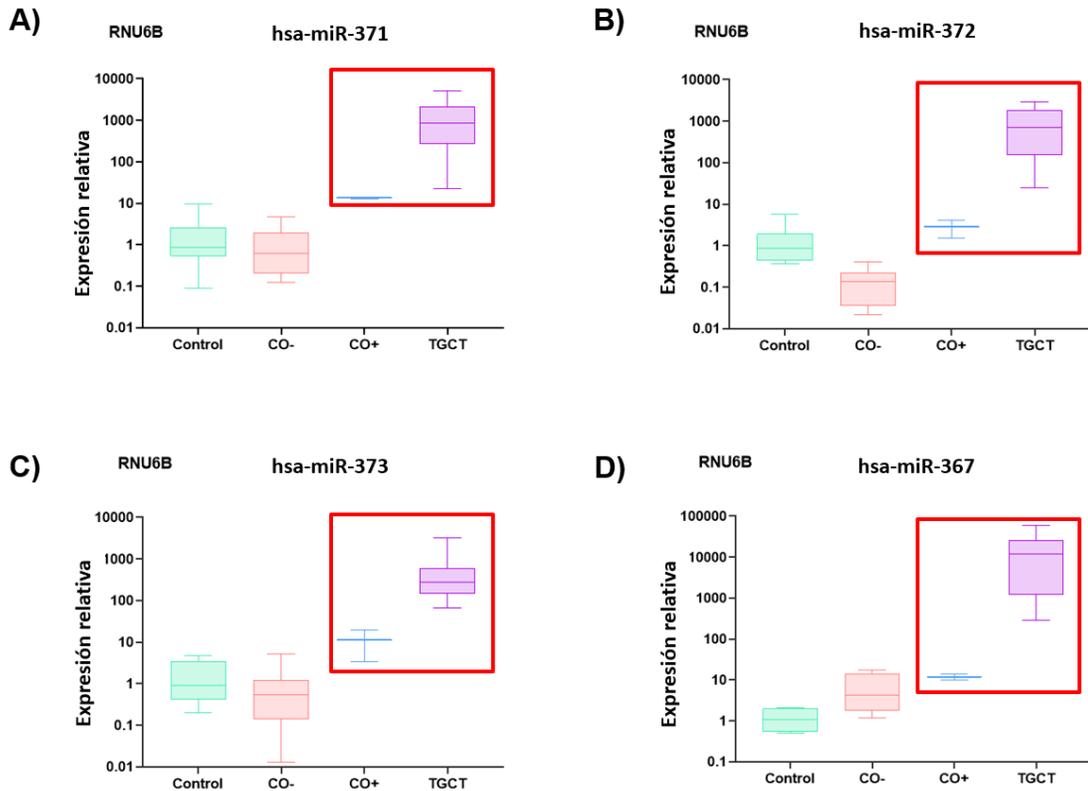


Figure 13. Comparación de la expresión relativa del clúster hsa-miR-371-373 y del hsa-miR-367 entre pacientes con CO+ y CO-. A, B, C y D) muestran como los pacientes con CO+ presentan niveles de expresión relativa aumentados, similar a lo observado en los pacientes con TGCT (indicados dentro del recuadro color rojo). Mientras que, los pacientes con CO- presentan niveles de expresión relativa similares al grupo Control o incluso, inferiores.
 CO-; criptorquidia no inmuno-positiva para POU5F1, PLAP y KIT, CO+; criptorquidia inmuno-positiva para POU5F1, PLAP y KIT, TGCT; tumor testicular de células germinales.

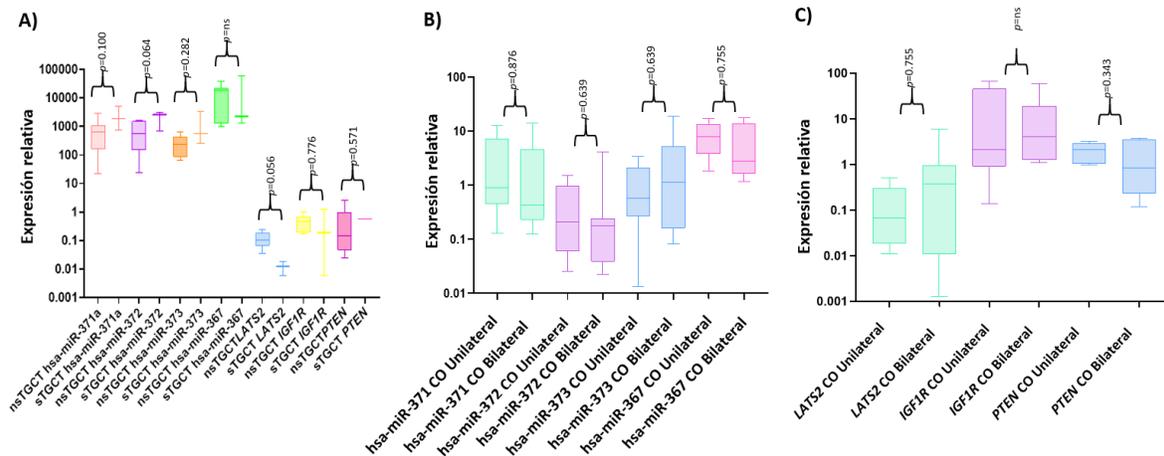


Figura 14. Gráficos de expresión relativa en función de algunas características clínicas. (A) Comparación de la expresión relativa del clúster hsa-miR-371-373, hsa-miR-367 y de los transcritos de los genes *LATS2*, *PTEN* e *IGF1R* entre nsTGCT y sTGCT. (B) Comparación de la expresión del clúster hsa-miR-371-373 y del hsa-miR-367 entre CO unilateral y CO bilateral. (C) Comparación de la expresión de los transcritos de los genes *LATS2*, *PTEN* e *IGF1R* entre CO unilateral y CO bilateral. CO; criptorquidia, nsTGCT; tumor testicular de células germinales no seminomatoso, sTGCT; tumor testicular de células germinales seminomatoso, ns; no significativo.

Nuestros resultados mostraron la sobreexpresión del clúster hsa-miR-371-373 y del hsa-miR-367 en muestras de TGCT y niveles bajos de expresión de estos en los individuos control (Figura 12), de manera similar a lo reportado por otros autores, en donde incluso demuestran la sobreexpresión de estos tanto en muestras de tejido testicular y suero sanguíneo de pacientes con TGCT, mientras que en individuos control o en tejido adyacente sano, se reportan niveles bajos (Palmer et al., 2010; Murray et al., 2011; Bing, Master et al., 2012; Dieckman et al., 2012). Cabe resaltar que, en nuestro caso todos los pacientes con TGCT presentaron antecedentes de CO en edad pediátrica, sin embargo, este antecedente no aumentó o disminuyó los niveles de expresión relativa de los miRNAs respecto a los valores reportados por otros autores.

En el caso de los pacientes con CO, estos presentaron niveles de expresión del hsa-miR-371 y el hsa-miR-373 similar al grupo control mostrando diferencias significativas únicamente con el grupo TGCT (Figura 12A y C). El hsa-miR-371 es considerado el miRNA más sensible y específico para la detección del TGCT (Dieckmann et al., 2016; van Agthoven & Looijenga, 2016) y con una mejor precisión diagnóstica en recaídas

en comparación del resto de los miRNAs de estudio (Looijenga et al., 2007; Dieckmann et al., 2016; Myklebust et al., 2019; Terbuch et al., 2018). El hsa-miR-371 además de sobre expresarse en el TGCT, también se ha encontrado sobreexpresado en otros tipos de cáncer como el hepatocarcinoma celular y cáncer gástrico (Guo et al., 2019; Wang et al., 2019). Además, ha sido estudiado como biomarcador de infertilidad y se ha descrito que se subexpresa en pacientes con azoospermia no obstructiva (Radke et al., 2019).

Respecto a hsa-miR-373, se ha reportado su sobreexpresión durante el desarrollo embrionario y en células indiferenciadas (Kent & Mendell, 2006; Das et al., 2019). Se ha encontrado sobreexpresado en otros tipos de cáncer como hepatocarcinoma, mama, gástrico y tiroides, por el contrario, se encuentra subexpresado en cáncer de colon, páncreas, pulmón, próstata y ovario (Wei et al., 2015).

En el caso de hsa-miR-372, los pacientes con CO presentaron una expresión significativamente menor que la mostrada en el grupo TGCT y con el grupo control (Figura 12B). Los niveles de expresión relativa se comportaron de manera contraria a lo esperado para pacientes con CO, condición de riesgo para el desarrollo de TGCT. Como se mencionó anteriormente, hsa-miR-373 comparte funciones con hsa-miR-372 a nivel testicular, expresándose en células troncales embrionarias y regulando la capacidad pluripotente en las células troncales (Bing et al., 2012). Por el contrario, un estudio realizado por Wu et al., (2015), en pacientes con hepatocarcinoma, mostró subexpresión de hsa-miR-372 respecto a los individuos control, asociándose con el desarrollo de metástasis y mal pronóstico, estos resultados llevaron a la sugerencia de que este fenómeno podría deberse a una hipermetilación aberrante en el promotor del hsa-miR-372, situación que no podemos descartar en nuestros pacientes con CO. También se ha encontrado subexpresado al igual que hsa-miR-371 en el plasma seminal de individuos fértiles (Pelloni et al., 2017).

Finalmente, el hsa-miR-367 estuvo presente en pacientes con CO con expresión intermedia entre los grupos TGCT y control (Figura 12D). Se observó una sobre

expresión significativa en el TGCT y en pacientes con CO se mostró un comportamiento ligeramente elevado respecto al encontrado en el grupo control; aunque esta diferencia no fue significativa. El hsa-miR-367 forma parte de un clúster que incluye al hsa-miR-302, y participa en procesos biológicos como la proliferación, diferenciación y mantenimiento de la pluripotencia de las células troncales embrionarias (Guo et al., 2019), en la regulación del ciclo celular, el proceso de invasión tumoral, migración celular y en la supresión de la respuesta inflamatoria en células cancerosas (Gao et al., 2015). Muchos autores han informado altos niveles de expresión del hsa-miR-367 en TGCT (Das et al., 2019, van Agthoven & Looijenga, 2016; Murray et al., 2016).

Al analizar la expresión del clúster hsa-miR-371-373 y del hsa-miR-367 en los pacientes con CO en función a la positividad de los anticuerpos POU5F, PLAP y KIT, se observó que los pacientes CO+ presentaron niveles de expresión más elevados que los pacientes CO- y del grupo Control, con una tendencia similar hacia los niveles de expresión de los pacientes con TGCT (Figura 13). Lobo et al., (2019), evaluaron la expresión del hsa-miR-371 en pacientes con sTGCT, nsTGCT y en pacientes con GCNIS únicamente. Para el caso de los pacientes con sTGCT y nsTGCT estos presentaron valores de expresión similares a lo descrito por nosotros para el grupo TGCT, mientras que, los pacientes con GCNIS mostraron valores de expresión relativa intermedios entre los pacientes con TGCT y los individuos control, similar a lo que identificamos para los pacientes CO+. Debemos resaltar que, la GCNIS es una lesión precursora al TGCT y esto puede explicar el aumento modesto de la expresión del hsa-miR-371 a niveles intermedios, niveles que no se comparan con los descritos para pacientes con TGC, similar a lo que observamos en nuestro estudio para los pacientes CO+, quienes propiamente no han desarrollado la GCNIS, ni mucho menos la neoplasia testicular, remarcando la utilidad de determinar los niveles de expresión en estadios previos al TGCT.

A su vez, Tang et al., (2018) determinaron los niveles de expresión relativa del clúster hsa-miR-371-373 en pacientes con CO, identificando la subexpresión de este clúster,

similar a lo que identificamos en los pacientes con CO-. Debemos señalar que una de las limitantes de ese estudio es que únicamente se evaluaron 3 pacientes con CO y con los antecedentes reportados en la literatura, se estima que sólo una proporción discreta de los pacientes con CO desarrollen el TGCT en edad adulta (Tang et al., 2018), lo que se confirma con nuestros resultados, en donde únicamente 2/12 pacientes con CO fueron positivos para POU5F1, PLAP y KIT y, además, sobre expresaron los cuatro miRNAs.

Finalmente, se ha reportado que tanto en el TGCT como en gonocitos, el clúster hsa-miR-302/367 es regulado por factores de transcripción como NANOG, POU5F1 y SOX, los cuales participan en el mantenimiento de la pluripotencia y en la regulación del ciclo celular (Chen et al., 2015), lo que apoya nuestros resultados, en donde observamos que el aumento de la expresión de los miRNAs, está acompañado del aumento en la expresión de algunos factores de transcripción como POU5F1.

8.4 SELECCIÓN DE GENES BLANCO CANDIDATOS

De la lista de genes candidatos a ser regulados por los miRNAs de este estudio, fueron obtenidos a través de la revisión de la literatura, se seleccionó a los transcritos de los genes *LATS2*, *PTEN* e *IGF1R* debido a que presentaron una secuencia complementaria a la región semilla para al menos uno de los microRNAs evaluados en este estudio en la región 3'UTR.

Para el caso de *LATS2*, este es un blanco validado de hsa-miR-372 y hsa-miR-373 en el TGCT, mientras que *PTEN* es un blanco validado de hsa-miR-367 en melanoma cutáneo, mientras que *IGF1R* es un posible gen blanco regulado por hsa-miR-372-373 y hsa-miR-367 como se muestra en la Figura 15.

Finalmente, se confirmó que estos transcritos se expresan diferencialmente entre el TGCT y tejido sano. Así como, entre el sTGCT y el nsTGCT y entre los diversos estadios clínicos de la neoplasia testicular, como se muestra en la Figura 16.

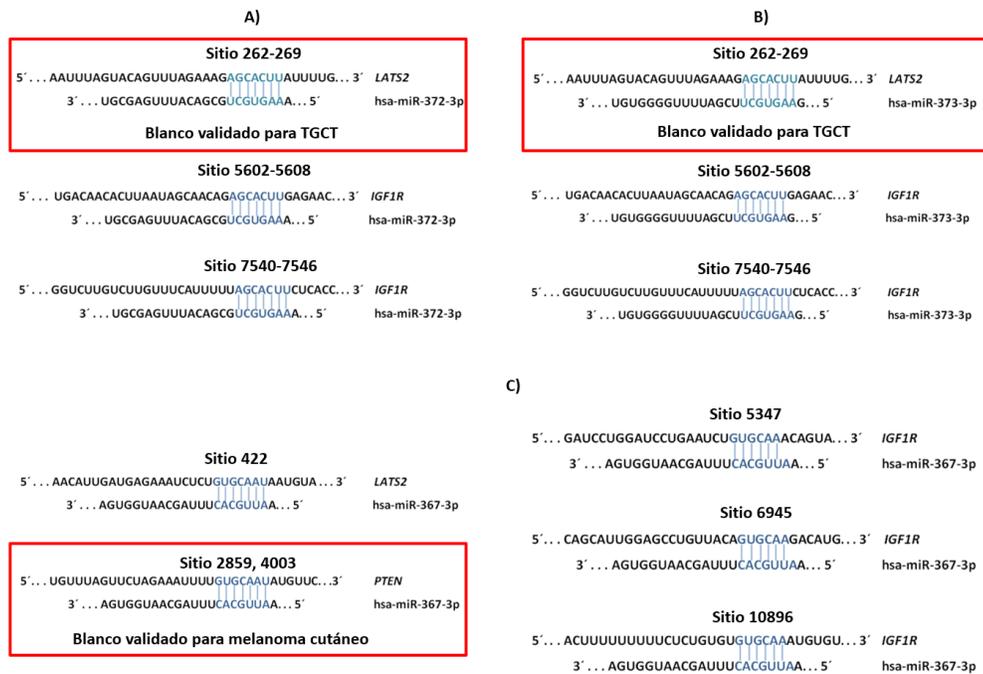


Figura 15. Sitios de unión en el 3'UTR de *LATS2*, *PTEN* e *IGF1R* para el clúster hsa-miR-371-373 y para el hsa-miR-367.

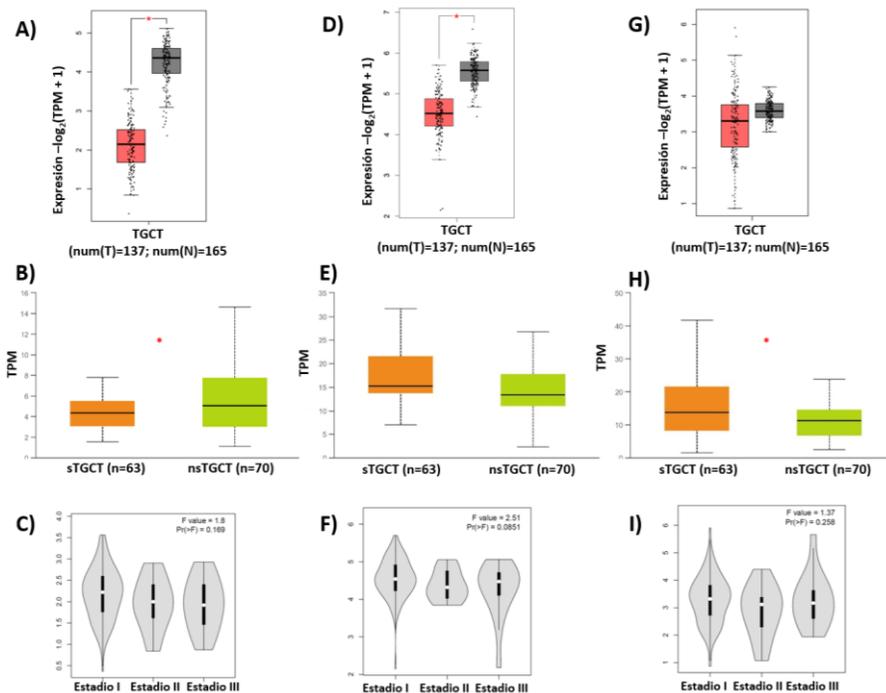


Figura 16. Expresión de los transcritos de los genes *LATS2*, *PTEN* e *IGF1R* en diferentes condiciones clínico-patológicas de TGCT. La figura muestra A) la comparación de los niveles de expresión del transcrito del gen *LATS2* entre tejido tumoral vs tejido sano; así como, B) entre la clasificación y C) los diferentes estadios clínicos de TGCT. A su vez, se muestra D) la comparación de los niveles de

expresión del transcrito del gen *PTEN* entre tejido tumoral vs tejido sano; así como, E) entre la clasificación y F) los diferentes estadios clínicos de TGCT. Finalmente, se muestra G) la comparación de los niveles de expresión del transcrito del gen *IGF1R* entre tejido tumoral vs tejido sano; así como, H) entre la clasificación y I) los diferentes estadios clínicos de TGCT.

8.5 EXPRESIÓN RELATIVA DE LOS TRANSCRITOS *LATS2*, *PTEN* e *IGF1R*

El grupo de TGCT presentó niveles bajos de expresión para los tres genes en comparación con el grupo Control, solo se observaron diferencias significativas para *LATS2* y no para *PTEN* e *IGF1R*, como se muestra en las Figuras 17A, C y E. Para el grupo CO, presentaron diferencias significativas de expresión relativa con respecto al grupo Control sólo para *LATS2*, similar a lo observado en el grupo de TGCT, como se muestra en la Figura 17A. Mientras que para *PTEN* e *IGF1R*, el grupo con CO presentó valores de expresión elevados, encontrando diferencias significativas cuando estos fueron comparados con el grupo de TGCT, como se muestra en las Figuras 17C y E. Sin embargo, cuando el grupo CO se subdividió en CO- y CO+, este último subgrupo mostró una disminución en los niveles de expresión de *LATS2* e *IGF1R*, similar a la observada en el grupo TGCT, como se muestra en las figuras 17B y F.

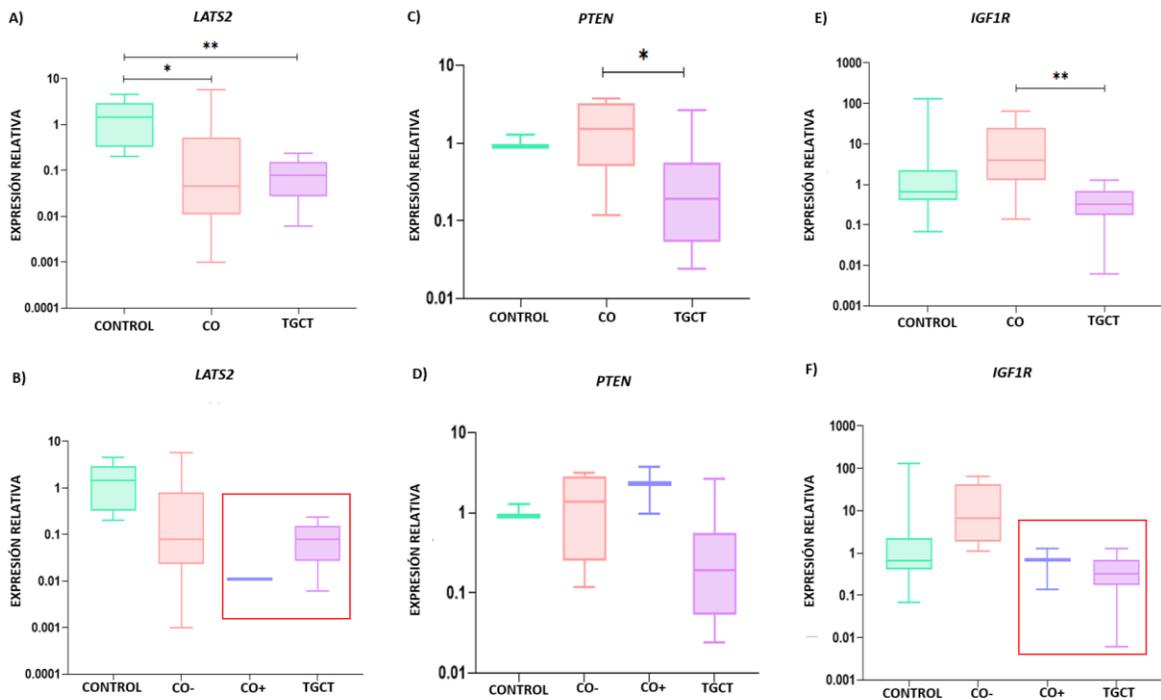


Figura 17. Expresión relativa de *LATS2*, *PTEN* e *IGF1R*. La figura muestra A) la comparación de la expresión relativa del transcrito del gen *LATS2* en donde se observan las siguientes diferencias (CO vs Control $p=0.047$, Control vs TGCT $p<0.000$ y CO vs TGCT $p=ns$). Así como, B) la comparación correspondiente entre los subgrupos CO- y CO+ en donde se muestra como los pacientes con CO+ presentan niveles de expresión relativa disminuidos, similar a lo observado en los pacientes con TGCT (indicados dentro del recuadro color rojo). C) La comparación de la expresión relativa del transcrito del gen *PTEN* en donde se observan las siguientes diferencias (CO vs Control $p=ns$, Control vs TGCT $p=0.115$ y CO vs TGCT $p=0.038$). Así como, D) la comparación correspondiente entre los subgrupos CO- y CO+. Finalmente, E) la comparación de la expresión relativa del transcrito del gen *IGF1R* en donde se observan las siguientes diferencias (CO vs Control $p=0.074$, CO vs TGCT $p<0.000$ y Control vs TGCT $p=ns$). Así como, F) la comparación su correspondiente entre los subgrupos CO- y CO+ en donde se muestra como los pacientes con CO+ presentan niveles de expresión relativa disminuidos, similar a lo observado en los pacientes con TGCT (indicados dentro del recuadro color rojo).

A partir de los valores de expresión relativa obtenidos, se obtuvo el correspondiente mapa de calor en donde se observa las similitudes encontradas entre los grupos TGCT y CO+, como se muestra en la Figura 18. Lo cual se evidencia cuando se obtiene el promedio de los niveles de expresión de cada uno de los grupos, como se muestra en la Tabla 5.

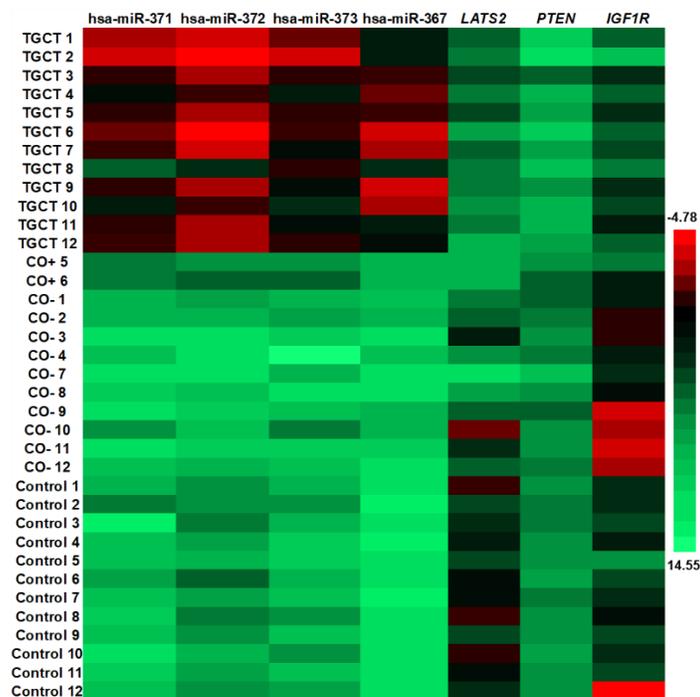


Figura 18. Comparación global de los niveles de expresión relativa entre los grupos de estudio. Se muestra un mapa de calor en el que se comparan los valores de ΔCt de cada uno de los individuos incluidos. En rojo se muestran los genes sobre expresados y en verde los genes sub-expresados. La escala se muestra en el lateral del mapa de calor.

Tabla 5. Comparación de los valores de Fold Change entre los grupos de estudio.

| GRUPO | hsa-miR-371 | hsa-miR-372 | hsa-miR-373 | hsa-miR-367 | LATS2 | PTEN | IGF1R |
|---------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------|-------|-------|
| TGCT | -9.36 | -9.13 | -8.31 | -12.58 | 4.54 | 2.89 | 2.15 |
| CO+ | -3.74 | -1.34 | -3.02 | -3.55 | 6.54 | -0.91 | 2.16 |
| CO- | 0.75 | 3.34 | 1.37 | -2.18 | 3.33 | 0.25 | -3.04 |
| CONTROL | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

Para los resultados de expresión relativa de los transcritos evaluados, se encontraron niveles de expresión bajos para *LATS2* y *PTEN* en el grupo TGCT respecto al grupo control (Figura 17A y B), similar a lo reportado por otros autores (Duale et al., 2007; Yang et al., 2016; Selfe & Shipley, 2019). Mientras que para *IGF1R* se observaron niveles de expresión relativa similares al grupo control (Figura 17E) (Neuvians et al., 2005). En relación al grupo CO, *LATS2* mostró niveles de expresión similares al grupo TGCT e inferiores al grupo control. Sin embargo, a la fecha no existen reportes de

expresión de este transcrito en pacientes con CO, ni en ningún otro padecimiento urogenital. La sobreexpresión de *LATS2* inhibe la transición celular de la fase G1 a la fase S al reducir la abundancia de proteínas involucradas en la fase G1, como la ciclina D1, CDK4 y CDK6 (Guo et al., 2019; McPherson et al., 2004). Por el contrario, la disminución de la proteína LATS2 por inhibición de hsa-miR-372 y del hsa-miR-373 en pacientes con TGCT promueve el crecimiento tumoral al inhibir a CDK2, generando una proliferación continua en presencia de activación de RAS, lo que promueve la progresión tumoral (Voorhoeve et al., 2006; Aylón, et al, 2009).

En cuanto a *PTEN* e *IGF1R*, encontramos niveles de expresión elevados en el grupo CO, superiores a los observados en los grupos TGCT y control, similar a lo descrito en el cáncer de próstata y colorrectal (Carver et al, 2011; Li et al., 2018).

PTEN es uno de los genes blanco del hsa-miR-367 y del hsa-miR-371. El transcrito del gen *PTEN* se expresa en células germinales y frecuentemente está mutado en múltiples tipos de cáncer, presentándose a niveles bajos de expresión tanto en sTGCT como en EC, y en el caso de la GCNIS se encuentra a niveles altos. Por otro lado, niveles bajos de expresión de este se asocian con la sobreexpresión de p53 y p21, en la reparación del daño al DNA, en el mantenimiento de la integridad genómica y se relaciona con la progresión tumoral (Wang et al., 2019; Wang & Luo, 2019; Shin et al., 2021). Además, *PTEN* participa en la inhibición de la transformación oncogénica regulada por Wnt/ β -catenina (Yu et al., 2017). *PTEN* también regula negativamente la vía PI3K/AKT relacionada con la supervivencia, proliferación y migración celular, promoviendo la transformación y progresión maligna de las células cancerosas. (Chetram & Hinton, 2012; Andreassen et al., 2013; Di Vizio et al., 2005). Se ha reportado que la vía de señalización PI3K-AKT-mTOR es necesaria para el mantenimiento de las células troncales espermatogoniales (Jia et al., 2021) y podría ser crucial para el desarrollo de la CO.

La expresión de *IGF1R*, se ha reportado tanto en tejido testicular sano como en sTGCT, sin presentar diferencias significativas en la expresión relativa entre ambos.

Sin embargo, se ha reportado la sobre expresión de este en el nsTGCT, donde *IGF1R* a través de la vía PI3K regula los efectos de la FSH (hormona folículo estimulante) y promueve la proliferación e invasión en tumores sTGCT (Wang et al., 2016; Cannarella et al., 2018; Neuvians et al., 2005). Asimismo, se ha reportado que *IGF1R* está sobreexpresado en cáncer de mama, participando en la transformación de las células mamarias y en el cáncer de próstata donde participa aumentando la proliferación celular y la invasión (Tamimi et al., 2011; Heidegger, 2014). Este gen también tiene un papel en el desarrollo del músculo cremáster, en el descenso testicular, en el desarrollo adrenogenital y en la maduración de los testículos, así como, en la proliferación celular, supervivencia, diferenciación de células de Sertoli y células germinales (Cannarella et al., 2018).

8.6 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Finalmente, del análisis bioinformático realizado a partir de microarreglos de expresión. Se visualizaron 12,858 transcritos diferencialmente expresados (DET) en TGCT, de los cuales 7,166 transcritos se encontraron sobre expresados y 5,692 transcritos sub-expresados, como se muestra en la Figura 19.

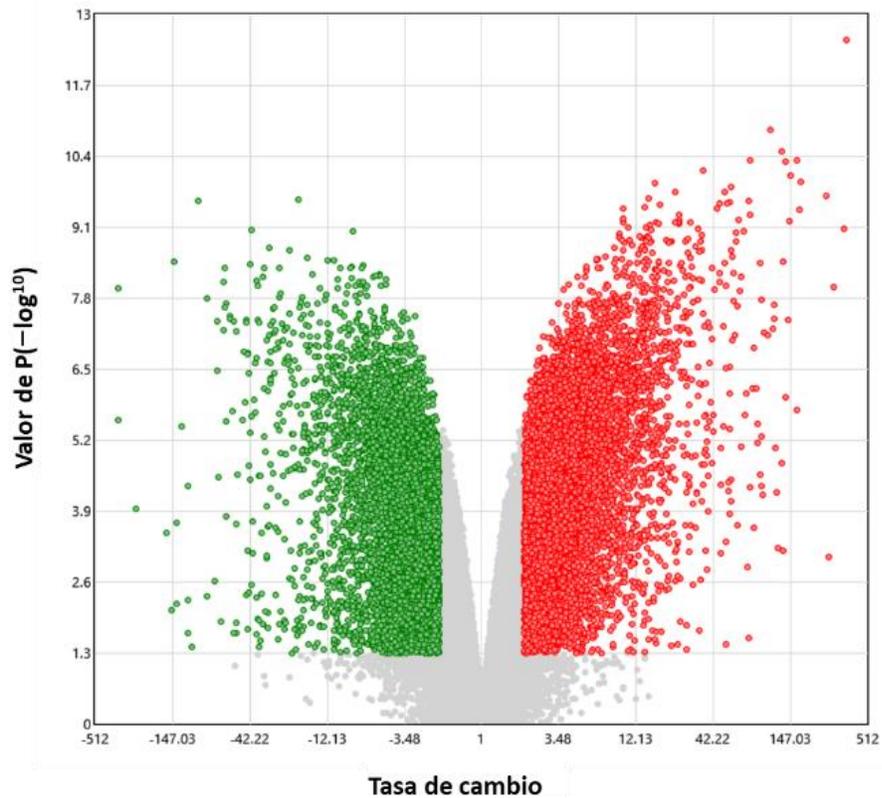


Figura 19. Gráfico de volcán que muestra los transcritos diferencialmente expresados en el TGCT. Los puntos rojos muestran los transcritos sobre expresados mientras que los puntos verdes muestran los transcritos sub-expresados.

Posteriormente, del perfil de 5,692 transcritos subexpresados, se determinó el top 10 de los principales procesos biológicos, componentes celulares, vías KEGG y funciones moleculares, como se muestra en las Figura 20A, B, C y D respectivamente.

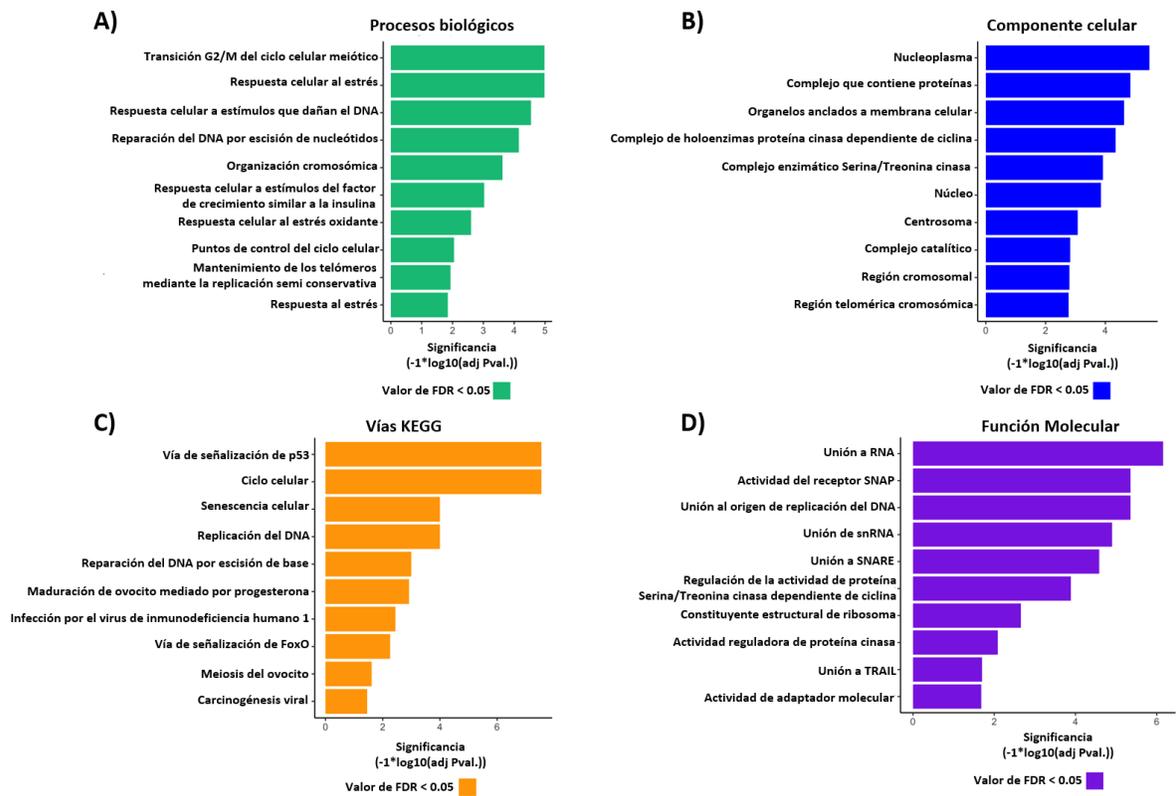


Figura 20. Análisis ontológico del perfil de transcritos subexpresado en TGCT.

De este mismo perfil de transcritos subexpresados, se identificaron 143 posibles transcritos blanco, posiblemente regulados en común por el clúster hsa-miR-371-373 y por el hsa-miR-367, como se muestra en la Figura 21.

Finalmente, de estos 143 transcritos se confirmó que *ARID4B*, *GALNT3* y *KPNA6* se encontraban subexpresados en el TGCT. Y a su vez, se identificaron los patrones de expresión de estos entre el sTGCT y el nsTGCT y entre los diversos estadios clínicos de la neoplasia testicular, como se muestra en la Figura 22.

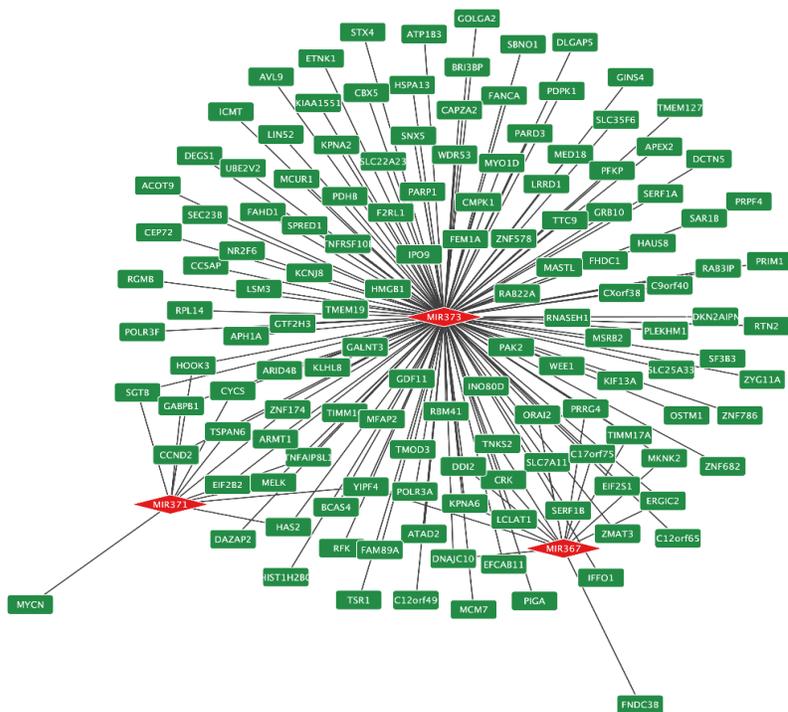


Figura 21. Red de interacción entre los miRNAs analizados y sus posibles transcritos blanco. En los diamantes rojos se encuentran representados el clúster hsa-miR-371-373 y el hsa-miR-367 y dentro de los cuadros verdes, se encuentran representados los 143 transcritos blanco.

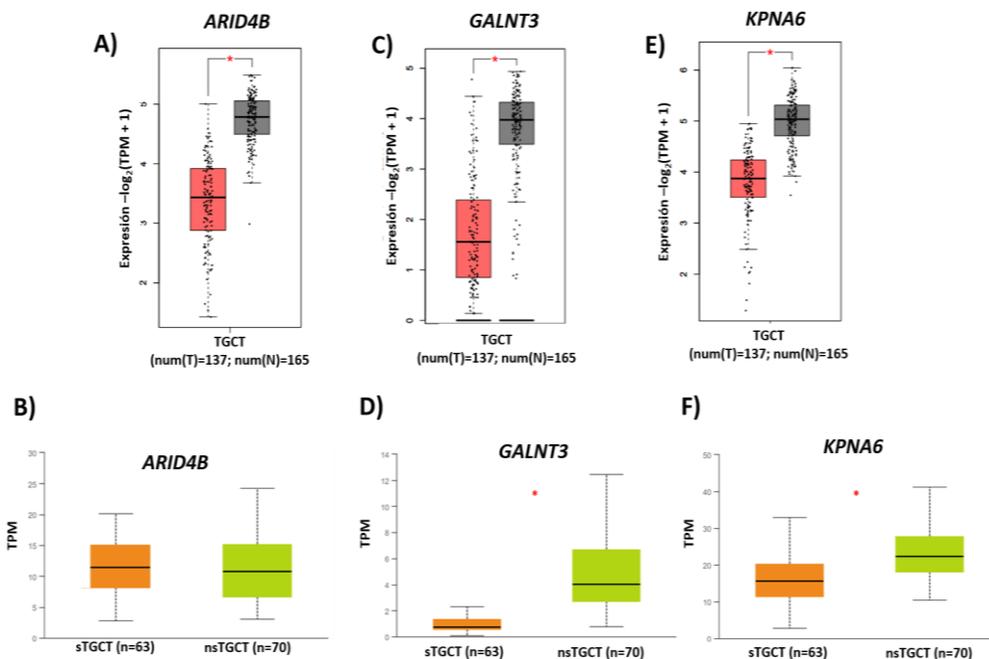


Figura 22. Expresión de *ARID4B*, *GALNT3* y *KPNA6* en diferentes condiciones clínico-patológicas de TGCT. Expresión de *ARID4B* entre A) tejido tumoral vs tejido sano y B) sTGCT y nsTGCT. Expresión de *GALNT3* entre C) tejido tumoral vs tejido sano y D) sTGCT y nsTGCT. Expresión de *KPNA6* entre E) tejido tumoral vs tejido sano y F) sTGCT y nsTGCT.

A partir del análisis bioinformático se seleccionaron los transcritos de los genes *ARID4B*, *GALNT3* y *KPNA6*, los cuales fueron elegidos por su participación en funciones testiculares con la intención de en el futuro realizar la validación funcional de estos en un modelo celular. *ARID4B* se encuentra expresado en células germinales y participa en la formación de la barrera hemato-testicular y actúa como un coactivador del receptor de andrógenos para la correcta función de las células de Sertoli en la espermatogénesis (Wu et al., 2013; Wu et al., 2015). *GALNT3* se encuentra sobreexpresado en células germinales en condiciones normales y se ha reportado que mutaciones en este gen se relacionan con la microlitiasis testicular, patología que cuando se encuentra asociada con la infertilidad, hipospadias o la CO, puede ser un factor de riesgo para el desarrollo del TGCT (Campagnoli et al, 2006; Miyasaki et al., 2012) y *KPNA6* que se expresa en las células de Sertoli regulando la espermatogénesis y su inhibición afecta a la espermatogénesis causando infertilidad (Liu et al., 2021).

La CO es la anomalía genitourinaria más frecuente varones recién nacidos, los cuales muestran un riesgo mayor de desarrollar TGCT respecto a la población general (Komarowska et al., 2015; Rodprasert et al., 2020). Aunque la relación entre ambas patologías está clínicamente establecida, no se ha encontrado ningún factor genético que establezca los mecanismos por los cuales los pacientes con CO desarrollan TGCT en la edad adulta (Komarowska et al., 2015; Gurney et al., 2017; Loebenstein et al., 2019; Lo et al., 2020). Actualmente, el clúster hsa-miR-371-373 y el hsa-miR-367 se han relacionado ampliamente con el desarrollo del TGCT. Normalmente, se expresan en células troncales embrionarias y comparten funciones biológicas, así como, algunos blancos moleculares (Myklebust et al., 2019). Debido a la expresión elevada de manera conjunta de estos miRNAs en el TGCT, se han caracterizado como marcadores específicos de esta neoplasia, (Anheuser et al., 2017; Dieckmann et al., 2012).

Este estudio preliminar, es el primero que describe cómo 2 pacientes con CO con células inmuno-positivos para POU5F1, PLAP y KIT sobre expresan el clúster hsa-

miR-371-373 y el hsa-miR-367 y a su vez, muestran una disminución en la expresión de *LATS2* e *IGF1R* de manera similar a lo observado en pacientes con TGCT.

Debemos mencionar que algunas de las limitaciones del presente trabajo se centran en la dificultad para obtener tejido testicular de pacientes con CO, ya que la toma de biopsia testicular no se realiza de manera rutinaria, ya que clínicamente no se encuentra indicada para el diagnóstico y tratamiento de estos pacientes y su implementación no aporta algún beneficio al paciente. Razón por la cual, muy pocos estudios realizan este abordaje. En nuestro caso, el acceso a estas muestras de archivo fue limitada, lo que impactó en la realización de otros estudios moleculares, como la validación de la expresión de *ARID4B*, *GALNT3* y *KPNA6*. Otra limitación a considerar derivada de la cantidad de las muestras de archivo con las que contamos, fue el poder determinar la expresión *in situ* de los microRNAs directamente en los gonocitos mediante microdissección.

Debemos de tener en cuenta que no todos los pacientes con CO desarrollan el TGCT en edad adulta. Por lo que, los resultados de expresión del clúster hsa-miR-371-373 y del hsa-miR-367 deben ser interpretados de manera individual, contemplando las particularidades de cada paciente con CO. Teniendo en cuenta que la cantidad de células que posiblemente expresan estos miRNAs es menor en el testículo con CO en comparación con el TGCT.

Debido a la naturaleza preliminar de este trabajo, debemos mencionar que un futuro sería importante replicar este análisis en una cohorte de muestras más amplia. Además, de evaluar los blancos moleculares propuestos en este trabajo en un modelo celular, lo que podría ser de gran ayuda en la práctica clínica en un futuro, para poder distinguir a los pacientes con CO que tengan un mayor riesgo de desarrollar TGCT en la edad adulta, así como, contribuir en el conocimiento de la etiología de ambos padecimientos a nivel molecular.

9. CONCLUSIÓN

Hasta el momento este trabajo es el primer reporte que muestra el 16% de los pacientes con CO expresan a niveles altos el clúster hsa-miR-371-373 y del hsa-miR-367 de manera similar a los pacientes con TGCT.

10. BIBLIOGRAFÍA

Ali Syeda, Z., Langden, S. S. S., Munkhzul, C., Lee, M., & Song, S. J. (2020). Regulatory Mechanism of MicroRNA Expression in Cancer. *International journal of molecular sciences*, 21(5), 1723. <https://doi.org/10.3390/ijms21051723>

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 (review). *International journal of oncology*, 41(6), 1897–1912. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1647>

Almstrup, K., Nielsen, J. E., Mlynarska, O., Jansen, M. T., Jørgensen, A., Skakkebaek, N. E., & Rajpert-De Meyts, E. (2010). Carcinoma in situ testis displays permissive chromatin modifications similar to immature fetal germ cells. *British journal of cancer*, 103(8), 1269–1276.

Andreassen, K. E., Kristiansen, W., Karlsson, R., Aschim, E. L., Dahl, O., Fosså, S. D., Adami, H. O., Wiklund, F., Haugen, T. B., & Grotmol, T. (2013). Genetic variation in AKT1, PTEN and the 8q24 locus, and the risk of testicular germ cell tumor. *Human reproduction (Oxford, England)*, 28(7), 1995-2002. <https://doi.org/10.1093/humrep/det127>

Anheuser, P., Radtke, A., Wülfing, C., Kranz, J., Belge, G., & Dieckmann, K. P. (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. <https://doi.org/10.1159/000477446>

Aylon, Y., Yabuta, N., Besserglick, H., Buganim, Y., Rotter, V., Nojima, H., & Oren, M. (2009). Silencing of the Lats2 tumor suppressor overrides a p53-dependent oncogenic stress checkpoint and enables mutant H-Ras-driven cell transformation. *Oncogene*, 28(50), 4469-4479. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.270>

Baillie AH. (1964). The histochemistry and ultrastructure of the gonocyte. *J Anat* 98:641-645

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. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00343>

Barthold J. S. (2008). Undescended testis: current theories of etiology. *Current opinion in urology*, 18(4), 395–400. <https://doi.org/10.1097/MOU.0b013e3283005869>

Batra, N. V., DeMarco, R. T., & Bayne, C. E. (2021). A narrative review of the history and evidence-base for the timing of orchidopexy for cryptorchidism. *Journal of pediatric urology*, 17(2), 239–245. <https://doi.org/10.1016/j.jpurol.2021.01.013>

Bing, Z., Master, S. R., Tobias, J. W., Baldwin, D. A., Xu, X. W., & Tomaszewski, J. E. (2012). MicroRNA expression profiles of seminoma from paraffin-embedded formalin-fixed tissue. *Virchows Archiv: an international journal of pathology*, 461(6), 663–668. <https://doi.org/10.1007/s00428-012-1325-9>

Calin, G. A., & Croce, C. M. (2007). Chromosomal rearrangements and microRNAs: a new cancer link with clinical implications. *The Journal of clinical investigation*, 117(8), 2059–2066. <https://doi.org/10.1172/JCI32577>

Cannarella, R., Condorelli, R. A., La Vignera, S., & Calogero, A. E. (2018). Effects of the insulin-like growth factor system on testicular differentiation and function: a review of the literature. *Andrology*, 6(1), 3–9. <https://doi.org/10.1111/andr.12444>

Carver, B. S., Chapinski, C., Wongvipat, J., Hieronymus, H., Chen, Y., Chandarlapaty, S., Arora, V. K., Le, C., Koutcher, J., Scher, H., Scardino, P. T., Rosen, N., & Sawyers, C. L. (2011). Reciprocal feedback regulation of PI3K and androgen receptor signaling in PTEN-deficient prostate cancer. *Cancer cell*, 19(5), 575-586. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.04.008>

Chen, L., Heikkinen, L., Emily Knott, K., Liang, Y., & Wong, G. (2015). Evolutionary conservation and function of the human embryonic stem cell specific miR-302/367 cluster. *Comparative biochemistry and physiology. Part D, Genomics & proteomics*, 16, 83–98. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2015.08.002>

Cheng, C. J., Wu, Y. C., Shu, J. A., Ling, T. Y., Kuo, H. C., Wu, J. Y., Chang, E. E., Chang, S. C., & Huang, Y. H. (2007). Aberrant expression and distribution of the OCT-4 transcription factor in seminomas. *Journal of biomedical science*, 14(6), 797–807. <https://doi.org/10.1007/s11373-007-9198-7>

Chetram, M. A., & Hinton, C. V. (2012). PTEN regulation of ERK1/2 signaling in cancer. *Journal of receptor and signal transduction research*, 32(4), 190-195. <https://doi.org/10.3109/10799893.2012.695798>

Clasen-Linde, E., Kvist, K., Cortes, D., & Thorup, J. (2016). The value of positive Oct3/4 and D2-40 immunohistochemical expression in prediction of germ cell neoplasia in prepubertal boys with cryptorchidism. *Scandinavian journal of urology*, 50(1), 74–79. <https://doi.org/10.3109/21681805.2015.1088061>

Culty M. (2009). Gonocytes, the forgotten cells of the germ cell lineage, *Birth Defects Res C Embryo Today*, 87:1-26.

Das, M. K., Kleppa, L., & Haugen, T. B. (2019). Functions of genes related to testicular germ cell tumour development. *Andrology*, 7(4), 527–535. <https://doi.org/10.1111/andr.12663>

De Jong, J., Stoop, H., Dohle, G. R., Bangma, C. H., Kliffen, M., van Esser, J. W., ... Looijenga, L. H. (2005). Diagnostic value of OCT3/4 for pre-invasive and invasive testicular germ cell tumours. *The Journal of Pathology*, 206(2), 242–249. doi:10.1002/path.1766

Di Vizio, D., Cito, L., Boccia, A., Chieffi, P., Insabato, L., Pettinato, G., Motti, M. L., Schepis, F., D'Amico, W., Fabiani, F., Tavernise, B., Venuta, S., Fusco, A., & Viglietto,

G. (2005). Loss of the tumor suppressor gene PTEN marks the transition from intratubular germ cell neoplasias (ITGCN) to invasive germ cell tumors. *Oncogene*, 24(11), 1882-1894. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208368>

Dieckmann KP, Radtke A, Geczi L, Matthies C, Anheuser P, Eckardt U, Sommer J, Zengerling F, Trenti E, Pichler R, Belz H, Zastrow S, Winter A, Melchior S, Hammel J, Kranz J, Bolten M, Krege S, Haben B, Loidl W, Ruf CG, Heinzlbecker J, Heidenreich A, Cremers JF, Oing C, Hermanns T, Fankhauser CD, Gillessen S, Reichegger H, Cathomas R, Pichler M, Hentrich M, Eredics K, Lorch A, Wülfing C, Peine S, Wosniok W, Bokemeyer C, & Belge G. (2019). Serum Levels of MicroRNA-371a-3p (M371 Test) as a New Biomarker of Testicular Germ Cell Tumors: Results of a Prospective Multicentric Study. *J Clin Oncol.* 1;37(16):1412-1423. <https://doi:10.1200/JCO.18.01480>

Dieckmann, K. P., & Pichlmeier, U. (2004). Clinical epidemiology of testicular germ cell tumors. *World journal of urology*, 22(1), 2–14. <https://doi.org/10.1007/s00345-004-0398-8>

Dieckmann, K. P., Spiekermann, M., Balks, T., Flor, I., Löning, T., Bullerdiek, J., & Belge, G. (2012). MicroRNAs miR-371-3 in serum as diagnostic tools in the management of testicular germ cell tumours. *British journal of cancer*, 107(10), 1754–1760. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.469>

Dieckmann, K. P., Spiekermann, M., Balks, T., Ikogho, R., Anheuser, P., Wosniok, W., Loening, T., Bullerdiek, J., & Belge, G. (2016). MicroRNA miR-371a-3p - A Novel Serum Biomarker of Testicular Germ Cell Tumors: Evidence for Specificity from Measurements in Testicular Vein Blood and in Neoplastic Hydrocele Fluid. *Urologia internationalis*, 97(1), 76–83. <https://doi.org/10.1159/000444303>

Duale, N., Lindeman, B., Komada, M., Olsen, A. K., Andreassen, A., Soderlund, E. J., & Brunborg, G. (2007). Molecular portrait of cisplatin induced response in human testis

cancer cell lines based on gene expression profiles. *Molecular cancer*, 6, 53. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-6-53>

Elamo, H. P., Virtanen, H. E., & Toppari, J. (2022). Genetics of cryptorchidism and testicular regression. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, 36(1), 101619. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2022.101619>

Facer, L., Pham, T., & Rogers, D. (2022). Lost in descent: Complications of cryptorchidism. *Radiology case reports*, 18(1), 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.radcr.2022.10.022>

Ferguson, L., & AgoulNIK, A. I. (2013). Testicular cancer and cryptorchidism. *Frontiers in endocrinology*, 4, 32. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00032>

Fukawa, T., & Kanayama, H. O. (2018). Current knowledge of risk factors for testicular germ cell tumors. *International journal of urology: official journal of the Japanese Urological Association*, 25(4), 337–344. <https://doi.org/10.1111/iju.13519>

Gao, Z., Zhu, X., & Dou, Y. (2015). The miR-302/367 cluster: a comprehensive update on its evolution and functions. *Open biology*, 5(12), 150138. <https://doi.org/10.1098/rsob.150138>

Guo, C., Liang, C., Yang, J., Hu, H., Fan, B. y Liu, X. (2019). LATS2 inhibe la proliferación celular y la metástasis a través de la vía de señalización Hippo en el glioma. *Informes de oncología*. 41(5), 2753–2761. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7065>

Gurney, J. K., McGlynn, K. A., Stanley, J., Merriman, T., Signal, V., Shaw, C., Edwards, R., Richiardi, L., Hutson, J., & Sarfati, D. (2017). Risk factors for cryptorchidism. *Nature reviews. Urology*, 14(9), 534–548. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2017.90>

Hadziselimovic, F., Hadziselimovic, N. O., Demougin, P., Krey, G., & Oakeley, E. (2015). Piwi-pathway alteration induces LINE-1 transposon derepression and infertility development in cryptorchidism. *Sexual development: genetics, molecular biology*,

evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation, 9(2), 98–104. <https://doi.org/10.1159/000375351>

Harisis, G. N., Chen, N., Farmer, P. J., Bodemer, D., Li, R., Sourial, M., Southwell, B. R., Balic, A., & Hutson, J. M. (2013). Wnt signalling in testicular descent: a candidate mechanism for cryptorchidism in Robinow syndrome. *Journal of pediatric surgery*, 48(7), 1573–1577. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2012.08.03>

Heidegger, I., Kern, J., Ofer, P., Klocker, H. y Massoner, P. (2014). Las funciones oncogénicas de IGF1R e INSR en el cáncer de próstata incluyen crecimiento tumoral mejorado, migración celular y angiogénesis. *Oncotarget*, 5 (9), 2723–2735. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1884>

Hoei-Hansen, C. E., Rajpert-De Meyts, E., Daugaard, G., & Skakkebaek, N. E. (2005). Carcinoma in situ testis, the progenitor of testicular germ cell tumours: a clinical review. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, 16(6), 863–868. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdi175>

Honecker, F., Stoop, H., de Krijger, R. R., Chris Lau, Y. F., Bokemeyer, C., & Looijenga, L. H. (2004). Pathobiological implications of the expression of markers of testicular carcinoma in situ by fetal germ cells. *The Journal of pathology*, 203(3), 849–857. <https://doi.org/10.1002/path.1587>

Howitt, B. E., & Berney, D. M. (2015). *Tumors of the Testis. Surgical Pathology Clinics*, 8(4), 687–716. doi:10.1016/j.path. 2015.07.007

Jia, H., Ma, T., Jia, S., & Ouyang, Y. (2021). AKT3 and related molecules as potential biomarkers responsible for cryptorchidism and cryptorchidism-induced azoospermia. *Translational pediatrics*, 10(7), 1805-1817. <https://doi.org/10.21037/tp-21-3>

Kent, O. A., & Mendell, J. T. (2006). A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes. *Oncogene*, 25(46), 6188–6196. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209913>

Komarowska, M. D., Hermanowicz, A., & Debek, W. (2015). Putting the pieces together: cryptorchidism - do we know everything? *Journal of pediatric endocrinology & metabolism: JPEM*, 28(11-12), 1247–1256. <https://doi.org/10.1515/jpem-2015-0098>

Koni, A., Ozseker, H. S., Arpali, E., Kilinc, E., Dogan, H. S., Akyol, A., & Tekgul, S. (2014). Histopathological evaluation of orchietomy specimens in 51 late postpubertal men with unilateral cryptorchidism. *The Journal of urology*, 192(4), 1183-1188. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2014.05.048>

Kozomara, A., Birgaoanu, M., & Griffiths-Jones, S. (2019). miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic acids research*, 47(D1), D155–D162. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1141>

Kuo, C. H., Deng, J. H., Deng, Q., & Ying, S. Y. (2012). A novel role of miR-302/367 in reprogramming. *Biochemical and biophysical research communications*, 417(1), 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.11.058>

Kvist, K., Clasen-Linde, E., Langballe, O., Hansen, S. H., Cortes, D., & Thorup, J. (2018). The Expression of Markers for Intratubular Germ Cell Neoplasia in Normal Infantile Testes. *Frontiers in endocrinology*, 9, 286. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00286>

Landero-Huerta, D. A., Viguera-Villasenor, R. M., Yokoyama-Rebollar, E., Arechaga-Ocampo, E., Rojas-Castaneda, J. C., Jimenez-Trejo, F., & Chavez-Saldana, M. (2017). Epigenetic and risk factors of testicular germ cell tumors: a brief review. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 22(7), 1073–1098

Li, Z., Pan, W., Shen, Y., Chen, Z., Zhang, L., Zhang, Y., Luo, Q., & Ying, X. (2018). IGF1/IGF1R and microRNA let-7e down-regulate each other and modulate proliferation and migration of colorectal cancer cells. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 17(10), 1212-1219. <https://doi.org/10.1080/15384101.2018.1469873>

Liu J., Wang Y., Ji P., Jin X. Aplicación del grupo microARN-302/367 en la terapia del cáncer. *Ciencia del cáncer*. 2020; 111 : 1065-1075. doi: 10.1111/cas.14317.

Lobo, J., van Zogchel, L. M. J., Nuru, M. G., Gillis, A. J. M., van der Schoot, C. E., Tytgat, G. A. M., & Looijenga, L. H. J. (2021). Combining Hypermethylated *RASSF1A* Detection Using ddPCR with miR-371a-3p Testing: An Improved Panel of Liquid Biopsy Biomarkers for Testicular Germ Cell Tumor Patients. *Cancers*, 13(20), 5228. <https://doi.org/10.3390/cancers13205228>

Loebenstein, M., Thorup, J., Cortes, D., Clasen-Linde, E., Hutson, J. M., & Li, R. (2019). Cryptorchidism, gonocyte development, and the risks of germ cell malignancy and infertility: A systematic review. *Journal of pediatric surgery*, S0022-3468(19)30450-6. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2019.06.023>

Looijenga, L. H., Gillis, A. J., Stoop, H. J., Hersmus, R., & Oosterhuis, J. W. (2007). Chromosomes and expression in human testicular germ-cell tumors: insight into their cell of origin and pathogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1120, 187–214. <https://doi.org/10.1196/annals.1411.000>

Ludwikowski, B., & González, R. (2013). The controversy regarding the need for hormonal treatment in boys with unilateral cryptorchidism goes on: a review of the literature. *European journal of pediatrics*, 172(1), 5–8. <https://doi.org/10.1007/s00431-012-1711-y>

McPherson, J. P., Tamblyn, L., Elia, A., Migon, E., Shehabeldin, A., Matysiak-Zablocki, E., Lemmers, B., Salmena, L., Hakem, A., Fish, J., Kassam, F., Squire, J., Bruneau, B. G., Hande, M. P., & Hakem, R. (2004). *Lats2/Kpm* is required for embryonic development, proliferation control and genomic integrity. *The EMBO journal*, 23(18), 3677–3688. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600371>

Murray, M. J., Bell, E., Raby, K. L., Rijlaarsdam, M. A., Gillis, A. J., Looijenga, L. H., Brown, H., Destenaves, B., Nicholson, J. C., & Coleman, N. (2016). A pipeline to quantify serum and cerebrospinal fluid microRNAs for diagnosis and detection of

relapse in paediatric malignant germ-cell tumours. *British journal of cancer*, 114(2), 151–162. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.429>

Murray, M. J., Halsall, D. J., Hook, C. E., Williams, D. M., Nicholson, J. C., & Coleman, N. (2011). Identification of microRNAs from the miR-371~373 and miR-302 clusters as potential serum biomarkers of malignant germ cell tumors. *American journal of clinical pathology*, 135(1), 119–125

Myklebust, M. P., Rosenlund, B., Gjengstø, P., Bercea, B. S., Karlsdottir, Á., Brydøy, M., & Dahl, O. (2019). Quantitative PCR Measurement of miR-371a-3p and miR-372-p Is Influenced by Hemolysis. *Frontiers in genetics*, 10, 463. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00463>

Neuvians, TP, Gashaw, I., Hasenfus, A., Hacherhäcker, A., Winterhager, E. y Grobholz, R. (2005). Differential expression of IGF components and insulin receptor isoforms in human seminoma versus normal testicular tissue. (*New York, NY*), 7(5), 446-456. <https://doi.org/10.1593/neo.04643>

Oosterhuis, J. W., & Looijenga, L. H. (2005). Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nature reviews. Cancer*, 5(3), 210–222. <https://doi.org/10.1038/nrc1568>

Pajares, M. J., Alemany-Cosme, E., Goñi, S., Bandres, E., Palanca-Ballester, C., & Sandoval, J. (2021). Epigenetic Regulation of microRNAs in Cancer: Shortening the Distance from Bench to Bedside. *International journal of molecular sciences*, 22(14), 7350. <https://doi.org/10.3390/ijms22147350>

Palmer, R. D., Murray, M. J., Saini, H. K., van Dongen, S., Abreu-Goodger, C., Muralidhar, B., Pett, M. R., Thornton, C. M., Nicholson, J. C., Enright, A. J., Coleman, N., & Children's Cancer and Leukaemia Group (2010). Malignant germ cell tumors display common microRNA profiles resulting in global changes in expression of messenger RNA targets. *Cancer research*, 70(7), 2911-2923. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3301>

Pelloni, M., Coltrinari, G., Paoli, D., Pallotti, F., Lombardo, F., Lenzi, A., & Gandini, L. (2017). Differential expression of miRNAs in the seminal plasma and serum of testicular cancer patients. *Endocrine*, 57(3), 518–527. <https://doi.org/10.1007/s12020-016-1150-z>

Radtke, A., Cremers, J. F., Kliesch, S., Riek, S., Junker, K., Mohamed, S. A., Anheuser, P., Belge, G., & Dieckmann, K. P. (2017). Can germ cell neoplasia in situ be diagnosed by measuring serum levels of microRNA371a-3p?. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 143(11), 2383–2392. <https://doi.org/10.1007/s00432-017-2490-7>

Rajpert-De Meyts E. (2006). Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspects. *Human reproduction update*, 12(3), 303–323. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmk006>

Regouc, M., Belge, G., Lorch, A., Dieckmann, K. P., & Pichler, M. (2020). Non-Coding microRNAs as Novel Potential Tumor Markers in Testicular Cancer. *Cancers*, 12(3), 749. <https://doi.org/10.3390/cancers12030749>

Rijlaarsdam, M. A., van Agthoven, T., Gillis, A. J., Patel, S., Hayashibara, K., Lee, K. Y., & Looijenga, L. H. (2015). Identification of known and novel germ cell cancer-specific (embryonic) miRs in serum by high-throughput profiling. *Andrology*, 3(1), 85–91. <https://doi.org/10.1111/andr.298>

Rodprasert, W., Virtanen, H. E., Mäkelä, J. A., & Toppari, J. (2020). Hypogonadism and Cryptorchidism. *Frontiers in endocrinology*, 10, 906. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00906>

Rosenfeld, N., Aharonov, R., Meiri, E., Rosenwald, S., Spector, Y., Zepeniuk, M., Benjamin, H., Shabes, N., Tabak, S., Levy, A., Lebanony, D., Goren, Y., Silberschein, E., Targan, N., Ben-Ari, A., Gilad, S., Sion-Vardy, N., Tobar, A., Feinmesser, M., Kharenko, O., ... Barshack, I. (2008). MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nature biotechnology*, 26(4), 462–469. <https://doi.org/10.1038/nbt1392>

Selfe, J., & Shipley, J. M. (2019). IGF signalling in germ cells and testicular germ cell tumours: roles and therapeutic approaches. *Andrology*, 7(4), 536–544. <https://doi.org/10.1111/andr.12658>

Semjén, D., Bíró, K., Kapitány, E., Kálmán, E., Tornóczy, T., & Kajtár, B. (2020). Histology, 12p status, and IMP3 expression separate subtypes in testicular teratomas. *Virchows Archiv: an international journal of pathology*, 477(1), 103–110. <https://doi.org/10.1007/s00428-020-02771-2>

Shah, J. A., Khattak, S., Rauf, M. A., Cai, Y., & Jin, J. (2021). Potential Biomarkers of miR-371-373 Gene Cluster in Tumorigenesis. *Life (Basel, Switzerland)*, 11(9), 984. <https://doi.org/10.3390/life11090984>

Shin, J. W., Kim, S. H., & Yoon, J. Y. (2021). PTEN downregulation induces apoptosis and cell cycle arrest in uterine cervical cancer cells. *Experimental and therapeutic medicine*, 22(4), 1100. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.10534>

Shinoda, J., Sakai, N., Yano, H., Hattori, T., Ohkuma, A., & Sakaguchi, H. (2004). Prognostic factors and therapeutic problems of primary intracranial choriocarcinoma/germ-cell tumors with high levels of HCG. *Journal of neuro-oncology*, 66(1-2), 225–240. <https://doi.org/10.1023/b:neon.0000013499.74404.81>

Skakkebaek, N. E., Berthelsen, J. G., Giwercman, A., & Müller, J. (1987). Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma. *International journal of andrology*, 10(1), 19–28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1987.tb00161.x>

Spiekermann, M., Belge, G., Winter, N., Ikogho, R., Barks, T., Bullerdiek, J., & Dieckmann, K. P. (2015). MicroRNA miR-371a-3p in serum of patients with germ cell tumours: evaluations for establishing a serum biomarker. *Andrology*, 3(1), 78–84. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2014.00269.x>

Steiner, M., Weipoltshammer, K., Viehberger, G., Meixner, E. M., Lunglmayr, G., & Schöfer, C. (2011). Immunohistochemical expression analysis of Cx43, Cx26, c-KIT and PIAP in contralateral testis biopsies of patients with non-seminomatous testicular germ cell tumor. *Histochemistry and cell biology*, 135(1), 73–81. <https://doi.org/10.1007/s00418-010-0769-8>

Tamimi, R. M., Colditz, G. A., Wang, Y., Collins, L. C., Hu, R., Rosner, B., Irie, H. Y., Connolly, J. L., & Schnitt, S. J. (2011). Expression of IGF1R in normal breast tissue and subsequent risk of breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 128(1), 243–250. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-1313-1>

Tang, D., Huang, Z., He, X., Wu, H., Peng, D., Zhang, L., & Zhang, X. (2018). Altered miRNA profile in testis of post-cryptorchidopexy patients with non-obstructive azoospermia. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, 16(1), 78. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0393-3>

Terbuch, A., Adiprasito, J. B., Stiegelbauer, V., Seles, M., Klec, C., Pichler, G. P., Resel, M., Posch, F., Lembeck, A. L., Stöger, H., Szkandera, J., Pummer, K., Bauernhofer, T., Hutterer, G. C., Gerger, A., Stotz, M., & Pichler, M. (2018). MiR-371a-3p Serum Levels Are Increased in Recurrence of Testicular Germ Cell Tumor Patients. *International journal of molecular sciences*, 19(10), 3130. <https://doi.org/10.3390/ijms19103130>

Thorup, J., Kvist, K., Clasen-Linde, E., Petersen, B. L., & Cortes, D. (2013). The relation between adult dark spermatogonia and other parameters of fertility potential in cryptorchid testes. *The Journal of urology*, 190(4 Suppl), 1566–1571. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2013.01.058>

Tien, M. Y., Abeydeera, S. A., Cho, H. J., Sarila, G., Catubig, A., Burton, E., Hutson, J., & Li, R. (2020). Does the apoptosis pathway play a critical role in gonocyte transformation? *Journal of pediatric surgery*, 55(9), 1947–1951.

van Agthoven, T., & Looijenga, L. (2016). Accurate primary germ cell cancer diagnosis using serum based microRNA detection (ampTSmiR test). *Oncotarget*, *8*(35), 58037–58049. doi:10.18632/oncotarget.10867

Viguera-Villaseñor, R. M., Cortés-Trujillo, L., Chávez-Saldaña, M., Vázquez, F. G., Carrasco-Daza, D., Cuevas-Alpuche, O., & Rojas-Castañeda, J. C. (2015). Analysis of POU5F1, c-Kit, PLAP, AP2γ and SALL4 in gonocytes of patients with cryptorchidism. *Acta histochemica*, *117*(8), 752–761. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2015.08.004>

Viguera-Villaseñor, R. M., Montelongo Solís, P., Chávez-Saldaña, M., Gutiérrez-Pérez, O., Cortés Trujillo, L., & Rojas-Castañeda, J. C. (2016). Development of germ cell neoplasia in situ in chinchilla rabbits. *Histology and histopathology*, *31*(5), 573–584.

Vilela-Salgueiro, B., Barros-Silva, D., Lobo, J., Costa, AL, Guimarães, R., Cantante, M., Lopes, P., Braga, I., Oliveira, J., Henrique, R., & Jerónimo, C. (2018). Los subtipos de tumores de células germinales muestran expresión diferencial de microRNA 371a-3p. *Transacciones filosóficas de la Royal Society de Londres. Serie B, Ciencias biológicas*, *373*(1748), 20170338. <https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0338>

Voorhoeve, P. M., le Sage, C., Schrier, M., Gillis, A. J., Stoop, H., Nagel, R., Liu, Y. P., van Duijse, J., Drost, J., Griekspoor, A., Zlotorynski, E., Yabuta, N., De Vita, G., Nojima, H., Looijenga, L. H., & Agami, R. (2006). A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell*, *124*(6), 1169-1181. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.037>

Wang, H., Zhao, Y., Chen, T., Liu, G., He, N., & Hu, H. (2019). MiR-371 promotes proliferation and metastasis in hepatocellular carcinoma by targeting PTEN. *BMB reports*, *52*(5), 312–317. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2019.52.5.155>

Wang, Z., & Luo, Y. (2019). MicroRNA-367 promotes progression of hepatocellular carcinoma through PTEN/PI3K/AKT signaling pathway. *Bioscience reports*, *BSR20182466*. <https://doi.org/10.1042/BSR20182466>

Wei, F., Cao, C., Xu, X., & Wang, J. (2015). Diverse functions of miR-373 in cancer. *Journal of translational medicine*, 13, 162. <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0523-z>

Wu R.-C., Jiang M., Beaudet AL, Wu M.-Y. ARID4A y ARID4B regulan la fertilidad masculina, un vínculo funcional con las vías AR y RB. *Proc. Nacional. Acad. Ciencia. EE.UU.* 2013; 110: 4616–4621. doi: 10.1073/pnas.1218318110.

Wu, G., Wang, Y., Lu, X., He, H., Liu, H., Meng, X., Xia, S., Zheng, K., & Liu, B. (2015). Low mir-372 expression correlates with poor prognosis and tumor metastasis in hepatocellular carcinoma. *BMC cancer*, 15, 182. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1214>

Wu, S., Aksoy, M., Shi, J., & Houbaviy, H. B. (2014). Evolution of the miR-290-295/miR-371-373 cluster family seed repertoire. *PloS one*, 9(9), e108519. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108519>

Yang, N. Q., Luo, X. J., Zhang, J., Wang, G. M., & Guo, J. M. (2016). Crosstalk between Meg3 and miR-1297 regulates growth of testicular germ cell tumor through PTEN/PI3K/AKT pathway. *American journal of translational research*, 8(2), 1091-1099

Yu, C., Wei, Y., Tang, X., Liu, B., Shen, L., Long, C., Lin, T., He, D., Wu, S., & Wei, G. (2019). Maternal smoking during pregnancy and risk of cryptorchidism: a systematic review and meta-analysis. *European journal of pediatrics*, 178(3), 287–297. <https://doi.org/10.1007/s00431-018-3293-9>

Yu, E. J., Hooker, E., Johnson, D. T., Kwak, M. K., Zou, K., Luong, R., He, Y., & Sun, Z. (2017). LZTS2 and PTEN collaboratively regulate β -catenin in prostatic tumorigenesis. *PloSone*, 12(3), e0174357 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174357>

Zhu, F., Wang, L., & Zhai, X. (2020). Primary mediastinal yolk sac tumor: a case report and literature review. *International journal of clinical and experimental pathology*, 13(11), 2772–2777.

Znaor, A., Skakkebaek, N. E., Rajpert-De Meyts, E., Kuliš, T., Laversanne, M., Gurney, J., Sarfati, D., McGlynn, K. A., & Bray, F. (2022). Global patterns in testicular cancer incidence and mortality in 2020. *International journal of cancer*, 151(5), 692–698. <https://doi.org/10.1002/ijc.33999>

11. ANEXOS

11.1 ARTÍCULO CIENTÍFICO ORIGINAL

Article

Molecular Characterization of Patients with Cryptorchidism: Preliminary Search for an Expression Profile Related to That of Testicular Germ-Cell Tumors

Fabiola García-Andrade ^{1,2}, Rosa María Viguera-Villaseñor ^{1,*}, Margarita Dolores Chávez-Saldaña ^{1,†}, Julio César Rojas-Castañeda ¹, Ivan Uriel Bahena-Ocampo ³, Elena Aréchaga-Ocampo ⁴, Mauricio Flores-Fortis ⁵, José Díaz-Chávez ⁶, Luis Alonso Herrera ^{6,7} and Daniel Adrian Landero-Huerta ^{1,*}

- ¹ Laboratorio de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Pediatría, Ciudad de Mexico 04530, Mexico
 - ² Posgrado en Biología Experimental, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Ciudad de Mexico 09310, Mexico
 - ³ Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Ciudad de Mexico 09310, Mexico
 - ⁴ Departamento de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa, Ciudad de Mexico 05348, Mexico
 - ⁵ Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa, Ciudad de Mexico 05348, Mexico
 - ⁶ Unidad de Investigación en Cáncer, Instituto de Investigaciones Biomédicas-Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Cancerología, Ciudad de Mexico 14080, Mexico
 - ⁷ Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud-Tecnológico de Monterrey, Ciudad de Mexico 14380, Mexico
- * Correspondence: rmvigueras@yahoo.com.mx (R.M.V.-V.); qdanielfadrianb@hotmail.com (D.A.L.-H.); Tel.: +52-(55)-1084-0900 (ext. 1453) (R.M.V.-V. & D.A.L.-H.); Fax: +52-(55)-1084-5533 (R.M.V.-V. & D.A.L.-H.)
† The author passed away before submitting the manuscript.



Citation: García-Andrade, F.; Viguera-Villaseñor, R.M.; Chávez-Saldaña, M.D.;

Rojas-Castañeda, J.C.; Bahena-Ocampo, I.U.; Aréchaga-Ocampo, E.; Flores-Fortis, M.; Díaz-Chávez, J.; Herrera, L.A.; Landero-Huerta, D.A. Molecular Characterization of Patients with Cryptorchidism: Preliminary Search for an Expression Profile Related to That of Testicular Germ-Cell Tumors. *Diagnostics* **2023**, *13*, 3020. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13183020>

Academic Editors: Manal S. Fawzy and Eman A. Toraih

Received: 16 June 2023

Revised: 30 August 2023

Accepted: 9 September 2023

Published: 21 September 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Cryptorchidism (CO) is a risk factor for the development of testicular germ-cell tumors (TGCT). This is supported by reports showing the persistence of gonocytes in CO patients. These cells are proposed to be related to the development of germ-cell neoplasia in situ (GCNIS), which is considered the precursor stage/lesion of TGCT. Therefore, it is proposed that some patients with CO could express some molecular markers related to TGCT. In this study, we analyzed testicular tissue samples from CO, TGCT, and controls. We determined the expression of POU5F1, PLAP, and KIT by immunohistochemistry and that of the hsa-miR-371-373 cluster, hsa-miR-367, and *LATS2*, *PTEN*, and *IGF1R* genes by RT-qPCR. We then carried out a bioinformatic analysis to identify other possible candidate genes as tumor biomarkers. We found that 16.7% (2/12) of the CO patients presented increased expression of POU5F1, KIT, PLAP, hsa-miR-371-373, and hsa-miR-367 and decreased expression of *LATS2* and *IGF1R*. Finally, the genes *ARID4B*, *GALNT3*, and *KPNA6* were identified as other possible candidate tumor biomarkers. This is the first report describing the expression of the hsa-miR-371-373 cluster, hsa-miR-367, *LATS2*, and *IGF1R* in the testicular tissues of two CO patients with cells immune-positive to POU5F1, PLAP, and KIT, which is similar to what is observed in TGCT.

Keywords: cryptorchidism; hsa-miR-371-373 cluster; hsa-miR-367; *IGF1R*; *LATS2*; testicular germ-cell tumor

1. Introduction

Cryptorchidism (CO; OMIM # 219050), or undescended testis, is the most common genitourinary anomaly in live male newborns and affects one or both testicles; this malformation is classified according to the anatomical location of the testicle, such as abdominal or inguinal. It can occur in association with various chromosomal syndromes or in isolation (non-syndromic). It is considered a multifactorial condition in which environmental, lifestyle, hormonal, and genetic factors are involved [1]. This malformation increases the risk of developing testicular germ-cell tumors (TGCT; OMIM # 273300) [2].

Germ-cell neoplasia in situ (GCNIS) is a precursor stage/lesion from which invasive TGCTs are derived [3]. It was suggested that GCNIS originates from gonocytes during embryonic development, as suggested by the morphological similarities between gonocytes and atypical cells present in the lesion [4], as well as by their expression of proteins such as POU domain class 5 transcription factor 1 (POU5F1), the transcription factor AP2 γ (AP2 γ), the tyrosine kinase receptor c-Kit (KIT), placental-like alkaline phosphatase (PLAP), sal-like protein 4 (SALL4), the homebox transcription factor Nanog (NANOG), and thy-1 cell surface antigen (THY1) [5,6]. Some reports show the persistence of gonocytes in pediatric CO patients [7], which did not mature into type A spermatogonia [8]. It was reported that a low proportion of CO patients older than one year of age may present the expression of at least one and up to five previously described proteins. Therefore, it is believed that the persistence of undifferentiated gonocytes with pluripotent capacity beyond the differentiation period could be responsible for the development of malignancy in some of these CO patients [6,8]. In addition, it was shown that fetal gonocytes without any morphological alteration obtained from abortions express the hsa-miR-371-373 and hsa-miR-302-367 clusters in a similar way to GCNIS tissue and serum samples from GCNIS adult patients. [9,10]. However, even when there is a clinical relationship between CO and TGCT, the molecular pathways that support the association between the two conditions are unknown [11].

The expression of some microRNAs (miRNAs) in TGCT has also been reported [12,13]. In particular, overexpression of the hsa-miR-371-373 cluster and of hsa-miR-367 was identified regardless of tumor histological subtype or anatomical site or of the patient's age [14]. To date, only overexpression of these miRNAs has been reported in TGCT, which increases their potential as biomarkers for the future in the clinical practice [15].

Likewise, in TGCT, the sub-expression of multiple essential genes in various biological pathways necessary for the maintenance of the tumor phenotype has been reported [16], indicating them as possible targets of the hsa-miR-371-373 cluster and of hsa-miR-367. Therefore, in this work, we performed molecular characterization of testicular tissues from CO patients on the basis of the expression profile of TGCT.

2. Materials and Methods

2.1. Patients

We analyzed 36 paraffin-embedded testicular tissue samples (from 36 patients) distributed in 3 different study groups: (1) a control group from the Instituto de Ciencias Forenses (INCIFO, Mexico City, Mexico), (2) a CO group, and (3) a TGCT group, all with 12 samples, from the pathology service of the Instituto Nacional de Cancerología (INCan, Mexico City, Mexico). Prior to the selection of the tissues, we verified in the patients' clinical history that the patients had, at minimum, Mexican ancestry for at least two generations, with a 46,XY karyotype and no disorders of sex development.

2.2. Histological and Immunohistochemical Analysis

Paraffin-embedded testicular tissues were sectioned on a microtome (Leica RM 2155; Microsystems, Nussloch GmbH, Heidelberg, Germany), producing 4 μ m thick slices that were mounted on poly-L-lysine-coated slides (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The tissue sections were deparaffinized and hydrated in a graded ethanol series. For each patient, one slide containing the tissue sections was stained with hematoxylin and eosin, and another was mounted on a drop-cover plate (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The slides were incubated in 0.1 M EDTA pH 9 (immuno Dual retrieval with EDTA) for POU5F1 staining and in 0.1 M citrate buffer pH 6.0 (Bio SB, Sta. Barbara, CA, USA) for vimentin, KIT, and PLAP staining and placed in a microwave inside a pressure cooker (NordicWare® Microwave Tender Cooker, Biogenex, San Ramon, CA, USA) for 1 min at high power (1000 W). After cooling, the tissue sections were incubated in 0.9% H₂O₂ in distilled water for 5 min. The sections were consecutively incubated with an anti-vimentin mouse monoclonal antibody at a dilution of 1:50 (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA,

M 0725, lot 092) for 45 min at room temperature, followed by a secondary antibody coupled to biotin, and subsequently were treated with a solution of horseradish peroxidase coupled to streptavidin for 30 min at room temperature. The diaminobenzidine reaction was used to reveal tissue immunoreactivity. For POU5F1 staining, a mouse monoclonal antibody was used at a 1:50 dilution (Santa Cruz, Biotechnology, Dallas, TX, USA, SC 5279, lot F2513), incubating the samples for 45 min at room temperature, followed by treatment with a biotin-free system (secondary antibody goat anti-mouse-HRP and polymer (MACH 2 Mouse HRP-Polymer, Biocare Medicals, Concord, CA, USA, MHRP520 L)) for 30 min at room temperature, according to the manufacturer's instructions. The reaction was evidenced using diaminobenzidine (BSB 0005, Bio SB, Santa Barbara, CA, USA).

For KIT/CD117 staining, a mouse monoclonal antibody (Leica Novocastra Bannock, Burn, IL, USA, L-CD117, lot 6014169) was applied at a 1:50 dilution for 45 min at room temperature, followed by incubation with a biotin-coupled secondary antibody and a streptavidin-coupled horseradish peroxidase solution for 30 min at room temperature; immunoreactivity was finally revealed using a diaminobenzidine substrate mix (Bio SB). For PLAP staining, a 1:50 diluted mouse monoclonal antibody (Dako Cytomation M7191) was applied for 45 min at room temperature, followed by incubation with a secondary antibody coupled to biotin and with streptavidin coupled to alkaline phosphatase (BioGenex, Fremont, CA, USA, LA000-UL) in the presence of an alkaline phosphatase substrate for 30 min (BioGenex), according to the manufacturer's instructions. At the end of the reaction, the sections were counterstained with Gill's hematoxylin and covered with entellan medium (Merck, Darmstadt, Germany).

Vimentin staining was performed to verify the integrity of the antigenic sites. Negative-control sections were processed identically, but the primary antibody incubation step was omitted. None of the negative controls showed immunoreactivity. Tumor tissue was included as a positive control. For the identification of germ cells showing a positive signal, 5 to 10 cross-sections of seminiferous tubules were examined. The samples showing focal staining in germ cells in some seminiferous tubules were classified as positive.

2.3. RNA Isolation and RT-qPCR

miRNAs and total RNA were extracted using the Qiagen[®] miRNeasy FFPE Kit, Hilden, Germany, and the FFPE RNA/DNA Purification Plus Kit (Cat. 54300), Norgen Biotek Corp., Thorold, Ontario, Canada, respectively. Reverse transcription of the hsa-miR-371-373 cluster and hsa-miR-367 was performed using the TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription Kit, Waltham, MA, USA (Applied Biosystems). On the other hand, for mRNA analysis of the large tumor suppressor kinase (*LATS2*), phosphatase and tensin homolog (*PTEN*), and insulin-like growth factor 1 receptor (*IGF1R*) genes, the TaqMan[®] Reverse Transcription Reagents Kit N8080234 (Applied Biosystems) was used. In both cases, we obtained cDNA from aliquots of 100 ng of RNA for each assay. Subsequently, qPCR assays were performed in triplicate in an Applied Biosystem StepOne[™] thermocycler, Foster city, CA, USA, starting with 2 μ L of cDNA and using the Taqman Universal PCR Master Mix. The expression levels were determined using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. For data normalization, we determined the expression of small nucleolar RNA, C/D box 44 (RNU44), and U6B small nuclear RNA (RNU6B) for the miRNAs, and that of human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) for the mRNAs, as endogenous controls. The details of the probes used and the assay conditions are reported in Supplementary Figure S1.

2.4. Selection of Candidate Genes

Genes reported in the literature as validated targets in TGCT and some other pathologies were considered. We also evaluated the failing of 3'-untranslated-region (3'UTR) recognition of the gene by the seed region of at least one of the miRNAs analyzed by using the microRNA target prediction database (miRDB) [17] and TargetScanHuman [18]. Then, for the selected genes, differential expression graphs between TGCT and control samples, as well as between the different histological types and stages of TGCT, were obtained

from the Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA2) web server [19] and the University of Alabama at Birmingham Cancer Data Analysis (UALCAN) Portal [20].

2.5. Bioinformatic Analysis

The gene expression datasets GSE65026 and GSE25518, annotated in the Array Express platform from the microarray Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0, were reviewed. The datasets included control tissues and TGCT gene expression data from pure seminoma, teratoma, embryonal carcinoma, and yolk sac tumor cell lines. These data were processed using the Transcriptome Analysis Console (TAC) software, version 4.0, of Applied Biosystems™, in order to obtain the profiles of differentially expressed transcripts (DETs) based on a fold change of <-2 or >2 . At all times, values of $p \leq 0.05$ were considered as indicating significant results. From this profile, we selected the possible common transcripts downregulated by the 4 miRNAs in TGCT. For this, we compared our results with the data annotated in miRtarbase [17] and TargetScanHuman [18]. Then, this last profile was submitted to functional enrichment analysis with Gene Ontology (GO) [21] and the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) [22] using the R package (version 1.22.0). If there were more than 10 GO annotation and pathway enrichments, only the top 10 terms with adj. $p < 0.05$ were extracted. Finally, differential expression graphs for TGCT and control samples, as well as for the different histological types and stages of TGCT from GEPIA2 [19] and UALCAN [20], were obtained, in order to select other possible candidate genes.

2.6. Statistical Analysis

The normal distribution of the expression data between groups was verified using the Shapiro–Wilk test. Following this, a comparison was performed using a nonparametric median comparison test, and the size of the effect was expressed through the d value and its corresponding confidence intervals at 95% in IBM SPSS Statistics for Windows, version 21.0. (IBM Corp., Armonk, NY, USA), and GraphPad Prism 8 was used to represent the data in box-and-whisker plots. At all times, values of $p \leq 0.05$ were considered significant.

3. Results

3.1. Histological and Immunohistochemical Analysis

The clinical and/or pathological characteristics of the samples, as well as the histological interpretation of the data, are shown in Table 1. For the control group, we identified a normal histology (cell types according to age) in the samples from infant-age individuals; the samples from pubertal individuals and/or adults presented normal spermatogenesis, except for one of them which showed hypo-spermatogenesis (all germ cell stages present, including spermatozoa, but we observed a clear decline in the number of germ cells), as shown in Table 1A. For the CO group, four samples presented normal histology according to patient age, seven presented tubular atrophy (smaller seminiferous tubes with few cells inside), and only one presented maturation arrest (incomplete spermatogenesis, not beyond the spermatocyte stage), as shown in Table 1B. Regarding the TGCT group, histological alterations typical of testicular neoplasia were identified (large, poorly differentiated, multinucleated cells, with prominent nucleoli, clear cytoplasm, lesions in the adjacent parenchyma, poorly defined lobules, necrosis, and in the case of teratoma, mature or immature cells with components of different types of tissue), evidencing various pure and mixed tumor histological types, as shown in Table 1C.

For immunohistochemical analysis of the POU5F1, PLAP, and KIT proteins, no immune-positive cells were observed in the control samples, while they were observed in the TGCT samples, as shown in Table 2. For the CO group, even when some histological alterations were observed, as shown in Figure 1, only 16.7% (2/12) showed immune-positive cells to these proteins, as shown in Table 2 and Figure 1D–F. Therefore, for the CO group, a distinction was made between samples with immune-positive cells (CO+) and those without immune-positive cells (CO−).

Table 1. Clinical, histological, and pathological characteristics of the samples. (A) Control group. (B) CO group. (C) TGCT group. nsTGCT, non-seminomatous testicular germ-cell tumor, sTGCT, seminomatous testicular germ-cell tumor, S, seminoma, T, teratoma, YS, yolk-sack tumor, CH, choriocarcinoma, CO, cryptorchidism, TGCT, testicular germ-cell tumors.

| (A) Control group | | | | |
|-------------------|----------|------------------------|---------------|-------------------|
| Case | Age | Histology | | |
| Control 1 | 17 years | Normal spermatogenesis | | |
| Control 2 | 8 years | Normal for age | | |
| Control 3 | 39 years | Normal spermatogenesis | | |
| Control 4 | 17 years | Normal spermatogenesis | | |
| Control 5 | 17 years | Hypospermatogenesis | | |
| Control 6 | 18 years | Normal spermatogenesis | | |
| Control 7 | 18 years | Normal spermatogenesis | | |
| Control 8 | 18 years | Normal spermatogenesis | | |
| Control 9 | 22 years | Normal spermatogenesis | | |
| Control 10 | 4 years | Normal for age | | |
| Control 11 | 1 year | Normal for age | | |
| Control 12 | 14 years | Normal spermatogenesis | | |
| (B) CO group | | | | |
| Case | Age | Personal history of CO | CO laterality | Histology |
| CO 1 | 1 year | Non-syndromic | Bilateral | Normal for age |
| CO 2 | 2 years | Non-syndromic | Right | Tubular atrophy |
| CO 3 | 1 years | Non-syndromic | Left | Normal for age |
| CO 4 | 12 years | Non-syndromic | Bilateral | Maturation arrest |
| CO 5 | 1 years | Non-syndromic | Bilateral | Tubular atrophy |
| CO 6 | 15 years | Non-syndromic | Right | Tubular atrophy |
| CO 7 | 1 year | Non-syndromic | Left | Normal for age |
| CO 8 | 4 years | Non-syndromic | Left | Normal for age |
| CO 9 | 10 years | Non-syndromic | Bilateral | Tubular atrophy |
| CO 10 | 5 years | Non-syndromic | Left | Tubular atrophy |
| CO 11 | 1 year | Non-syndromic | Left | Tubular atrophy |
| CO 12 | 8 years | Non-syndromic | Bilateral | Tubular atrophy |

Table 1. Cont.

| (C) TGCT group | | | | | | | | |
|----------------|----------|-----------|------------|-----------------|----------------|-----------------|------------------------|---------------|
| Case | Age | Diagnosis | Histology | TGCT laterality | Clinical stage | Metastasis | Personal history of CO | CO laterality |
| TGCT 1 | 49 years | nsTGCT | T | Right | II | No | Non-syndromic | Bilateral |
| TGCT 2 | 27 years | sTGCT | S | Right | I | No | Non-syndromic | Bilateral |
| TGCT 3 | 17 years | nsTGCT | T | Left | II | Pelvis | Non-syndromic | Bilateral |
| TGCT 4 | 19 years | nsTGCT | YS + CH | Left | II | Retroperitoneum | Non-syndromic | Left |
| TGCT 5 | 16 years | nsTGCT | T | Right | I | No | Non-syndromic | Bilateral |
| TGCT 6 | 22 years | sTGCT | S | Left | II | Retroperitoneum | Non-syndromic | Left |
| TGCT 7 | 22 years | nsTGCT | S + T | Bilateral | II | No | Non-syndromic | Bilateral |
| TGCT 8 | 16 years | nsTGCT | S + T + CH | Right | II | Retroperitoneum | Non-syndromic | Bilateral |
| TGCT 9 | 23 years | nsTGCT | T | Right | IV | Lung | Non-syndromic | Right |
| TGCT 10 | 27 years | nsTGCT | T | Left | II | Retroperitoneum | Non-syndromic | Left |
| TGCT 11 | 18 years | sTGCT | S | Right | I | No | Non-syndromic | Right |
| TGCT 12 | 24 years | nsTGCT | S + T | Right | I | No | Non-syndromic | Right |

Table 2. Immunopositivity to POU5F1, PLAP, and KIT proteins in the samples.

| Sample | Control | | | CO | | | TGCT | | |
|--------|---------|------|-----|--------|------|-----|--------|------|-----|
| | POU5F1 | PLAP | KIT | POU5F1 | PLAP | KIT | POU5F1 | PLAP | KIT |
| 1 | – | – | – | – | – | – | + | – | – |
| 2 | – | – | – | – | – | – | + | + | + |
| 3 | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| 4 | – | – | – | – | – | – | – | + | + |
| 5 | – | – | – | + | + | + | – | – | – |
| 6 | – | – | – | + | + | + | + | + | + |
| 7 | – | – | – | – | – | – | + | + | + |
| 8 | – | – | – | – | – | – | + | + | + |
| 9 | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| 10 | – | – | – | – | – | – | + | – | – |
| 11 | – | – | – | – | – | – | + | + | + |
| 12 | – | – | – | – | – | – | + | + | + |

+, immuno-positive, –, not immuno-positive, CO, cryptorchidism, TGCT, testicular germ cell tumors.

3.2. Relative Expression of the hsa-miR-371-373 Cluster and hsa-miR-367

Regardless of the calibrator used in relative expression determination (RNU44 and RNU6B), consistent behavior was shown, as shown in Figure 2. Therefore, we decided to report only the results normalized according to RNU6B expression. For the TGCT group, the four miRNAs were significantly overexpressed compared with the control and CO samples, as shown in Figure 3A,C,E,G. In contrast, the CO group presented expression levels similar to those of the control group for hsa-miR-371 and hsa-miR-373, as shown in Figure 3A,E. For hsa-miR-372, the CO group presented significantly lower expression levels compared with the other groups, as shown in Figure 3C. Finally, for hsa-miR-367, there were no significant differences in expression levels between the CO and the control groups; however, a tendency to slightly higher values was observed in the CO group, similar to what was observed for the TGCT group, as shown in Figure 3G. However, when

the CO samples were divided into a subgroup without immune-positive cells (CO⁻) and a subgroup with immune-positive cells (CO⁺) to POU5F1, PLAP, and KIT, the latter showed slightly higher expression levels for the four miRNAs, similar to what was observed for the TGCT group, as shown in Figure 3B,D,E,H. It should be noted that no significant differences were found when comparing the expression of the miRNAs in relation to clinical or pathological characteristics, as shown in Figure 4.

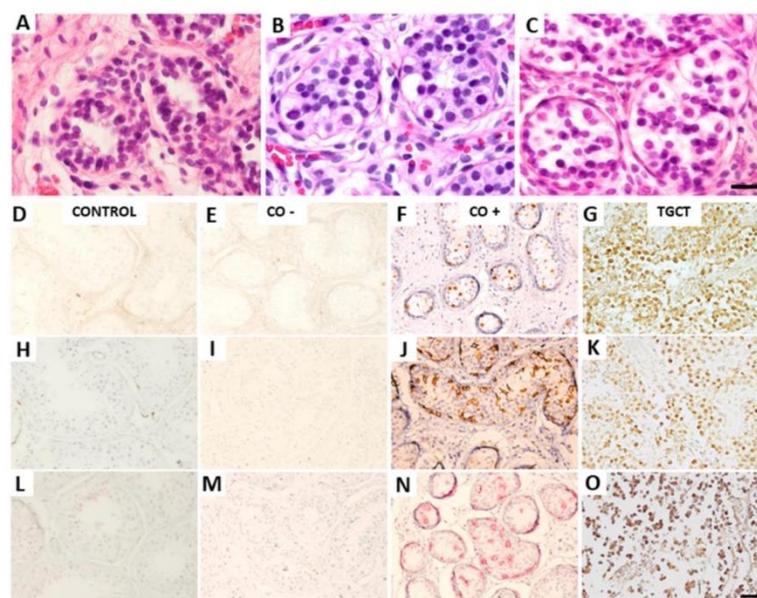


Figure 1. Histological and immunohistochemical analysis. A representative histological comparison among three samples from the CO group after H/E staining is shown at the top. (A) Sample CO 9, corresponding to a 10-year-old patient with tubular atrophy. (B) Sample CO 4, corresponding to a 12-year-old patient with maturation arrest. (C) Sample CO 6, corresponding to 15-year-old patient with tubular atrophy. A representative immunohistochemical comparison of (D–G) POU5F1, (H–K) KIT, and (L–O) PLAP expression is shown at the bottom. From left to right: a sample from Control 1, corresponding to a 17-year-old control individual without immune-positive cells to the antibodies. Sample CO 4, corresponding to a 12-year-old CO patient without immune-positive cells. Sample CO 6, corresponding to a 15-year-old CO patient with immune-positive cells. Sample TGCT 7, corresponding to a 22-year-old TGCT patient with immune-positive cells. CO, cryptorchidism, CO⁻, CO sample without immune-positive cells, CO⁺, CO sample with immune-positive cells, TGCT, testicular germ-cell tumors. Calibration bar, 50 μ m.

3.3. Relative Expression of *LATS2*, *PTEN*, and *IGF1R*

According to the established parameters, we selected the genes *LATS2*, *PTEN*, and *IGF1R* as validated targets of the hsa-miR-371-373 cluster and hsa-miR-367, as shown in Figure 5. In general, the TGCT group showed the lowest expression levels of the three genes analyzed. When comparing the control group to the TGCT group, significant differences were only shown for *LATS2*, as shown in Figure 6A,C,E. Regarding the CO group, it presented significant differences with respect to the control group for the expression of *LATS2*, as shown in Figure 6A. In addition, the CO group presented high expression of *PTEN* and *IGF1R*, which was significantly different when compared with the expression in the TGCT group, as shown in Figure 6C,E. However, when the CO group was divided

into the CO⁻ and CO⁺ subgroups, the latter showed a decrease in *LATS2* and *IGF1R* expression levels, with values similar to those observed for the TGCT group, as shown in Figure 6B,D,F. It should be noted that no significant differences were found when comparing the expressions of *LATS2*, *PTEN*, and *IGF1R* in relation to clinical or pathological characteristics, as shown in Figure 4.

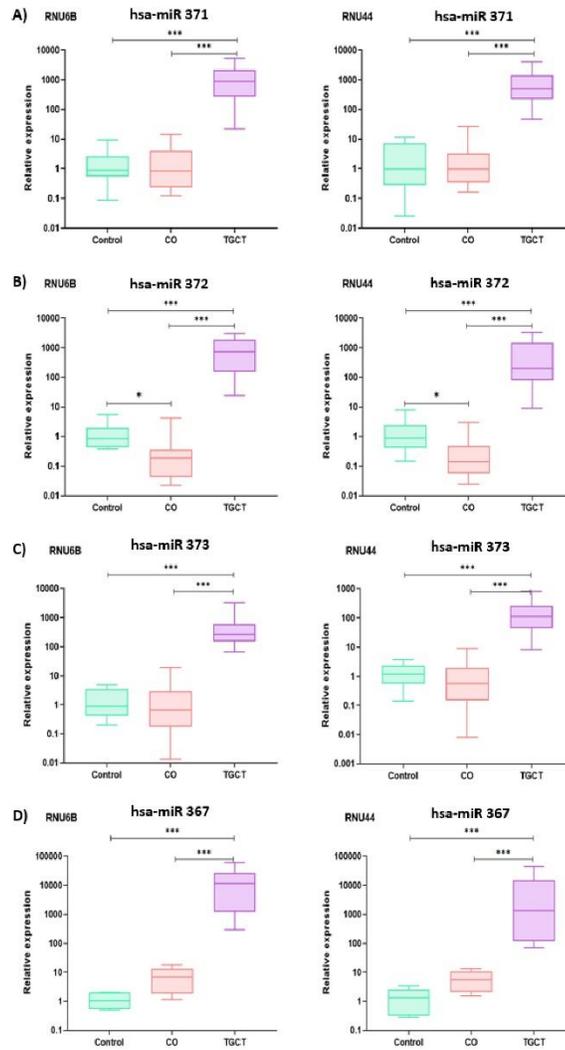


Figure 2. Relative expression graphs of the hsa-miR-371-373 cluster and hsa-miR-367. (A) For hsa-miR-371, similar *p* values were observed for both RNU6B and RNU44 (CO vs. control, *p* = ns, CO vs. TGCT, *p* < 0.000, and control vs. TGCT, *p* < 0.000). (B) For hsa-miR-372, the following *p* values were

observed for RNU6B: CO vs. control, $p = 0.05$, CO vs. TGCT, $p < 0.000$, and control vs. TGCT, $p < 0.000$. For RNU44, we obtained CO vs. control $p = 0.01$, CO vs. TGCT, $p < 0.000$, and control vs. TGCT, $p < 0.000$. (C) For hsa-miR-373, similar p values were observed for both RNU6B and RNU44 (CO vs. control, $p = 1.0$, CO vs. TGCT, $p < 0.000$, and control vs. TGCT, $p < 0.000$). (D) For hsa-miR-367, the following p values were observed for RNU6B: CO vs. control, $p = 0.08$, CO vs. TGCT, $p < 0.000$, and control vs. TGCT, $p = 0.003$. For RNU44, we obtained: CO vs. control, $p = 0.13$, CO vs. TGCT, $p < 0.000$, and control vs. TGCT, $p < 0.000$. CO, cryptorchidism, TGCT, testicular germ-cell tumors, ns, not significant, *, $p < 0.05$, **, $p < 0.001$.

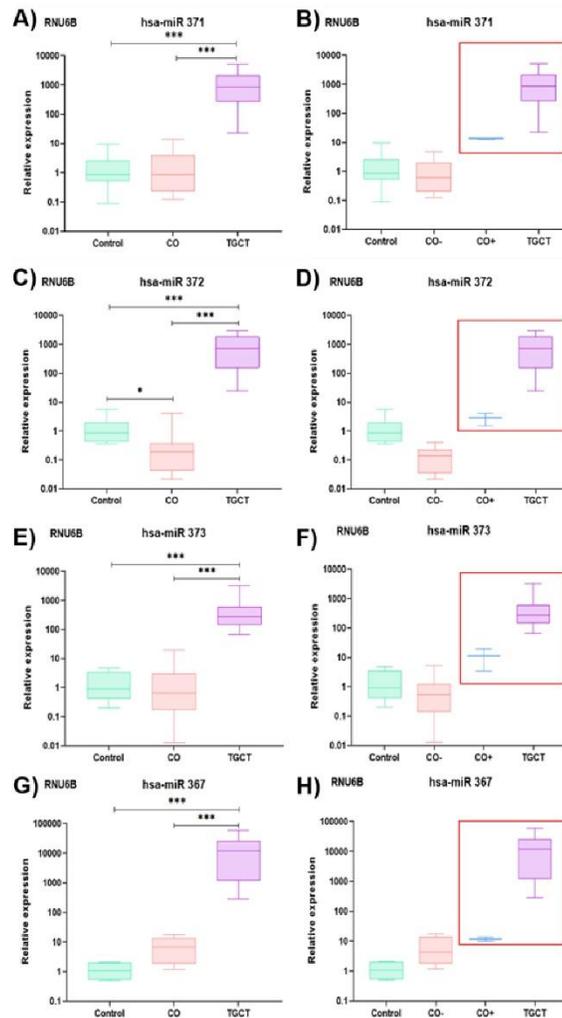


Figure 3. Relative expression graphs of the hsa-miR-371-373 cluster and hsa-miR-367. (A) For hsa-miR-371, the following p values were observed: CO vs. control, $p = ns$ and d of -1.1 (95% confidence

interval -5.02 to 2.77), CO vs. TGCT, $p < 0.000$ and d of -1156.61 (95% confidence interval -2082.35 to -230.88), and control vs. TGCT, $p < 0.000$ and d of -1157.74 (95% confidence interval -2243.63 to -71.85); (B) corresponding relative expression comparison between the CO- and CO+ subgroups; (C) the p values for hsa-miR-372 were: CO vs. control, $p = 0.05$ and d of 0.90 (95% confidence interval -0.39 to 2.21), CO vs. TGCT, $p < 0.000$ and d of -913.16 (95% confidence interval -1526.41 to -299.92), and control vs. TGCT, $p < 0.000$ and d of -912.25 (95% confidence interval -1631.59 to -192.92); (D) corresponding relative expression comparison between the CO- and CO+ subgroups; (E) p values for hsa-miR-373: CO vs. control, $p = ns$ and d of -1.01 (95% confidence interval -4.94 to 2.92), CO vs. TGCT, $p < 0.000$ and d of -471.29 (95% confidence interval -1008.03 to 65.44), and control vs. TGCT, $p < 0.000$ and d of -472.30 (95% confidence interval -1101.89 to 157.28); (F) corresponding relative expression comparison between the CO- and CO+ subgroups; (G) p values for hsa-miR-367: CO vs. control, $p = 0.08$ and d of -6.74 (95% confidence interval -11.83 to -1.65), CO vs. TGCT, $p < 0.000$ and d of $-14,243.28$ (95% confidence interval $-25,635.86$ to -2850.70), and control vs. TGCT, $p = 0.003$ and d of $-14,250.03$ (95% confidence interval $-29,609.78$ to 1109.70); (H) corresponding relative expression comparison between the CO- and CO+ subgroups. CO, cryptorchidism, CO-, CO sample without immune-positive cells, CO+, CO sample with immune-positive cells, TGCT, testicular germ-cell tumors, ns, not significant, *, $p < 0.05$, ***, $p < 0.001$.

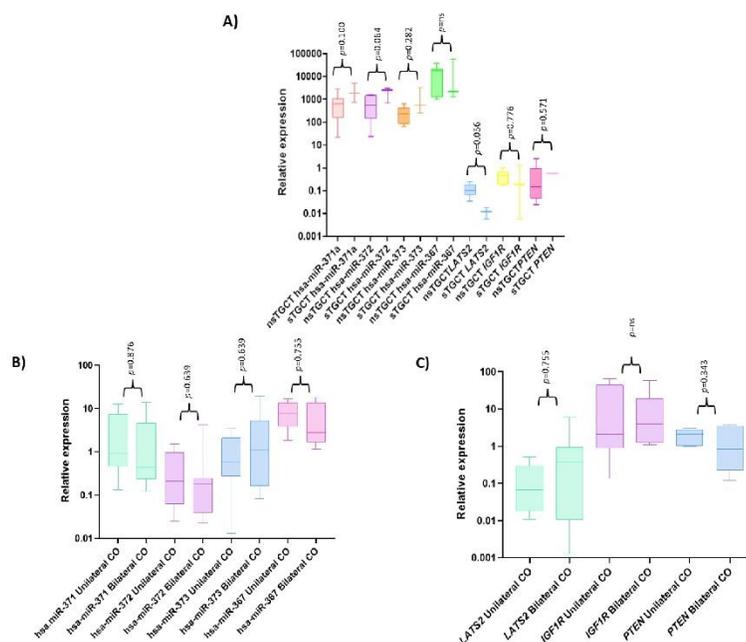


Figure 4. Relative expression graphs of the hsa-miR-371-373 cluster, hsa-miR-367, *LATS2*, *IGF1R*, and *PTEN* according to the samples' clinical and histological classifications. (A) Comparison of gene expression between samples classified as nsTGCT and sTGCT. (B) Comparison of the expression of the hsa-miR-371-373 cluster and hsa-miR-367 between samples classified as unilateral CO and bilateral CO. (C) Comparison of the expression of *LATS2*, *PTEN*, and *IGF1R* between samples classified as unilateral CO and bilateral CO. CO, cryptorchidism, nsTGCT, non-seminomatous testicular germ-cell tumor, sTGCT, seminomatous testicular germ-cell tumor, ns, not significant.

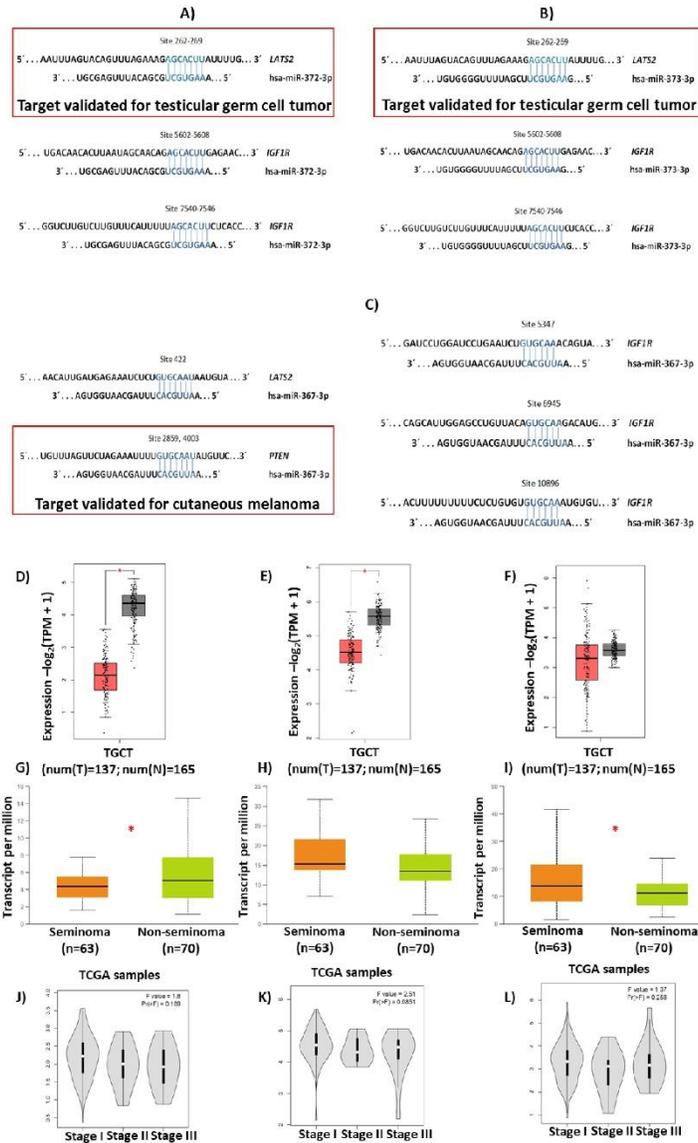


Figure 5. Selection of validated genes. Schematic illustrations of potential binding sites in the 3'-UTR of *LATS2*, *PTEN*, and *IGF1R* for (A) *hsa-miR-372*, (B) *hsa-miR-373*, and (C) *hsa-miR-367* are shown at the top. In all cases, the validated binding of any miRNA is shown in the red box. Expression of (D,G,J) *LATS2*, (E,H,K) *PTEN*, and (F,I,L) *IGF1R* in tumor tissue compared with healthy tissue, histological classification, and clinical stages of TGCT are shown at the bottom. TCGA, the Cancer Genome Atlas, TGCT, testicular germ-cell tumors, TPM, transcripts per million, *, $p < 0.001$.

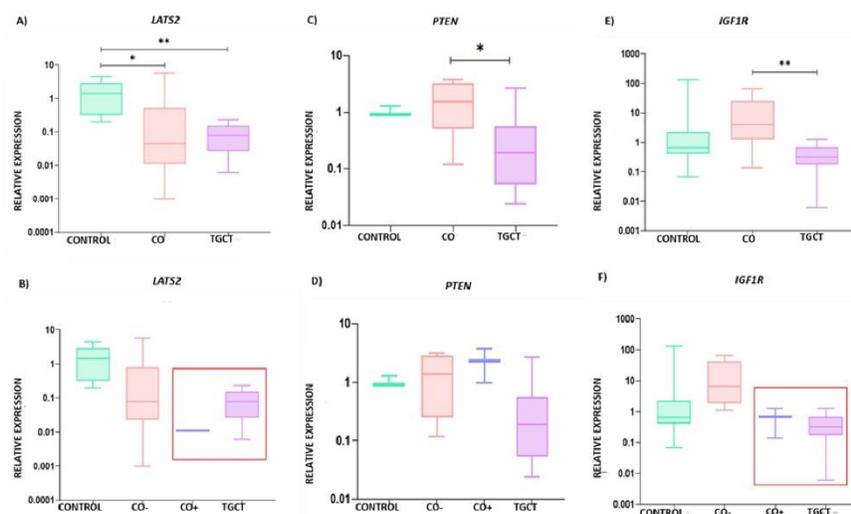


Figure 6. Relative expression graphs of *LATS2*, *PTEN*, e *IGF1R*. (A) For *LATS2*, the following *p* values were observed (CO vs. control, $p = 0.047$ and *d* of 0.91 (95% confidence interval -0.62 to 2.44), control vs. TGCT, $p < 0.000$ and *d* of 1.55 (95% confidence interval 0.47 to 2.63), and CO vs. TGCT, $p = \text{ns}$ and *d* of 0.64 (95% confidence interval -0.63 to 1.93)); (B) corresponding relative expression comparison between the CO $-$ and CO $+$ subgroups; (C) *p* values for *PTEN*: CO vs. control, $p = 1.0$ and *d* of -24.08 (95% confidence interval -57.01 to 8.82), control vs. TGCT, $p = 0.115$ and *d* of -2.01 (95% confidence interval -7.66 to 3.65), and CO vs. TGCT, $p = 0.038$ and *d* of 22.08 (95% confidence interval -2.68 to 46.85); (D) corresponding relative expression comparison between the CO $-$ and CO $+$ subgroups; (E) *p* values for *IGF1R*: CO vs. control, $p = 0.074$ and *d* of -0.76 (95% confidence interval -2.81 to 1.28), CO vs. TGCT, $p < 0.000$ and *d* of 1.20 (95% confidence interval -0.24 to 2.66), and control vs. TGCT, $p = \text{ns}$ and *d* of 0.44 (95% confidence interval -0.84 to 1.73); (F) corresponding relative expression comparison between the CO $-$ and CO $+$ subgroups. CO, cryptorchidism, CO $-$, CO sample without immune-positive cells, CO $+$, CO sample with immune-positive cells, TGCT, testicular germ-cell tumors, ns, not significant, *, $p < 0.05$, **, $p < 0.001$.

Due to the clear expression differences between the CO $-$ and CO $+$ subgroups, we decided to create a heat map with the values of relative expression (ΔCt), in order to show the similarities between the TGCT and the CO $+$ groups, as shown in Figure 7A. In general, the hsa-miR-371-373 cluster was overexpressed by at least three times in the CO $+$ subgroup compared with the CO $-$ subgroup, while hsa-miR-367 was overexpressed by 1.3 times in the CO $+$ subgroup compared with the CO $-$ subgroup. The *LATS2* and *IGF1R* genes were overexpressed by at least three times in the CO $+$ subgroup compared with the CO $-$ subgroup, as shown in Figure 7B.

3.4. Bioinformatic Analysis

Using the GEO datasets of the Array Express platform (GSE65026 and GSE25518), 12,858 DETs were visualized in TGCT, of which 7166 transcripts were overexpressed and 5692 transcripts were under-expressed, as shown in Figure 8. Ontological analysis was performed for the under-expressed transcripts, as shown in Figure 9A–D.

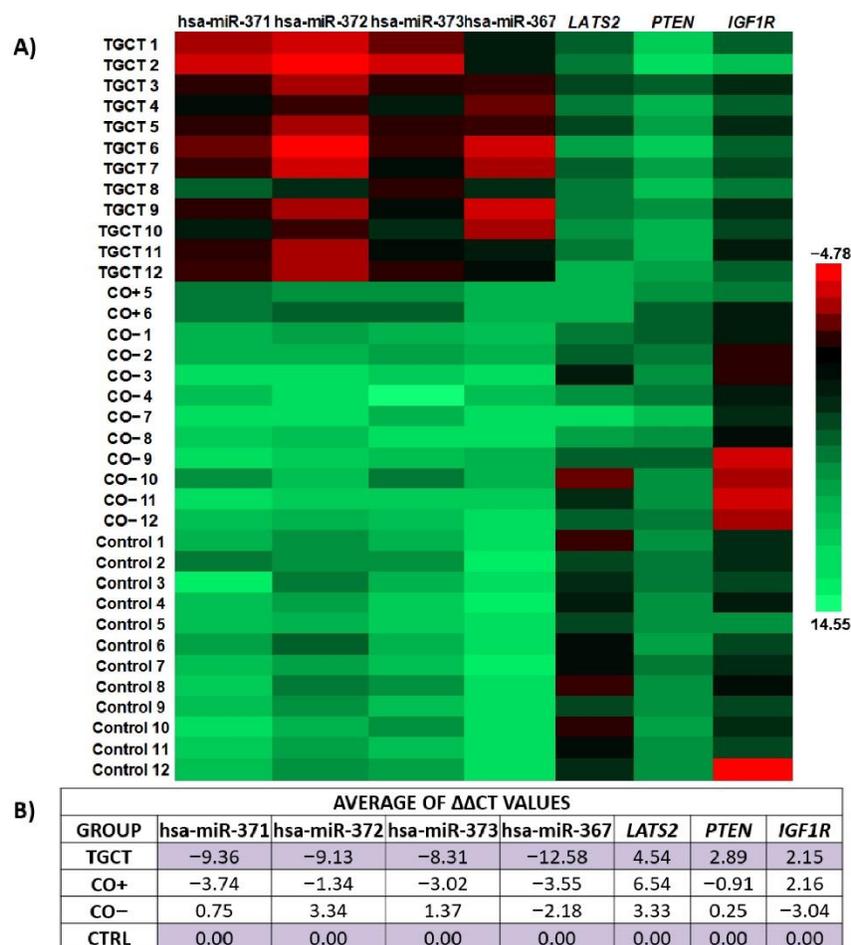


Figure 7. Gene expression levels. (A) A heat map is shown with the ΔC_t values for each included sample. The overexpressed genes are shown in red, and the sub-expressed genes are shown in green. The scale is displayed on the side of the heat map. (B) Table showing the expression means for each study group expressed in $\Delta\Delta C_t$. CO-, CO sample without immune-positive cells, CO+, CO sample with immune-positive cells, TGCT, testicular germ-cell tumors.

Then, from the under-expression profile, 143 transcripts possibly co-regulated by the hsa-miR-371-373 cluster and hsa-miR-367 were identified, as shown in Figure 10. Finally, among these 143 transcripts, we found differential expression of the AT-rich interaction domain 4B (*ARID4B*), polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 (*GALNT3*), and karyopherin subunit alpha 6 (*KPNA6*) genes in TGCT, as well as in different types of TGCT, as shown in Figure 11. This result supports the validity of our selection of candidate genes to be evaluated in conjunction with *LATS2* and *IGF1R* in a cell model in the future.

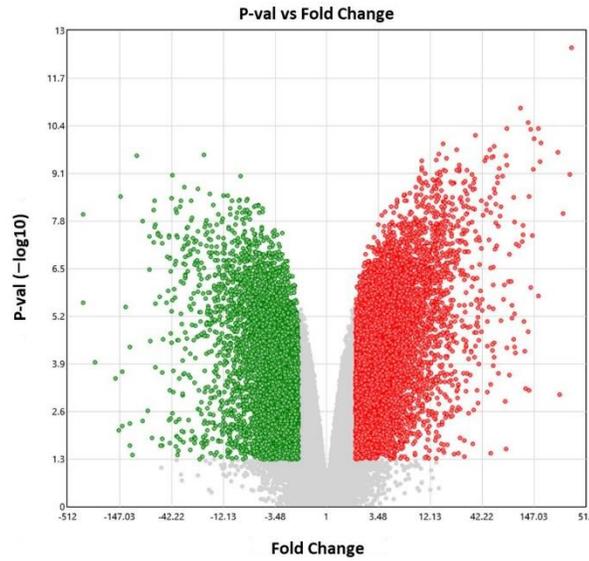


Figure 8. Expression analysis. Volcano plot showing DETs in TGCT. The overexpressed genes are indicated by red dots, while the under-expressed genes are indicated by green dots. DETs, differentially expressed transcripts, TGCT, testicular germ-cell tumors.

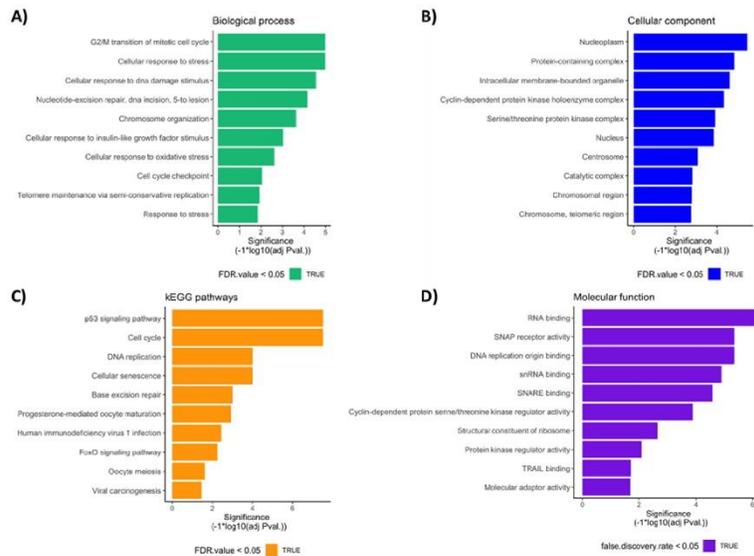


Figure 9. Ontological analysis performed for the under-expressed transcript profile. Bar graphs showing the most important (A) biological processes, (B) cellular components, (C) molecular functions, and (D) KEGG pathways associated with the under-expressed transcript profile. FDR value, false discovery rate value, KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.

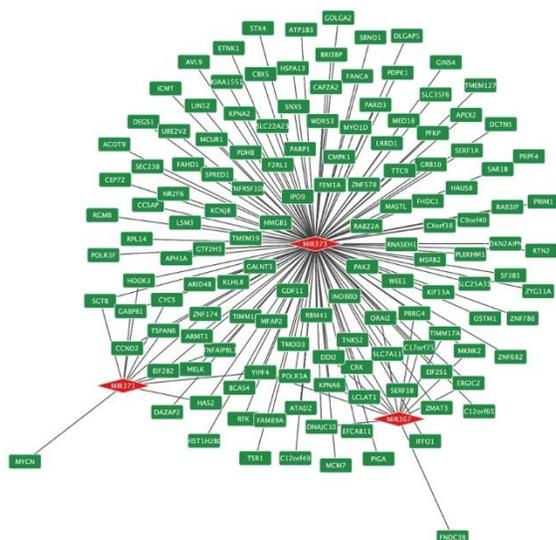


Figure 10. In silico prediction of possible genes co-regulated by the hsa-miR-371-373 cluster and hsa-miR-367. The 143 target genes are shown in green boxes, and the evaluated miRNAs are indicated by red diamonds.

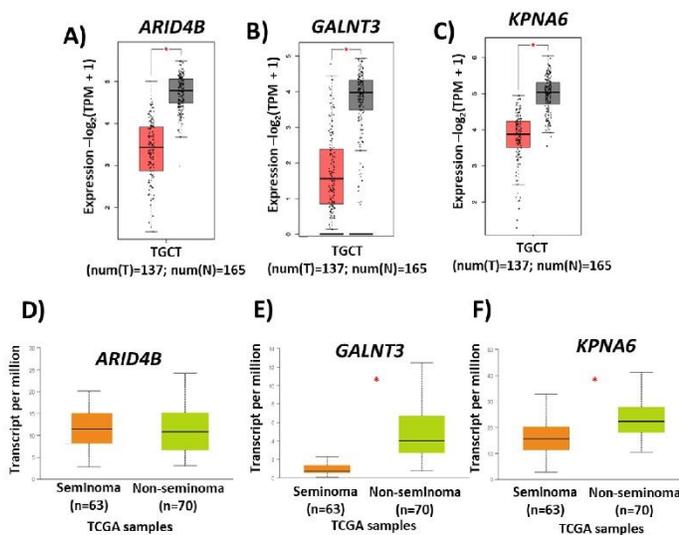


Figure 11. Candidate genes to be validated in the future. The figure shows candidate genes possibly co-regulated by the hsa-miR-371-373 cluster and hsa-miR-367 and differentially expressed in TGCT samples. Comparison of the expression of (A,D) *ARID4B*, (B,E) *GALNT3*, and (C,F) *KPNA6* between TGCT and normal tissue, as well as between seminoma and non-seminoma. TCGA, the Cancer Genome Atlas, TGCT, testicular germ-cell tumors, TPM, transcripts per million, *, $p < 0.001$.

4. Discussion

CO is the most frequent genitourinary anomaly in male newborns and is one of the most important risk factors for the development of TGCT [1,2]. Although there is a clinical relationship between the two pathologies, the molecular pathways that would suggest an association between the two conditions are unknown [11].

When we integrated our histological and IHC results, we identified tubular atrophy and cells immune-positive for the POU5F1, PLAP, and KIT proteins only in CO+5 (from a patient who was 1 year and 8 months old) and CO+6 (from a 15-year-old patient) samples. By itself, a histological determination is not enough to determine the risk of developing testicular neoplasia; therefore, determining histological parameters in conjunction with the expression of proteins associated with TGCT would allow a comprehensive view of the cell transformation process [23].

In the control and TGCT samples, the expression levels of the hsa-miR-371-373 cluster and hsa-miR-367 were found to be consistent with those described by other authors, even when originating from TGCT patients with a history of CO. The overexpression of these miRNAs was described in serum and tissue samples from patients with TGCT, while they are expressed at basal levels in healthy individuals or in patients' adjacent testicular tissue [12,15]. In our study, the expression pattern of hsa-miR-371 and hsa-miR-373 in the CO group was similar to that in the control group and showed significant differences only in comparison with that in the TGCT group. hsa-miR-371 is considered the most sensitive and specific miRNA to identify TGCT [14]. This miRNA shows greater diagnostic precision, and its increased expression was associated with relapses and the presentation of metastases, differently from hsa-miR-372, hsa-miR-373 and hsa-miR-367 [24]. Regarding hsa-miR-373, its overexpression was reported during development and in undifferentiated cells [25].

Regarding hsa-miR-372, patients with CO presented a significantly lower expression compared with those with TGCT and the control group. As mentioned above, hsa-miR-372 shares functions with hsa-miR-373 at the testicular level, being expressed in embryonic stem cells and mediating pluripotent capacity in stem cells [26]. Finally, hsa-miR-367 showed intermediate expression in the CO samples with respect to the TGCT and control samples. hsa-miR-367 is part of a cluster that includes hsa-miR-302 and regulates proliferation, differentiation, and the maintenance of pluripotency in embryonic stem cells [27]. Many authors reported the overexpression of hsa-miR-367 in TGCT [12,14]. However, this has not been described in CO.

Interestingly, when evaluating the expression of the four miRNAs in the CO− and CO+ subgroups, we observed that the CO+ subgroup overexpressed them compared with the CO− subgroup and the control group, similar to what was shown for the TGCT group. This finding corroborates the hypothesis that, despite the histological resemblance among CO patients, some of them express characteristic markers of TGCT [28]. In summary, our data showed that the tissues from two CO patients (with CO being a risk factor for the development of TGCT) overexpressed these four miRNAs, similar to what was previously described for hsa-miR-371 in GCNIS samples [29]. In contrast, a recent study identified under-expression of the hsa-miR-371-373 cluster in three patients with CO [30], a result in contrast with ours, possibly due to the low number of patients included in the cited study. Therefore, our results highlight the need to determine the expression of these miRNAs in a larger cohort of patients, with the intention of identifying those CO patients who are at high risk of developing TGCT, as has been proposed in other studies [31,32].

Regarding the relative expression of the *LATS2*, *PTEN*, and *IGF1R* genes, the TGCT group showed low levels of expression, as expected [33–35]. Interestingly, we found a significant under-expression of *LATS2* in the CO group compared with the control group, similar to what was observed in the TGCT group. So far, no reports have been published on the expression of the *LATS2* gene in CO. It was reported that the overexpression of hsa-miR-372 and hsa-miR-373 in TGCT was associated with a reduced expression of the *LATS2* protein. In turn, it was shown that the under-expression of *LATS2* induced a high

expression of CDK2, promoting the transition of cancer cells from the G1 to the S phase of the cell cycle [36]. Therefore, it is proposed that this regulation could occur in patients with CO at risk of developing a testicular malignancy.

Regarding *PTEN* and *IGF1R*, these genes were overexpressed in the CO group, with a significant difference with respect to the TGCT group. To date, there are no reports on the expression of these two genes in CO. In melanoma, hsa-miR-367 inhibits the expression of the *PTEN* gene, increasing the growth and invasion of cancer cells, while, in hepatocarcinoma, hsa-miR-371 inhibits *PTEN* gene expression, promoting the proliferation and metastasis of cancer cells [37,38]. This gene is under-expressed in seminoma, embryonal carcinoma, and teratoma [34]. Low levels of *PTEN* were also related to DNA damage repair and the maintenance of genomic integrity [39]. However, based on our results, we did not observe a clear relationship between this gene and the evaluated miRNAs in the CO patients, evidencing that CO patients positive for malignancy markers do not present alterations in this regulatory pathway. In the case of *IGF1R*, differences in gene expression between seminomatous and non-seminomatous TGCT were described [40], and, through our *in silico* analyses, we identified it as a gene possibly regulated by hsa-miR-372-373 and hsa-miR-367; however, there are no reports that validate the regulation of this gene by the aforementioned miRNAs. *IGF1R* participates in the development of the cremaster muscle, testicular descent, adrenogenital development, and testicular maturation, as well as in the proliferation, cell survival, and differentiation of Sertoli cells and germ cells [41]. Therefore, dysfunction in the processes regulated by this gene could equally be present in CO patients at risk of TGCT development.

Once again, when comparing the expression of the three mentioned genes between the CO− and CO+ subgroups, we observed that the CO+ subgroup under-expressed the *LATS2* and *IGF1R* genes, similar to what was shown for the TGCT group compared with the CO− subgroup and the control group. Therefore, we do not rule out the existence of possible regulatory pathways involving both genes.

When performing a global summary of the results obtained for the CO+ subgroup (2/12), we observed overexpression of the hsa-miR-371-373 cluster as well as of hsa-miR-367 and under-expression of *LATS2* and *IGF1R*. Previously, it was reported that 5.7% of patients with CO express the proteins POU5F1, PLAP, SALL4, AP2γ, and KIT, which are associated with the risk of developing GCNIS, the precursor lesion of TGCT [6,23,28]. This is consistent with our results, indicating that 16.7% of the CO patients had these characteristics. In addition, it was shown that, both in gonocytes and in TGCT, the hsa-miR-302-367 clusters are regulated by transcription factors such as POU5F1, NANOG, and SOX2 [42] and that they are co-expressed with proliferation-associated proteins such as KIT and even specific proteins of germ cells such as PLAP [6].

Finally, the *in silico* analysis of expression we carried out allowed us to identify *ARID4B*, which acts as a coactivator of the androgen receptor and is expressed in Sertoli cells, which participate in the development of germ cells and in the formation of the blood–testicular barrier [43,44]; *GALNT3*, which is overexpressed in spermatocytes and spermatids from healthy individuals and has been described in testicular microlithiasis [45,46] (it is pertinent to reiterate that testicular microlithiasis, by itself, does not represent a malignant condition, but when associated with other conditions as CO, can be considered a risk factor for the development of TGCT [47]); and *KPNA6*, which is expressed in the testicle and, when its expression is inhibited, affects spermatogenesis, causing infertility [48] as other possible miRNA target genes, susceptible to future evaluation together with the hsa-miR-371-373 cluster, hsa-miR-367, *LATS2* and *IGF1R*. Integrating a systemic phenomics approach will allow us to study these genetic markers in a comprehensive manner, complementing these data with more samples from clinical files and *in vivo* or *in vitro* assays, and even including some other biochemical determinations to deepen their suitability as diagnostic markers [49].

This is the first preliminary report that describes how the testicular tissues from two CO patients with cells immune-positive to POU5F1, PLAP, and KIT overexpressed the

hsa-miR-371-373 cluster and hsa-miR-367 and under-expressed the *LATS2* and *IGF1R* genes, similar to what was observed in TGCT tissues. We must state that our study shows results of a preliminary nature, and, thus, it has several limitations that must also be considered in relation to future works. Undoubtedly, the main limitation is the feasibility of obtaining testicular tissue from CO patients, since routinely taking testicular biopsies is not indicated in clinical practice. For this reason, not many studies analyzed this type of sample with the intention of identifying molecular markers related to TGCT. The accessibility of these archival samples is limited, which had a direct impact on the number of expression assays we carried out. Therefore, in the future it would be important to determine the expression of the *ARID4B*, *GALNT3*, and *KPNA6* genes, which could not be done in this study. Another limitation derived from the little amount of tissue available was our insufficient ability to determine gene expression in situ after microdissection of the gonocytes from these tissues. Being able to make this determination will be necessary to corroborate the hypothesis that these markers are exclusively expressed in the gonocytes, which would support the theory according to which the gonocytes are the target of malignancy mechanisms leading to the development of TGCT in CO patients. Taking these weaknesses into account, we think that, in the future, it will be important to replicate the present study with a larger cohort of patients, since at the moment our preliminary study included only 12 samples from CO patients. In addition, it will be necessary to evaluate in a cell model whether the *IGF1R*, *ARID4B*, *GALNT3*, and *KPNA6* genes are indeed targets of the examined miRNAs. We believe that, if these results are confirmed, the determination of the expression of these miRNAs could be very useful in clinical practice in the future; specifically, it would help to distinguish those pediatric CO patients with a higher risk of developing TGCT in adulthood. However, due to the nature of our results, this statement is speculative.

5. Conclusions

This is the first report that, through genetic expression data, supports the theory according to which gonocytes are a target of malignancy processes leading to the development of TGCT in pediatric CO patients. However, it should be noted that these results are preliminary and need to be validated in a larger cohort of patients.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/diagnostics13183020/s1>, Figure S1: RT-qPCR conditions. General conditions of RT-qPCR assays. (A) microRNA probes evaluated in our study. (B) mRNA probes evaluated in our study. (C) RT-PCR conditions used in our study. (D) qPCR conditions used in our study.

Author Contributions: D.A.L.-H. and R.M.V.-V. contributed to conception and design. F.G.-A., M.D.C.-S. and I.U.B.-O. contributed to the development of the methodology. F.G.-A., R.M.V.-V., D.A.L.-H., M.D.C.-S., J.C.R.-C., E.A.-O. and M.F.-F. performed the analysis and interpreted the data. F.G.-A., R.M.V.-V., D.A.L.-H., I.U.B.-O., J.C.R.-C., E.A.-O., J.D.-C., M.F.-F. and L.A.H. contributed to the writing and review of the manuscript. R.M.V.-V., D.A.L.-H., J.D.-C. and L.A.H. provided administrative, technical, or material support. R.M.V.-V., D.A.L.-H. and F.G.-A. contributed to study supervision. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The Project “INP: 063/2018” was supported by the Program of Fondo Federal of Secretaría de Salud.

Institutional Review Board Statement: The ethics committee and the research committee of INCAN approved the study protocol (012/031/ICI) and (CE1/783/12).

Informed Consent Statement: The research followed the tenets of the Helsinki Declaration based on approval by the hospital’s institutional review board and was conducted after obtaining the subjects’ informed consent in accordance with institutional guidelines.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors thank CONAHCYT for the doctoral scholarship awarded to F.G.-A. (No. 637704). F.G.-A. submitted this article as part of the study plan requirements for the Posgrado en Biología Experimental de Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. We also thank the technician Pedro Medina Granados for his invaluable support in the processing of paraffin-embedded samples.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Elamo, H.P.; Virtanen, H.E.; Toppari, J. Genetics of cryptorchidism and testicular regression. *Best Pr. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2022**, *36*, 101619. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Rodprasert, W.; Virtanen, H.E.; Mäkelä, J.-A.; Toppari, J. Hypogonadism and Cryptorchidism. *Front. Endocrinol.* **2020**, *10*, 906. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Skakkebaek, N.E.; Berthelsen, J.G.; Giwercman, A.; Müller, J. Carcinoma-in-situ of the testis: Possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma. *Int. J. Androl.* **1987**, *10*, 19–28. [[CrossRef](#)]
- Oosterhuis, J.W.; Looijenga, L.H.J. Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 210–222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gillis, A.J.M.; Stoop, H.; Biermann, K.; van Gurp, R.J.H.L.M.; Swartzman, E.; Cribbes, S.; Ferlinz, A.; Shannon, M.; Oosterhuis, J.; Looijenga, L.H.J. Expression and interdependencies of pluripotency factors LIN28, OCT3/4, NANOG and SOX2 in human testicular germ cells and tumours of the testis. *Int. J. Androl.* **2011**, *34*, e160–e174. [[CrossRef](#)]
- Vigueras-Villaseñor, R.M.; Cortés-Trujillo, L.; Chávez-Saldaña, M.; Vázquez, F.G.; Carrasco-Daza, D.; Cuevas-Alpuche, O.; Rojas-Castañeda, J.C. Analysis of POU5F1, c-Kit, PLAP, AP2γ and SALL4 in gonocytes of patients with cryptorchidism. *Acta Histochem.* **2015**, *117*, 752–761. [[CrossRef](#)]
- Tien, M.Y.; Abeydeera, S.A.; Cho, H.-J.; Sarila, G.; Catubig, A.; Burton, E.; Hutson, J.; Li, R. Does the apoptosis pathway play a critical role in gonocyte transformation? *J. Pediatr. Surg.* **2020**, *55*, 1947–1951. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hutson, J.M.; Li, R.; Southwell, B.R.; Petersen, B.L.; Thorup, J.; Cortes, D. Germ cell development in the postnatal testis: The key to prevent malignancy in cryptorchidism? *Front. Endocrinol.* **2013**, *3*, 176. [[CrossRef](#)]
- Novotny, G.W.; Belling, K.C.; Bramsen, J.B.; E Nielsen, J.; Bork-Jensen, J.; Almstrup, K.; Sonne, S.B.; Kjems, J.; Meyts, E.R.-D.; Leffers, H. MicroRNA expression profiling of carcinoma in situ cells of the testis. *Endocrine-Related Cancer* **2012**, *19*, 365–379. [[CrossRef](#)]
- Radtke, A.; Cremers, J.-F.; Kliesch, S.; Riek, S.; Junker, K.; Mohamed, S.A.; Anheuser, P.; Belge, G.; Dieckmann, K.-P. Can germ cell neoplasia in situ be diagnosed by measuring serum levels of microRNA371a-3p? *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2017**, *143*, 2383–2392. [[CrossRef](#)]
- García-Andrade, F.; Vigueras-Villaseñor, R.M.; Chávez-Saldaña, M.D.; Rojas-Castañeda, J.C.; Bahena-Ocampo, I.U.; Aréchaga-Ocampo, E.; Díaz-Chávez, J.; Landero-Huerta, D.A. The Role of microRNAs in the Gonocyte Theory as Target of Malignancy: Looking for Potential Diagnostic Biomarkers. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 10526. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gillis, A.J.; Rijlaarsdam, M.A.; Eini, R.; Dorsers, L.C.; Biermann, K.; Murray, M.J.; Nicholson, J.C.; Coleman, N.; Dieckmann, K.-P.; Belge, G.; et al. Targeted serum miRNA (TSmiR) test for diagnosis and follow-up of (testicular) germ cell cancer patients: A proof of principle. *Mol. Oncol.* **2013**, *7*, 1083–1092. [[CrossRef](#)]
- Regouc, M.; Belge, G.; Lorch, A.; Dieckmann, K.-P.; Pichler, M. Non-Coding microRNAs as Novel Potential Tumor Markers in Testicular Cancer. *Cancers* **2020**, *12*, 749. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- van Agthoven, T.; Looijenga, L.H. Accurate primary germ cell cancer diagnosis using serum based microRNA detection (ampTSmiR test). *Oncotarget* **2016**, *8*, 58037–58049. [[CrossRef](#)]
- Palmer, R.D.; Murray, M.J.; Saini, H.K.; van Dongen, S.; Abreu-Goodger, C.; Muralidhar, B.; Pett, M.R.; Thornton, C.M.; Nicholson, J.C.; Enright, A.J.; et al. Malignant Germ Cell Tumors Display Common MicroRNA Profiles Resulting in Global Changes in Expression of Messenger RNA Targets. *Cancer Res* **2010**, *70*, 2911–2923. [[CrossRef](#)]
- Chang, Y.; Wang, X.; Xu, Y.; Yang, L.; Qian, Q.; Ju, S.; Chen, Y.; Chen, S.; Qin, N.; Ma, Z.; et al. Comprehensive characterization of cancer-testis genes in testicular germ cell tumor. *Cancer Med.* **2019**, *8*, 3511–3519. [[CrossRef](#)]
- Chen, Y.; Wang, X. miRDB: An online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *48*, D127–D131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Agarwal, V.; Bell, G.W.; Nam, J.-W.; Bartel, D.P. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife* **2015**, *4*, e05005. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Li, C.; Tang, Z.; Zhang, W.; Ye, Z.; Liu, F. GEPIA2021: Integrating multiple deconvolution-based analysis into GEPIA. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, W242–W246. [[CrossRef](#)]
- Chandrashekar, D.S.; Bashel, B.; Balasubramanya, S.A.H.; Creighton, C.J.; Ponce-Rodriguez, I.; Chakravarthi, B.V.S.K.; Varambally, S. UALCAN: A portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses. *Neoplasia* **2017**, *19*, 649–658. [[CrossRef](#)]
- Mi, H.; Muruganujan, A.; Ebert, D.; Huang, X.; Thomas, P.D. PANTHER version 14: More genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *47*, D419–D426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

22. Kanehisa, M.; Goto, S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 27–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Kvist, K.; Clasen-Linde, E.; Langballe, O.; Hansen, S.H.; Cortes, D.; Thorup, J. The Expression of Markers for Intratubular Germ Cell Neoplasia in Normal Infantile Testes. *Front. Endocrinol.* **2018**, *9*, 286. [[CrossRef](#)]
24. Murray, M.J.; Bell, E.; Raby, K.L.; A Rijlaarsdam, M.; Gillis, A.J.M.; Looijenga, L.H.J.; Brown, H.; Destenaves, B.; Nicholson, J.C.; Coleman, N. A pipeline to quantify serum and cerebrospinal fluid microRNAs for diagnosis and detection of relapse in paediatric malignant germ-cell tumours. *Br. J. Cancer* **2015**, *114*, 151–162. [[CrossRef](#)]
25. Rosa, A.; Papaioannou, M.D.; Krzyspiak, J.E.; Brivanlou, A.H. miR-373 is regulated by TGF β signaling and promotes mesoderm differentiation in human Embryonic Stem Cells. *Dev. Biol.* **2014**, *391*, 81–88. [[CrossRef](#)]
26. Stadler, B.; Ivanovska, I.; Mehta, K.; Song, S.; Nelson, A.; Tan, Y.; Mathieu, J.; Darby, C.; Blau, C.A.; Ware, G.; et al. Characterization of microRNAs Involved in Embryonic Stem Cell States. *Stem Cells Dev.* **2010**, *19*, 935–950. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Guo, M.; Gan, L.; Si, J.; Zhang, J.; Liu, Z.; Zhao, J.; Gou, Z.; Zhang, H. Role of miR-302/367 cluster in human physiology and pathophysiology. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2020**, *52*, 791–800. [[CrossRef](#)]
28. Clasen-Linde, E.; Kvist, K.; Cortes, D.; Thorup, J. The value of positive Oct3/4 and D2-40 immunohistochemical expression in prediction of germ cell neoplasia in prepubertal boys with cryptorchidism. *Scand. J. Urol.* **2015**, *50*, 74–79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Lobo, J.; van Zogchel, L.M.J.; Nuru, M.G.; Gillis, A.J.M.; van der Schoot, C.E.; Tytgat, G.A.M.; Looijenga, L.H.J. Combining Hypermethylated RASSF1A Detection Using ddPCR with miR-371a-3p Testing: An Improved Panel of Liquid Biopsy Biomarkers for Testicular Germ Cell Tumor Patients. *Cancers* **2021**, *13*, 5228. [[CrossRef](#)]
30. Tang, D.; Huang, Z.; He, X.; Wu, H.; Peng, D.; Zhang, L.; Zhang, X. Altered miRNA profile in testis of post-cryptorchidopexy patients with non-obstructive azoospermia. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2018**, *16*, 78. [[CrossRef](#)]
31. Woo, C.G.; Lee, O.-J.; Yang, Y.; Kim, Y.J.; Lee, J.; Son, S.-M. Collision tumor comprising metastatic cholangiocarcinoma and seminoma in an undescended testis: A case report. *J. Int. Med Res.* **2019**, *47*, 5809–5816. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Osterballe, L.; Clasen-Linde, E.; Cortes, D.; Engholm, G.; Hertzum-Larsen, R.; Reinhardt, S.; Thorup, J. The diagnostic impact of testicular biopsies for intratubular germ cell neoplasia in cryptorchid boys and the subsequent risk of testicular cancer in men with prepubertal surgery for syndromic or non-syndromic cryptorchidism. *J. Pediatr. Surg.* **2017**, *52*, 587–592. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Duale, N.; Lindeman, B.; Komada, M.; Olsen, A.-K.; Andreassen, A.; Soderlund, E.J.; Brunborg, G. Molecular portrait of cisplatin induced response in human testis cancer cell lines based on gene expression profiles. *Mol. Cancer* **2007**, *6*, 53. [[CrossRef](#)]
34. Yang, N.-Q.; Luo, X.-J.; Zhang, J.; Wang, G.-M.; Guo, J.-M. Crosstalk between Meg3 and miR-1297 regulates growth of testicular germ cell tumor through PTEN/PI3K/AKT pathway. *Am. J. Transl. Res.* **2016**, *8*, 1091–1099. [[PubMed](#)]
35. Selfe, J.; Shipley, J.M. IGF signalling in germ cells and testicular germ cell tumours: Roles and therapeutic approaches. *Andrology* **2019**, *7*, 536–544. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Voorhoeve, P.M.; le Sage, C.; Schrier, M.; Gillis, A.J.; Stoop, H.; Nagel, R.; Liu, Y.-P.; van Duijse, J.; Drost, J.; Griekspoor, A.; et al. A Genetic Screen Implicates miRNA-372 and miRNA-373 As Oncogenes in Testicular Germ Cell Tumors. *Cell* **2006**, *124*, 1169–1181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Long, J.; Luo, J.; Yin, X. miR-367 enhances the proliferation and invasion of cutaneous malignant melanoma by regulating phosphatase and tensin homolog expression. *Mol. Med. Rep.* **2018**, *17*, 6526–6532. [[CrossRef](#)]
38. Wang, H.; Zhao, Y.; Chen, T.; Liu, G.; He, N.; Hu, H. MiR-371 promotes proliferation and metastasis in hepatocellular carcinoma by targeting PTEN. *BMB Rep.* **2019**, *52*, 312–317. [[CrossRef](#)]
39. Shin, J.W.; Kim, S.-H.; Yoon, J.Y. PTEN downregulation induces apoptosis and cell cycle arrest in uterine cervical cancer cells. *Exp. Ther. Med.* **2021**, *22*, 1–7. [[CrossRef](#)]
40. Neuvians, T.P.; Gashaw, I.; Hasenfus, A.; Häcker, A.; Winterhager, E.; Grobholz, R. Differential Expression of IGF Components and Insulin Receptor Isoforms in Human Seminoma Versus Normal Testicular Tissue. *Neoplasia* **2005**, *7*, 446–456. [[CrossRef](#)]
41. Cannarella, R.; Condorelli, R.A.; La Vignera, S.; Calogero, A.E. Effects of the insulin-like growth factor system on testicular differentiation and function: A review of the literature. *Andrology* **2017**, *6*, 3–9. [[CrossRef](#)]
42. Liu, J.; Wang, Y.; Ji, P.; Jin, X. Application of the microRNA-302/367 cluster in cancer therapy. *Cancer Sci.* **2020**, *111*, 1065–1075. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Wu, R.-C.; Jiang, M.; Beaudet, A.L.; Wu, M.-Y. ARID4A and ARID4B regulate male fertility, a functional link to the AR and RB pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 4616–4621. [[CrossRef](#)]
44. Wu, R.-C.; Zeng, Y.; Pan, I.-W.; Wu, M.-Y. Androgen Receptor Coactivator ARID4B Is Required for the Function of Sertoli Cells in Spermatogenesis. *Mol. Endocrinol.* **2015**, *29*, 1334–1346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Miyazaki, T.; Mori, M.; Yoshida, C.A.; Ito, C.; Yamatoya, K.; Moriishi, T.; Kawai, Y.; Komori, H.; Kawane, T.; Izumi, S.-I.; et al. Galnt3 deficiency disrupts acrosome formation and leads to oligoasthenoteratozoospermia. *Histochem.* **2012**, *139*, 339–354. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Campagnoli, M.F. Familial tumoral calcinosis and testicular microlithiasis associated with a new mutation of GALNT3 in a white family. *J. Clin. Pathol.* **2006**, *59*, 440–442. [[CrossRef](#)]
47. Richenberg, J.; Belfield, J.; Ramchandani, P.; Rocher, L.; Freeman, S.; Tsili, A.C.; Cuthbert, F.; Studniarek, M.; Bertolotto, M.; Turgut, A.T.; et al. Testicular microlithiasis imaging and follow-up: Guidelines of the ESUR scrotal imaging subcommittee. *Eur. Radiol.* **2014**, *25*, 323–330. [[CrossRef](#)]

48. Liu, N.; Qadri, F.; Busch, H.; Huegel, S.; Sihh, G.; Chuykin, I.; Hartmann, E.; Bader, M.; Rother, F. Kpna6 deficiency causes infertility in male mice by disrupting spermatogenesis. *Development* **2021**, *148*, dev198374. [[CrossRef](#)]
49. Ying, W. Phenomic Studies on Diseases: Potential and Challenges. *Phenomics* **2023**, *3*, 285–299. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00155

Matrícula: 2173801648

Caracterización del nivel de expresión del clúster miR-371-373 y del miR-367 en un grupo de pacientes pediátricos con criptorquidia aislada.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 22 del mes de mayo del año 2024 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. EDMUNDO BONILLA GONZALEZ
- DR. ISIDRO XAVIER PEREZ AÑORVE
- DR. DANIEL ADRIAN LANDERO HUERTA
- DR. JOSE DE LA LUZ DIAZ CHAVEZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

DE: FABIOLA GARCIA ANDRADE

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

APROBAR

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



FABIOLA GARCIA ANDRADE
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. EDMUNDO BONILLA GONZALEZ

VOCAL

DR. ISIDRO XAVIER PEREZ AÑORVE

VOCAL

DR. DANIEL ADRIAN LANDERO HUERTA

SECRETARIO

DR. JOSE DE LA LUZ DIAZ CHAVEZ