

**DETERMINACIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN INSL3 Y DE LA MUTACIÓN  
A664C (T222P) EN EL GEN LGR8 EN PACIENTES COLOMBIANOS CON  
CRIPTORQUIDIA Y EN UN GRUPO CONTROL**

**LUZ YAQUELINE LADINO CORTES**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE MEDICINA  
INSTITUTO DE GENÉTICA  
MAESTRÍA EN GENÉTICA HUMANA  
BOGOTÁ  
2010**

**DETERMINACIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN INSL3 Y DE LA MUTACIÓN  
A664C (T222P) EN EL GEN LGR8 EN PACIENTES COLOMBIANOS CON  
CRIPTORQUIDIA Y EN UN GRUPO CONTROL.**

**TRABAJO PRESENTADO POR:**

**LUZ YAQUELINE LADINO CORTES  
Maestría en Genética Humana  
Código 597799**

**Trabajo de grado para optar al título de Magister en Genética Humana**

**DIRECTOR DE TESIS**

**ALEJANDRO GIRALDO MD, MPH  
Profesor Asociado  
Departamento de Medicina Interna  
Facultad de Medicina  
Universidad Nacional de Colombia**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA  
MAESTRÍA EN GENÉTICA HUMANA  
BOGOTÁ D.C. 2010**

Nota de aceptación

---

---

---

---

---

Presidente del jurado

---

Jurado

---

Director

Bogotá, Noviembre de 2010.

**A MI DIOS,  
A MIS PADRES, HERMANOS  
A MIS SOBRINOS Y CUÑADOS**

## AGRADECIMIENTOS

- ❖ A Dios porque nunca me abandona.
- ❖ A mi familia por su constante apoyo, comprensión y aliento para la culminación de este proceso.
- ❖ A las personas que permitieron que utilizara su ADN, a cambio de avanzar en el conocimiento.
- ❖ Al director de tesis Dr. Alejandro Giraldo, por su confianza y su gran colaboración las cuales hicieron posible este trabajo.
- ❖ A Andrés Gutiérrez por su apoyo técnico y teórico en el desarrollo del proyecto.
- ❖ A mis amigas Claudia Méndez, por ser más que una amiga toda una profe. A Martha de Olano, por su apoyo incondicional.
- ❖ Al Comité de la maestría en Genética, por darme la gran oportunidad de ingresar a sus aulas.
- ❖ A Islena Bonilla porque siempre sabe ir más allá.
- ❖ A los profesores de la maestría por sus constantes aportes y a todo el personal del Instituto de Genética de la Universidad Nacional, que de una u otra manera me ayudaron durante éste arduo y maravilloso periodo.
- ❖ A mis compañeros: Diana Q, Edwin H, Diana N, Shyrly C, María Eu C, Carolina M, Elver S, Andrea C, Tatiana V, Lorena P, Erika T. Por su gran ayuda y porque hicieron de mi travesía por esta universidad un tiempo inolvidable.
- ❖ Al Dr. Santiago Rodríguez García del Hospital Universitario Erasmo Meoz en Cúcuta, por su gran colaboración al permitirme estudiar sus pacientes.
- ❖ Al Hospital de la Misericordia por abrirme sus puertas.
- ❖ A Catalina Palacios del laboratorio 7 del Instituto de Genética, por ayudarme siempre que lo necesite.
- ❖ A las lindas chicas María P, Ivonne T, Barbara P, Liliana R y Carolina L.

- ❖ A mis compañeros del CAMI Patio Bonito, del Tunal (Oscar y Adriana) y de CAFAM.

## TITULO

# **DETERMINACIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN INSL3 Y DE LA MUTACIÓN A664C (T222P) EN EL GEN LGR8, EN PACIENTES COLOMBIANOS CON CRIPTORQUIDIA Y EN UN GRUPO CONTROL.**

## **RESUMEN**

La criptorquidia –descenso defectuoso o incompleto del testículo desde su origen hasta su situación definitiva en la bolsa escrotal– representa el trastorno más frecuente de la diferenciación sexual en los varones. Aunque su frecuencia es del 3-4% en recién nacidos a término, y hasta del 30% en prematuros, el descenso espontáneo durante los primeros meses de vida hace que al final del primer año, la frecuencia baje hasta el 0,8 - 1,1%. Estudios realizados en Colombia reportan tasas que oscilan entre 3.4% y 13.3 X 10.000 nacidos vivos sin establecerse con claridad la frecuencia de esta patología en el país. El diagnóstico es clínico, mediante un examen físico en adecuadas condiciones.

La literatura reporta que los individuos con criptorquidia presentan alteraciones en la espermatogénesis, infertilidad, y un riesgo aumentado de malignidad testicular.

Son múltiples las causas que se han asociado al desarrollo de criptorquidia pero los mecanismos particulares de esta alteración no se encuentran bien dilucidados. Estudios recientes involucran modelos moleculares en la etiopatogenia de la criptorquidia.

El gen INSL3 miembro de la súper familia de hormonas similares a la insulina, el cual se expresa específicamente en las células de Leydig ha sido caracterizado y sus mutaciones han sido asociadas a la criptorquidia. La delección del gen *Insl3* en ratones transgénicos da lugar a criptorquidia bilateral y se demostró que ésta, era secundaria a la falta de desarrollo del *gubernaculum testis* durante la embriogénesis, considerándolo el gen encargado del descenso testicular. Usando ratones transgénicos que sobre expresan el *Insl3* y ratones con delección del gen *Lgr8* (leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor), se estableció que *Lgr8* es el único receptor conocido para *Insl3 in vivo*. Por esta razón se considera el sistema *Insl3-Lgr8* directamente vinculado con el descenso testicular, vía el desarrollo *del gubernaculum testis*.

Estudios de tamizaje en humanos en búsqueda de mutaciones involucrando este sistema (INSL3-LGR8) en grupos de pacientes con criptorquidia, comparándolos con grupo de pacientes sanos, han reportado mutaciones relacionadas con la patología, encontrando en el gen INSL3 una frecuencia de mutaciones relacionados con la presencia de criptorquidia de 1.9% - 7.4% (21, 24, 48) y una tasa de mutaciones para LGR8 en pacientes con criptorquidia de 3.0%.

Ningún estudio a nivel colombiano ni latinoamericano ha analizado polimorfismos en los genes INSL3 y LGR8 en pacientes con criptorquidia, ni en controles sanos,

por lo cual es de gran relevancia realizar un estudio que permita determinar las mutaciones presentes en alguno de los 2 exones del gen INSL3 y buscar específicamente la mutación A664C en el gen LGR8, asociado previamente en la literatura con el fenotipo de criptorquidia, con fin de determinar la relación de estas variantes polimórficas con la presencia de esta patología en nuestra población.

### **Materiales y Métodos.**

Para llevar a cabo este estudio se recolectaron muestras de sangre de 200 individuos sanos (sin antecedentes de alteración a nivel del descenso testicular) y de 52 individuos con criptorquidia inguinal y/o intra-abdominal, uni o bilateral. Previa aprobación por el comité de ética de la Universidad Nacional y del Comité de ética del Hospital de la Misericordia, se procedió a obtener el consentimiento informado de cada uno de los participantes y a tomar la correspondiente muestra de sangre. Se realizó la extracción de ADN y la amplificación a partir de estas muestras de los exones 1 y 2 del gen INSL3, amplificados que fueron posteriormente purificados y secuenciados ("3730 DNA Analyzer" de Applied Biosystems). Para la mutación A664C en el gen LGR8, se realizó PCR alelo específicas para las formas tipo silvestre y mutadas.

### **Resultados.**

La población de casos (52 individuos) se distribuyeron en rangos etáreos de 1 a 50 años, similares a los de los controles. El diagnóstico de criptorquidia fue unilateral en el 75% de los casos y bilateral en el 25%. Los testículos se detectaron a nivel inguinal en el 84.2%, intra abdominal en 11,54%, y dos de los pacientes incluidos presentaron un testículo a nivel inguinal y el otro intra abdominal (3,85%), observándose una variabilidad fenotípica acorde con lo descrito en otros estudios . Los individuos analizados como controles pertenecen a grupos etáreos similares a los casos con o sin fertilidad probada.

Se hallaron las 4 mutaciones, R30H, G35R, A60T, Q92H, tanto en controles como en pacientes, considerándose por lo tanto polimorfismos. La mutación A60T, ha sido reportada previamente en poblaciones de Europa y Japón.

Otras seis mutaciones, en condición heterocigota, fueron encontradas en el grupo de pacientes: L10R, P27L, L87Q, P93L, R105G y A107P. La mutación P93L ha sido estudiada reportada y determinada previamente como patogénica, pues se realizaron modelos de la proteína mutada en los cuales se observó un reordenamiento de la estructura secundaria con pérdida total de la hélice, lo cual podría conducir a inestabilidad de la proteína. La mutación A664C no fue hallada en el grupo de individuos evaluados.

### **Discusión.**

En el presente estudio consideramos como hallazgo muy importante la observación de 5 mutaciones nuevas, presuntamente asociadas con la presencia de criptorquidia. En nuestro trabajo describimos 6 mutaciones en hombres con criptorquidia. Sin embargo, la forma como estas mutaciones afectan la proteína y



la vía de señalización no está claramente soportada por análisis funcionales. Estudios adicionales in vitro, en los que se analicen las nuevas mutaciones descritas son necesarios para precisar la alteración funcional en la vía INSL3-LGR8 y su relación con la alteración en el descenso testicular. La mutación A664C no fue observada en nuestra población. La evidencia sugiere una compleja interacción entre susceptibilidad y exposición a ciertos factores ambientales involucrada en el fenotipo criptorquidia.

## TITLE

### **MUTATIONS DETERMINATION IN THE GENE INSL3 AND THE A664C (T222P) MUTATION IN THE GENE LGR8, IN COLOMBIAN PATIENTS WITH CRYPTORCHIDISM AND A CONTROL GROUP.**

## ABSTRACT

Cryptorchidism, defective or incomplete descent of the testis from its origin to its final location in the scrotum, represents the most common birth defect of male genitalia. Although the frequency of the 3-4% in full-term newborn infants, and up of the 30% in premature infant boy, the spontaneous descent during the first months of life causes that at the end of the first year, the frequency drops to 0.8 - 1,1%. Studies realized in Colombia have reported rates between 3,4 % and 13,3 X 10,000 in male live birth, although a definite frequency of this disease in the country has not yet been established. The diagnosis is clinical by physical examination in appropriate conditions.

The literature reports that patient with cryptorchidism have spermatogenesis dysfunction, infertility, and increased risk of testicular malignancy.

Many causes that have been associated to the development of cryptorchidism but specific mechanisms of this alteration are not well explained. Recent studies involving molecular models in the pathogenesis of cryptorchidism.

The INSL3 gene, a super family member of hormones similar to insulin which is specifically expressed in the Leydig cells has been characterized and its mutations have been associated with criptorchidism. The deletion of the gene Insl3 in transgenic mice results in bilateral cryptorchidism and has been demonstrated that it is secondary to the lack of the *gubernaculum testis* development during the embryogenesis, and for that reason it is presumed that this is the gene responsible for the testicular descent. Using transgenic mice that over express Insl3 and mice with deletion the gene Lgr8 (leucine-rich repeat-containing G protein-coupled), it was established it that Lgr8 is the only known receptor for Insl3 *in vivo* (9). For this reason we consider the system Insl3 - Lgr8 related to testicular descent via the development of the *gubernaculum testis*.

Screening studies searching for mutations in humans involving this system (INSL3-LGR8) in groups of patients with cryptorchidism, compared with group of healthy patients, have reported several mutations associated with this disease. It has been observed a frequency of 1.9% - 7.4% mutations associated with the presence of cryptorchidism in the INSL3 gene, and a rate of mutations of 3,0% in the LGR8 gene in patients with cryptorchidism.

Any national or Latin American study have searched for mutations in the INSL3 and LGR8 genes in patients with cryptorchidism, and in healthy control men. For

that reason is relevant this study, that allows to determine the mutations of the 2 exons of INSL3 gene and search specifically the A664C mutation in the LGR8 to establish the relationship between these mutations and the presence of this disease in our population.

### **Materials and Methods.**

Blood samples were collected in 200 healthy individuals (without antecedents of alteration concerning the testicular descent without obvious morphologic alterations) and in 52 patients with cryptorchidism, inguinal and/or intra-abdominal, unilateral or bilateral. With previous approval by the Ethics Committee of the National University and the Ethics Committee of the Hospital of the Misericordia, we proceeded to obtain informed consent from each one of the participants and to obtain its corresponding blood sample. We performed DNA extraction and amplification from these samples of exons 1 and 2 of the INSL3 gene, were subsequently amplified, purified and sequenced (3730 DNA Analyzer "from Applied Biosystems). For the A664C polymorphism in the LGR8 gene, allele specific PCR was performed for wild type and mutated forms.

### **Results**

The population of cases (52 individuals), were similar to the controls in age range. Individuals with cryptorchidism were classified as uni lateral (75%) or bilateral (25%). The testicles were found in the inguinal canal (84.2%), intra-abdominal (11,5%), two patients had an inguinal testicle and the other intra-abdominal (3.85%). This phenotypic variability is similar to the observed in most of the reports analyzed.

Were found 4 mutations present both in controls, and patients, considered as polymorphisms: R30H, G35R, A60T, Q92H. The A60T polymorphism, has been previously reported in several populations of Europe and Japan

Six mutations were found in heterozygous condition in the group of patients: L10R, P27L, L87Q, P93L, R105G and A107P. The P93L mutation has been reported previously, and modeling studies altered protein showed a rearrangement of secondary structure with total loss of the helix, which could lead to instability of the protein. The LGR8 gene mutation (A664C) was not found.

### **Discussion**

In the present study we described 6 mutations in men with cryptorchidism. Five of these mutations have not previously described. We consider very important this finding, presumably associated with the presence of cryptorchidism in our patients. However, the form as these mutations affect the protein and the route of signaling is not clearly supported by functional analyses. Additional *in vitro* studies, are necessary to clarify the functional alterations in the way InsI3-LGR8 and its relation to the alteration in testicular descent. Most of the current evidence suggests that a

complex interplay between susceptibility and exposure to certain environmental factors is involved in the development of the cryptorchidic phenotype.

## TABLA DE CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN.....	19
2.	ESTADO DEL ARTE .....	22
2.1.	DEFINICIÓN.....	22
2.2.	EPIDEMIOLOGÍA .....	23
2.3.	EMBRIOLOGÍA DEL DESCENSO TESTICULAR.....	24
2.4.	FISIOPATOLOGÍA.....	25
2.5.	GENÉTICA DE LA CRIPTORQUIDIA.....	26
2.5.1.	INSL3 .....	28
2.5.2.	LGR8 .....	36
3.	OBJETIVOS.....	41
3.1.	OBJETIVO GENERAL .....	41
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	41
4.	METODOLOGÍA.....	42
4.1.	DISEÑO DEL ESTUDIO.....	42
4.2.	PARTICIPANTES EN LA INVESTIGACIÓN .....	42
4.2.1.	Consideraciones éticas.....	44
4.2.2.	Consideraciones de bioseguridad .....	44
4.2.3.	Criterios de selección de los participantes.....	45
4.3.	MUESTRAS .....	46
4.4.	EXTRACCIÓN DE ADN.....	47
4.5.	CUANTIFICACIÓN DE ADN .....	47
4.6.	AMPLIFICACIÓN DE LOS EXONES 1 Y 2 DEL GEN INSL3.....	48
4.6.1.	PCR.....	48
4.6.2.	Condiciones para PCR y programa de PCR.....	49
4.6.3.	Secuenciación .....	50
4.6.4.	Análisis de secuencias .....	50
4.7.	AMPLIFICACIÓN PCR ALELO ESPECÍFICA DE LA MUTACIÓN A664C EN EL GEN LGR8.....	51
4.7.1.	Diseño de primers.....	51
4.7.2.	Condiciones para PCR y programa de PCR.....	52
4.8.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	52
5.	RESULTADOS .....	53
5.1.	POBLACIÓN DE ESTUDIO .....	53
5.1.1.	Controles.....	53
5.1.2.	Casos.....	54
5.2.	GEN INSL3 .....	56
5.2.1.	Amplificados de PCR.....	56
5.2.2.	Secuenciación .....	58
5.3.	GEN LGR8 .....	73
5.3.1.	Amplificados de PCR para la mutación A664C (T222P).....	73
6.	DISCUSIÓN.....	74
7.	CONCLUSIONES.....	82
8.	RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS.....	83

9. BIBLIOGRAFIA ..... 85

## **ANEXOS**

ANEXO 1. Asentimiento del niño menor de edad para participación en estudio

ANEXO 2. Permiso para participación de menores de edad en el estudio.

ANEXO 3. Consentimiento informado para participación de mayores de edad en el estudio.

ANEXO 4. Consentimiento informado para banco de ADN.

ANEXO 5. Formato para identificación de controles.

ANEXO 6. Formato para identificación de pacientes.

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Calculo de la tasa del riesgo de recurrencia para familiares de un paciente con criptorquidia. ....	24
Tabla 2. Familia de genes relaxina/insulina .....	30
Tabla 3. Mutaciones reportadas en la literatura para el gen INSL3. ....	36
Tabla 4. Reportes de la mutación A664C en el gen LGR8, en diferentes estudios.....	39
Tabla 5. Mutaciones reportadas en la literatura en los genes INSL3 y LGR8. ....	40
Tabla 6. Primers para el Gen INSL3 .....	48
Tabla 7. Concentraciones de reactivos para PCR del gen INSL3. ....	49
Tabla 8. Protocolo del termociclador para el exón 1 del gen INSL3. ....	49
Tabla 9. Protocolo del termociclador para el exón 2 del gen INSL3. ....	49
Tabla 10. Primers para la mutación A664C del gen LGR8.....	51
Tabla 11. Concentraciones de reactivos para la mutación A664C del gen LGR8. ....	52
Tabla 12. Protocolo del termociclador para la mutación A664C del gen LGR8. ....	52
Tabla 13. Porcentaje de secuencias adecuadas primer reverse.....	59
Tabla 14. Porcentaje de secuencias adecuadas primer forward.....	59
Tabla 15. Mutaciones halladas tanto en pacientes como en controles. ....	60
Tabla 16. Cambio de aminoácido en las mutaciones halladas en controles y casos vs cambios con relación a su cadena lateral R. ....	60
Tabla 17. Mutaciones en el gen INSL3 hallados en casos. ....	70
Tabla 18. Cambio de aminoácido en las mutaciones halladas en los casos vs cambios con relación a su cadena lateral R. ....	70
Tabla 19. Relación tipo de criptorquidia vs Número de mutaciones halladas en el gen INSL3. ....	72
Tabla 20. Relación localización del testículo vs Número de mutaciones halladas en el gen INSL3. ....	72



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Célula muscular del gubernáculo fetal.....	28
Figura 2. Gen INSL3 .....	29
Figura 3. Integrando DNA y Proteína INSL3. ....	31
Figura 4. Alineamiento multi especies INSL3. ....	32
Figura 5. Mutaciones en el gen INSL3.....	36
Figura 6. Gen LGR8 .....	37
Figura 7. Cuantificación en NanoDrop2000. ....	48
Figura 8. Cuantificación en NanoDrop2000. ....	48
Figura 10. Fertilidad de los controles estudiados. ....	53
Figura 11. Rangos de edad en los casos estudiados. ....	54
Figura 12. Tipo de criptorquidia.....	54
Figura 13. Localización del testículo vs porcentaje de casos. ....	54
Figura 14. Número de pacientes con hijos y sin hijos.....	55
Figura 15. Antecedentes familiares de criptorquidia en los casos.....	55
Figura 16. Procedimiento quirúrgico vs número de pacientes. ....	55
Figura 17. Amplificación del Exón 1 del gen INSL3 en controles. ....	56
Figura 18. Amplificación del Exón 1 del gen INSL3 en casos. ....	56
Figura 19. Amplificación del Exón 1 del gen INSL3 en controles. ....	57
Figura 20. Amplificación del Exón 2 del gen INSL3 en controles. ....	57
Figura 21. Amplificación del Exón 2 del gen INSL3 en casos. ....	58
Figura 22. Proteína, ADN mutación L10R (T26G).....	61
Figura 23. Electroferograma mutación L10R (T26G).....	61
Figura 24. Localización de la mutación L10R (T26G) en la proteína. Alineamiento multi-especies. ....	61
Figura 25. Proteína, ADN mutación P27L (C77T). ....	62
Figura 26. Electroferograma mutación P27L (C77T). ....	62
Figura 27. Localización de la mutación P27L (C77T) en la proteína. Alineamiento multi-especies. ....	62
Figura 28. Proteína, ADN mutación L87Q (T260A) Caso 50. ....	63
Figura 29. Electroferograma de la mutación L87Q (T260A) Caso 50.....	64
Figura 30. Localización de la mutación L87Q (T260A) en la proteína (Caso 50). Alineamiento multi-especies. ....	64
Figura 31. Proteína, ADN mutación L87Q (T260A) Caso 51. ....	65
Figura 32. Electroferograma mutación L87Q (T260A) Caso 51. ....	65
Figura 33. Localización de la mutación L87Q (T260A) en la proteína (Caso 51). Alineamiento multi-especies. ....	65
Figura 34. Proteína, ADN mutación A107P (G319C). ....	66
Figura 35. Electroferograma de la mutación A107P (G319C).....	66
Figura 36. Localización de la mutación A107P (G319C) en la proteína. Alineamiento multi-especies. ....	66
Figura 37. Proteína, ADN mutación P93L (C278T). ....	67
Figura 38. Electroferograma de la mutación P93L (C278T).....	67

Figura 39. Localización de la mutación P93L (C278T) en la proteína. Alineamiento multi-especies. ....	68
Figura 40. Proteína, ADN mutación A107P (G319C) Caso 10. ....	68
Figura 41. Electroferograma de la mutación A107P (G319C) Caso 10. ....	69
Figura 42. Localización de la mutación A107P (G319C) en la proteína. Alineamiento multi-especies. Caso 10. ....	69
Figura 43. Proteína, ADN mutación R105G (C313G). ....	69
Figura 44. Electroferograma mutación R105G (C313G). ....	70
Figura 45. Localización de la mutación R105G (C313G) en la proteína. Alineamiento multi-especies. ....	70
Figura 46. Búsqueda de mutaciones en el gen INSL3 (NCBI). ....	71
Figura 47. Esquema de las mutaciones halladas en NCBI para el gen INSL3. ....	72
Figura 48. Amplificados del gen LGR8. ....	73

## 1. INTRODUCCIÓN

Una manifestación distintiva del fenotipo masculino en muchos mamíferos es la posición escrotal de las gónadas. Durante el desarrollo, los testículos descienden por un complejo proceso gradual, por el cual las gónadas migran de su posición inicial abdominal, al escroto. La alteración de este proceso causa testículos no descendidos (criptorquidia), una de las alteraciones al nacimiento más frecuentes en humanos (34, 35). Las consecuencias clínicas de esta anomalía son la infertilidad en la edad adulta y un riesgo considerablemente aumentado de malignidad testicular (57, 64).

El descenso testicular en mamíferos consiste de dos etapas principales: el descenso trans-abdominal e inguino-escrotal (34, 35). Específicamente 2 ligamentos dirigen el movimiento del testículo. El ligamento caudal genital o *gubernaculum* sufre una intensa diferenciación en hombres, mientras que el ligamento suspensorio craneal regresa gradualmente (35). En la etapa trans-abdominal, los testículos quedan cerca de la región inguinal durante la ampliación de la cavidad abdominal. En la fase inguino-escrotal el testículo desciende de la región inguinal al escroto. Esto ocurre paralelamente con un acortamiento del *gubernaculum*, sobre crecimiento del bulbo gubernacular y eversión del músculo cremaster (35). Un papel muy importante del descenso testicular ha sido atribuido a las hormonas, manifestándose en algunas patologías congénitas que causan hipogonadismo o resistencia androgénica (22). La criptorquidia es el trastorno de la diferenciación sexual más frecuente.

INSL3 es expresado en células de Leydig durante los periodos pre y pos natal, se ha sugerido que pueda actuar como un inductor del crecimiento y diferenciación del *gubernaculum*, mediando de esta forma la etapa transabdominal del descenso testicular. Knock-out del gen *Insl3* (localizado en *Mus musculus* en el cromosoma 8) en modelo murino, causa criptorquidia bilateral intraabdominal, debido a alteración en el desarrollo del *gubernaculum* (80). En humanos el gen INSL3 se

encuentra localizado en el cromosoma 19, consta de 2 exones y un intron (MIM\*606655), con un transcripto de 690 pares de bases más aproximadamente 150 adenosinas en la cola poli (A)(12).

El receptor para Insl3 es Lgr8 (*Mus musculus* localizado en el cromosoma 5) (9, 27, 32, 45, 54). En ratones machos la delección de este gen causa criptorquidia que es fenotípicamente muy similar a la criptorquidia en ratones deficientes de Insl3. *In vitro* el péptido Insl3 recombinante y sintético se unió directamente a Lgr8, estimulando la producción de AMPc (80), confirmando de esta forma la relación ligando receptor.

Usando ratones transgénicos que sobre expresen Insl3 con una delección del gen Lgr8, se estableció que Lgr8 es el único receptor para Insl3 *in vivo* (9). LGR8 se encuentra localizado en humanos en el cromosoma 13 y consta de 18 exones (MIM\*146738).

Variantes alélicas del gen humano INSL3 han sido descritas en estudios publicados que incluyen individuos con criptorquidia (Tablas 3 y 5), algunas de estas variantes son halladas tanto en pacientes como en controles haciendo suponer la codificación para una hormona funcionalmente activa. Sin embargo, once variantes de INSL3 que codifican para sustituciones de aminoácidos (R4H, C19G, V18M, R105H, P49S, P93L, R102C, R102H, N11K, N86K y R73X) se han encontrado solo en pacientes con criptorquidia o en mujeres, en diferentes estudios realizados. Se ha demostrado que al menos una de las sustituciones missense (de sentido erróneo), P49S compromete la actividad fisiológica de INSL3 pudiendo ser responsable de la criptorquidia; resultante de una señalización por INSL3 disminuida (21, 24).

LGR8 ha sido estudiado en pacientes con criptorquidia encontrando 4 sustituciones de nucleótido, una única mutación missense (A664C) en el ectodominio fue identificada en pacientes con criptorquidia (8, 21). El receptor

mutado A664C falla en responder al estímulo del ligando sugiriendo una implicación de esta mutación en la etiología de la criptorquidia humana (8, 27).

Estudios de tamizaje de mutaciones involucrando este sistema (INSL3-LGR8) en grupos de pacientes con criptorquidia comparados con grupos de pacientes sanos han reportado variantes polimórficas relacionadas con la patología, encontrando en el gen INSL3 una frecuencia de mutaciones relacionadas con la presencia de criptorquidia desde 1.9% hasta 7.4% (21, 24, 48). La frecuencia de mutaciones reportadas para LGR8 en pacientes con criptorquidia es de 3.0% y de aproximadamente 5.3% únicamente para la mutación A664C (8, 24) por lo que pretendemos analizar las mutaciones presentes en el gen INSL3 y la presencia o ausencia de la mutación A664C en el gen LGR8 en relación con la presencia o ausencia de criptorquidia en una muestra de pacientes colombianos.

## 2. ESTADO DEL ARTE

### 2.1. DEFINICIÓN

El término criptorquidia proviene del griego kriptos (oculto) y orquis (testículo). El testículo criptorquídico oculto o no descendido; es aquel que se encuentra espontánea y permanentemente fuera del escroto, pero localizado en un punto de su trayecto normal de descenso, pudiendo palpase o no y ser unilateral o bilateral. Finalmente considerada como la falla en el descenso de los testículos al saco escrotal (22).

La criptorquidia se clasifica por exploración física en:

#### TESTÍCULO PALPABLE:

- a.- Alto escrotal
- b.- En el canal inguinal
- C.- A la entrada del anillo inguinal profundo
- d.- Ectópico (perineal, femoral o púbico)
- e.- Retráctil (variante normal)

#### TESTÍCULO NO PALPABLE:

5% - 28% de los testículos no descendidos.

- a.- Anorquidia (ausencia congénita de uno o ambos testículos)
- b.- Intra-abdominal (69).

Clínicamente la criptorquidia puede clasificarse como inguinal y/o intra abdominal.

Con respecto a la localización derecha y/o izquierda la criptorquidia puede ser:

Unilateral

Bilateral.

## **2.2. EPIDEMIOLOGÍA**

Estudios clínicos prospectivos han mostrado que la prevalencia de criptorquidia entre niños con peso al nacer  $>2500$  g ha aumentado en el Reino Unido de 2.7 al 4.1% entre los años 1950 y los años 1980 y en Dinamarca de 1.8 a 8.4% entre los años 1950 y los años 1990 (71). En estudios similares realizados en diferentes países durante las dos décadas pasadas se han encontrado variaciones de 2.1 al 8.4%. Debido al descenso espontáneo de los testículos se han descrito tasas entre 0.9 y 1.8% a los 3 meses de edad (71).

La criptorquidia es la patología más común que afecta a niños recién nacidos masculinos, con una frecuencia del  $\sim 1-4$  % de nacimientos vivos masculinos. La fase inguino-escrotal del descenso testicular puede darse posterior al nacimiento, de modo que para muchos niños con criptorquidia al nacimiento, una proporción (el  $\sim 50$  %) espontáneamente puede corregirse antes de los 3 meses de edad (66). Como el descenso testicular generalmente ocurre antes del nacimiento, los niños prematuros muestran una frecuencia mucho más alta de criptorquidia que aquellos nacidos a término. Según algunos estudios más minuciosos, el 21-23% de niños con un peso al nacer  $<2.5$  kilogramos presentan criptorquidia, comparado con sólo el 3-4% con un peso al nacer  $> 2.5$  kg (59). Estudios realizados en Colombia reportan tasas que oscilan entre 3.40% (26) y  $13.3 \times 10000$  nacidos vivos (13) sin establecerse aún con claridad la incidencia de esta patología en el país.

Estudios familiares calculan el riesgo de recurrencia para criptorquidia entre hermanos gemelos varones en un 10.1% y concluyen que entre familiares de primer grado el riesgo más alto sería el de hermanos con un 3.52% (Tabla 1) (61).

Tipo de probando	N. de probandos	N. afectados	RRR	Intervalo de confianza 95%
<b>Gemelos</b>				
Del mismo genero	241	58	10.1	7.78 – 13.1
<b>Primer grado</b>				
Hermano	8666	693	3.52	3.26 – 3.79
Padre	8296	393	2.31	2.09 – 2.54
<b>Segundo grado</b>				
Medio hermano	4076	167	1.65	1.42 – 1.92
Tío	21389	653	1.38	1.28 – 1.50
Abuelo	1593	50	1.40	1.06 – 1.83
<b>Tercer grado</b>				
Primo hermano	26872	752	1.25	1.16 – 1.34

**Tabla 1. Calculo de la tasa del riesgo de recurrencia para familiares de un paciente con criptorquidia. (61)**

En un meta-análisis reciente de 21 estudios de la epidemiología de tumores de células germinales de casos y controles, se evidencia un aumento del riesgo relativo (odds ratios) en un paciente con antecedente de criptorquidia de presentar cáncer testicular desde 3,5 hasta 17,1. El riesgo teórico calculado es 4,8 (4,0-5,7) (16).

### **2.3. EMBRIOLOGÍA DEL DESCENSO TESTICULAR**

La gónada inicia su diferenciación hacia la sexta semana de gestación, orientada por el mesonefros. En la siguiente semana la expresión del gen SRY define la organogénesis testicular y una cascada de mecanismos moleculares llevan a la formación del testículo (10). Entre las semanas octava y duodécima ocurren importantes cambios en la gónada, que influyen decisivamente en la estructura y la función testiculares. Durante el segundo trimestre se realiza la proliferación gubernacular y finalmente en las últimas doce semanas desempeñan su propia función la pared abdominal y la contracción gubernacular, influida esta última por la gonadotropina hipofisaria fetal. El testículo está ubicado en etapas embrionarias en el abdomen y posteriormente se desplaza hacia el escroto. En la posición



abdominal está suspendido por dos ligamentos uno que une la gónada a la pared abdominal, llamado ligamento suspensor craneal (LSC) y el otro que conecta el testículo y el epidídimo al piso del escroto denominado *gubernaculum* (55).

El desarrollo de los genitales externos masculinos se produce bajo la influencia activa de la dihidrotestosterona. Para lograr este cambio las células blanco de los genitales externos deben convertir la testosterona proveniente de las células de Leydig del testículo en dihidrotestosterona mediante las acciones de la enzima intracelular 5  $\alpha$  -reductasa (52).

Una vez formado el testículo el feto muestra un aumento de la testosterona cuyo mayor valor se alcanza a las 10-16 semanas (230ng/dl). Posteriormente por feed back negativo a la pituitaria, causado por el aumento de los estrógenos maternos, la testosterona fetal disminuye 75-100 ng/dl. Al nacer y presentarse una disminución de los estrógenos maternos, la testosterona fetal disminuye 75-100 ng/dl. Al nacer y presentarse una disminución de los estrógenos de la madre, hay una segunda elevación de la testosterona con niveles pico a los 60 días de vida. Este evento no solo es esencial para el descenso testicular visto clínicamente en los primeros 3 meses de vida, sino que también es crítico para la impregnación en el cerebro masculino y la futura función espermatogénica (22).

#### **2.4. FISIOPATOLOGÍA**

La teoría sobre el descenso testicular más aceptada es la de Hutson (descenso testicular bifásico) la cual consiste en:

- 1ª etapa intra o trans-abdominal: la gónada diferenciada masculina está cerca del polo inferior del riñón y desciende por la cavidad abdominal hasta situarse junto al orificio inguinal interno (semana 8 a 15).
- Periodo intermedio durante el cual se da la preparación para el descenso por el canal inguinal (15 a 28 semanas).

- 2ª etapa inguino-escrotal o trans-inguinal (28 - 35 semanas). Reinicia un segundo descenso a través del canal inguinal hasta llegar al escroto en la semana 35 (35).

El primer paso es independiente de los andrógenos mientras que el segundo depende de la acción de los andrógenos (22).

Para explicar el mal descenso testicular se han propuesto dos modelos causales: el mecánico (por factores anatómicos y funcionales que dificultan o impiden el descenso) y el hormonal (dado que el descenso testicular está determinado por un adecuado nivel de andrógenos y un eje hipotálamo-hipofisario-gonadal intacto) (22).

Un papel fundamental en el descenso testicular ha sido atribuido a las hormonas (51). Los ratones que carecen de receptor de androgénico (Tfm), presentan feminización testicular, con testículos intra-abdominales sin eversión del saco escrotal. La conexión entre la criptorquidia y las hormonas también se manifiesta en alteraciones congénitas que causan hipogonadismo tales como el síndrome de Noonan, el síndrome de Klinefelter, el síndrome de Reifenstein entre otros (2, 27).

## **2.5. GENÉTICA DE LA CRIPTORQUIDIA**

La criptorquidia a menudo es encontrada como un signo único, no asociado con otra alteración, sugiriendo fuertemente que la deficiencia androgénica sola no sea una explicación suficiente (4), por lo que factores como los descritos en modelos murinos podrían ser estudiados en humanos a fin de determinar su etiología.

Recientemente, estudios moleculares sobre el descenso testicular han reportado varios factores, como los andrógenos, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), el factor de crecimiento epidérmico (EGF); los cuales son sugeridos como posibles reguladores del descenso testicular. Los andrógenos

tienen un papel importante en la segunda fase. CGRP, que es liberado del nervio genito femoral, ha sido sugerido para mediar el descenso testicular inguino-escrotal (72). El factor de crecimiento epidérmico (EGF) puede promover la diferenciación de los conductos Wolff mediada por la testosterona y el descenso testicular activando los sistemas sensibles a los andrógenos (4, 11, 22, 25, 77).

Los modelos murinos proporcionan una fuente potencial de genes candidatos para la criptorquidia humana no sindrómica. La variedad de roedores con un fenotipo similar incluyen aquellos con delección homocigota de *Insl3*, *Lgr8*, *Hoxa10* y *Hoxa11*. Estudios *in vitro* del desarrollo gubernacular indican que tanto *Insl3* como los andrógenos son requeridos para la proliferación celular dentro del *gubernaculum*, pero la vía de señalización corriente abajo permanece mal definida (4, 25, 55). Estudios recientes realizados en cultivos de gubernaculo fetal de ratas desde recién nacidas hasta los 17 días de vida, en presencia de INSL3, ofrecen un primer informe de los genes regulados por la expresión de INSL3 (68). (Figura 1).

Mutaciones en el gen *Insl3* murino, causan criptorquidia bilateral intra abdominal, debido a alteración en el desarrollo del *gubernaculum*. *Insl3* es expresado en células de Leydig pre y pos natal en el testículo, sugiriendo que *Insl3* pueda actuar como un inductor del crecimiento y diferenciación del *gubernaculum* mediando de esta forma la etapa trans-abdominal del descenso testicular (33, 55).

El estudio ratones transgénicos que sobre expresen *Insl3* con una delección del gen *Lgr8*, estableció que *Lgr8* es el único receptor para *Insl3 in vivo* (9). En ratones machos la delección del gen *Lgr8* causa criptorquidia que es fenotípicamente muy similar a la criptorquidia en ratones deficientes de *Insl3* (27).

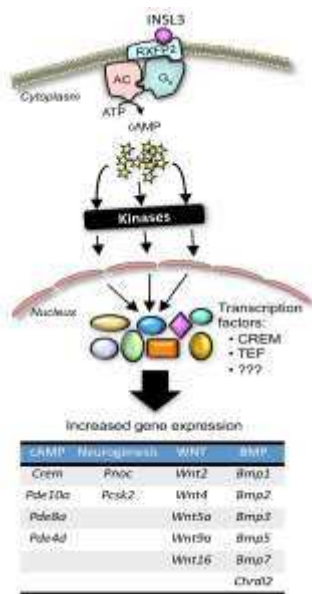


Figura 1. Célula muscular del gubernáculo fetal.

Vías de señalización activadas por INSL3 durante el desarrollo del gubernáculo fetal. INSL3 se une al receptor RXFP2 (LGR8) acoplado a la proteína G, localizado en las células musculares del gubernáculo fetal, conllevando a un aumento en la producción de AMPc. Las quinasas intermediarias (cuadro negro), activados por el AMPc están por identificar, múltiples factores de transcripción aun desconocidos inducen el incremento de la expresión de genes involucrados en la señalización del AMPc, neurogénesis y en las vías de señalización WNT y BMP. Tomado (68).

### 2.5.1. INSL3

**SIMBOLO OFICIAL:** INSL3

**NOMBRE:** insulin-like 3 (Leydig cell) [*Homo sapiens*]

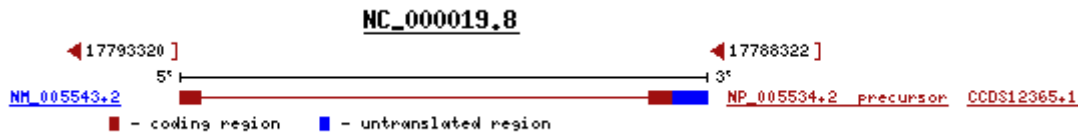
**OTRAS DESIGNACIONES:** insulin-like 3; ley-I-L; leydig insulin -like hormone; leydig insulin -like peptide; leydig insulin-like peptide; relaxin-like factor b. MGC119818, MGC119819, RLF, RLNL

**CROMOSOMA:** 19; **Localización:** 19p13.2-p12

**ANOTACIÓN:** Cromosoma 19, NC\_000019.9 (17927322..17932320, complement)

**MIM:** 146738

El gen INSL3 compuesto por dos exones, un intrón, pertenece a la familia de genes relaxina – insulina (Figura 2). Es colinear dentro del extremo final 3` del gen que codifica a Janus kinasa 3 (JAK3)(41).



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=search&term=insl3>

Figura 2. Gen INSL3

Para determinar la región funcional del promotor de *InsI3* en ratón y los factores que controlan la expresión génica, Zimmermann y colaboradores utilizaron una región de 2,1 Kb en el extremo 5' (que flanquean el gen en el ratón), para generar *InsI3* quimérico con el gen de la Acetil transferasa cloranfenicol (CAT). Transfecciones transitorias de células de Leydig MA10, fibroblastos LTK y células embrionarias F9, para una serie de constructos promotor CAT- *InsI3* de ratón deletado, revelan que la secuencia entre los nucleótidos -157 y 4 dirigió la transcripción del gen reportero en células MA10, pero no en células LTK, ni F9, indicando que los determinantes de la expresión de células de Leydig específicos residen en esta región. Los autores concluyeron que SF1 juega un papel esencial en la activación transcripcional del promotor de *InsI3* (79).

Análisis preliminares del promotor usando varios constructos del gen de ratón han destacado la importancia de tres motivos obligatorios para el factor de transcripción esteroideogénico 1 (SF1) dentro de la región inmediatamente próxima al sitio de inicio de la transcripción (40).

Al gen SF1 (Factor Esteroideogénico 1), se le atribuye un papel importante en el desarrollo y diferenciación de los tejidos esteroideogénicos. Está involucrado en la regresión de los conductos de Müller (regulando la transcripción de la hormona

antimülleriana) y promueve adicionalmente la síntesis de testosterona en las células de Leydig (75).

El transcripto del gen INSL3 es de aproximadamente 690 bases más aproximadamente 150 adeninas en la cola poli (A) (78). El sitio de transcripción es localizado 14 pb corriente arriba del sitio de inicio de traducción. El genoma humano contiene una sola copia del gen INSL3.

INSL3 es producido casi exclusivamente por las células Leydig de los testículos fetales y adultos (20, 37). Sin embargo, INSL3 también es producido por las células tecales y lúteas del ovario (5). Ratones masculinos *Insl3* knock-out expresan criptorquidia bilateral (50, 80) mientras que ratones femeninos *Insl3* nulos muestran alteración en la fertilidad.

### 2.5.1.1. Proteína INSL3

En la estructura primaria de la proteína codificada por el gen INSL3 claramente pertenece a la familia moléculas similares a la insulina y relaxina.(Tabla 2)(37).

Nombre (Nombres alternativos)	Abreviación	Nombre del gen
Insulina	INS	<i>INS</i>
Factor de crecimiento similar a la Insulina I	IGF - 1	<i>IGF1</i>
Factor de crecimiento similar a la insulina II	IGF - 2	<i>IGF2</i>
Relaxina H1 (Solo presente en primates)	RLX (REL, RLN)	<i>RLN1</i>
Relaxina H2	RLX	<i>RLN2</i>
Relaxina 3	RLN3	<i>RLN3</i>
Factor similar a la relaxina (Péptido similar a la insulina Leydig)	RLF (Ley-I-L)	<i>INSL3</i>
Placentina (Factor similar a la insulina placentario temprano)	(EPIL)	<i>INSL4</i>
INSL5 (Factor similar relaxina/insulina 2)	(RIF2)	<i>INSL5</i>
INSL6 (Factor similar relaxina/insulina 1)	(RIF)	<i>INSL6</i>

**Tabla 2. Familia de genes relaxina/insulina. (37)**

Al igual que otros miembros de la súper familia de hormonas similares a la insulina, la proteína es sintetizada como una pre proteína de 131 aminoácidos (Figura 3). La pre proteína contiene un péptido señal de 24 aminoácidos, una

cadena B (de 31 aminoácidos al extremo amino terminal) y una cadena A (de 26 aminoácidos al extremo carboxiterminal), conectada por un péptido C, el cual media en el correcto plegamiento de la molécula y en la formación de tres puentes di sulfuro en la hormona activa (Figura 4). Posteriormente el péptido activo es compuesto por las cadenas A y B (23).

### Secuencia de la proteína codificada por el gen INSL3

MDPRLPAWALVLLGPALVFALGPAPTPEMREKLCGHHFVRALVRVCGGPRWST  
EARRPATGGDRELLQWLERRHLLHGLVADSNLTLGPGLQPLPQTSHHHRHHRA  
AATNPARYCCLSGCTQQDLLTLCPY

### Péptido señal

MDPRLPAWALVLLGPALVFALGPA (1-24)

### Cadena B

PTPEMREKLCGHHFVRALVRVCGGPRWSTEA (25)

### Péptido C

RRPATGGDRELLQWLERRHLLHGLVADSNLTLGPGLQPLPQTSHHHRHHRAA

### Cadena A

AATNPARYCCLSGCTQQDLLTLCPY

```

43 M D P R L P A W A L V L L G P A L V F A L G P A P T P E M R E K L C G H H F V R A L V R V C G G P R W S T
1 ATGGACCCCG GTCTGCCCGC CTGGGCGCTG GTGTGTCTGG GGCCTGCCCT GGTGTTCGCG
TACCTGGGGG CAGACGGGCG GACCCCGGAC CACGACGACC CGGACGGGA CCACAAGCGC

43 L Q P A P T P E R H H E E L C O H H F V P
41 TTGGGCCCCG CGCCACCCCG AGAGATGCCT GAGAAGTTGT GCGGCCACCA CTTCGTACGC
AACCCGGGGC GCGGTTGGGG TCTTACCGA CTCTTCAACA CCGCCGTGGT GAGGCATGGC

43 A L V R V C G G P R W S T E A R R P A T
121 GCGCTAATGC GGTGTGGGG GGGCCCGCG TGGTCCACCG AAGCCAGGAG GCGTGGGACG
CGCGATCAGC CGCACAGGCG CCCGGGGGCG ACCAGGTGGC TTCGGTCTC CGGACCGTGG

43 G G D R E L L Q W L E R R H L L H G L V
101 GGAAGGCGAC GTAGTTGCT ACAATGGCTG GAGAGACGAC ATCTGCTCCA TGGGCTGGTG
CCTCCCTGG CACTCAACGA TGTACCGGAC CTCTCTGCTG TAAACGAAGT ACCCGACCAC

43 E D R H L T L S P S L Q P L P Q T S H H
241 GCGACAGTA ATCTACGCT GGGACTGGC CTGCGCCCGC TGGCCAGAC CTCTCAGCAT
CGGCTGTGAT TAGAGTGGGA CCCTGGACCG GACGTGGGG ACGGGGCTG GAGAGTGGTA

43 H R H H E A A A A T N P A R Y C C L S G C
201 CACGGGACCG ACCGTGCAGC TGGCACCAGC CCTGACGCT ACTGCTGCTT CAGTGGCTGT
GTGGCGGTGG TGGCACGTCG AGGTTGGTGG GAGCGTGGGA TGACGACGGA GTCACCGACA

43 T Q G D L L T L C F Y
241 ACCCAACAAG ACCTGCTGAC CCTGTGTCCG TAC
TGGGTTGTTT TGGACGACTG GGAGACAGGG ATG

```

Figura 3. Integrando DNA y Proteína INSL3.

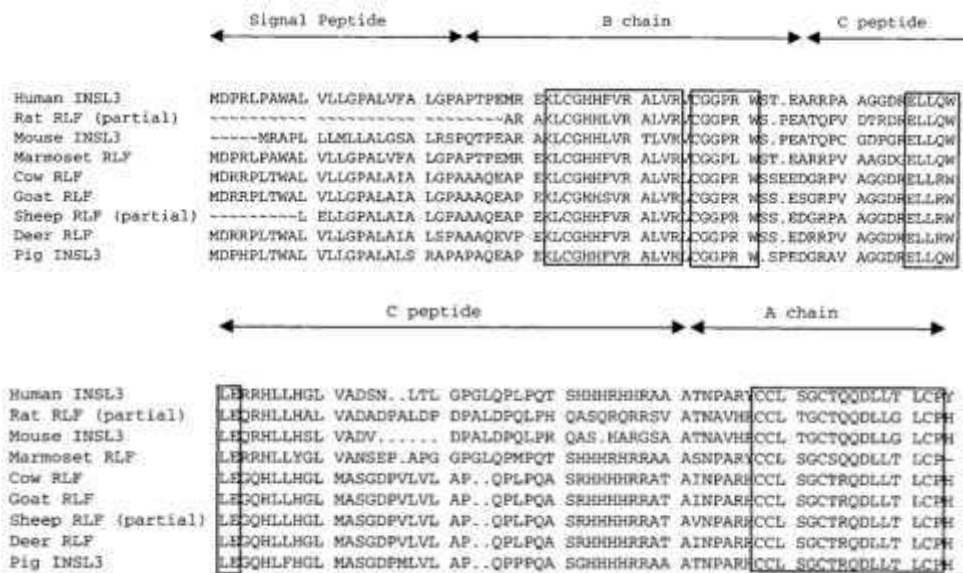


Figura 4. Alineamiento multi especies INSL3.

Observamos un alineamiento multi especies de la secuencia de la proteína INSL3. Los recuadros indican regiones de la secuencia altamente conservadas. Tomado y modificado (46).

**2.5.1.2. Regulación de la expresión génica INSL3**

Los transcritos del gen INSL3 representan uno de los ARNm más abundante en la célula de Leydig adulta.

El gen *Insl3* es sobre regulado en la población de células de Leydig fetales, logrando niveles máximos de ARNm en la rata durante aproximadamente el día 19, poco antes del nacimiento, el momento en el que *Insl3* es requerido probablemente para el descenso testicular. Como la diferenciación y producción de andrógenos de la población de células de Leydig fetales es independiente de gonadotropinas, el testículo fetal y neonatal de ratones hipogonadales (*hpg*) expresa niveles normales de *Insl3* (37). Por el contrario el gen es completamente sub regulado en el mesenquima prepuberal de los precursores de células de Leydig y progresivamente sobre regulado en el momento de la diferenciación puberal. Esto ha sido demostrado particularmente en ratones y ratas (47, 58) y se confirmó usando un ratón mutante hipogonadal (47) donde inyecciones diarias de



GCH fueron requeridas para inducir la diferenciación de las células de Leydig adultas.

Aunque haya una sobre regulación crónica marcada del gene INSL3 inducida por la gonadotropina en células Leydig durante la pubertad, el ARNm parece ser constitutivamente expresado una vez que el estado de diferenciación total ha sido alcanzado. Ningún efector clásico de la fisiología de las células Leydig fue capaz de influir en los niveles de ARNm de INSL3 en cultivos de células primarias (47), ni hubo diferencias significativas de ARNm de INSL3 o la proteína observada en biopsias testiculares humanas de pacientes con diferentes patologías testiculares severas (36).

Las únicas situaciones donde se halló un cambio marcado en las concentraciones de ARNm y de la proteína INSL3 en el testículo, fue el observado en tumor o hiperplasia de células Leydig, donde la proliferación y diferenciación parece inversamente proporcional a la expresión de INSL3. Este hallazgo es apoyado por la observación de líneas celulares de tumor de Leydig (p.ej., MA10, R2C) que exponen un nivel endógeno muy inferior de niveles de ARNm, con respecto al número equivalente de células primarias de Leydig (47). También en el testículo de rata envejecido, cuando la función esteroideogénica de las células de Leydig parece deteriorarse, hay una reducción marcada de la expresión del ARNm de INSL3 (56).

El rol funcional de INSL3 ha sido establecido en el desarrollo del sistema reproductivo y ha sido demostrado actuar en una forma local autocrina/paracrina en el testículo (20, 39).

## RNA MENSAJERO

CCACCATGGACCCCGTCTGCCCGCCTGGGCGCTGGTGCTGCTGGGCCCTG  
CCCTGGTGTTCGCGTTGGGCCCGCGCCACCCAGAGATGCGTGAGAAGT  
TGTGCGGCCACCACTTCGTACGCGCGCTAGTGCGCGTGTGCGGGGGCCCC  
GCTGGTCCACCGAAGCCAGGAGGCCTGCGACCGGAGGCGACCGTGAGTTGC  
TACAGTGGCTGGAGAGACGACATCTGCTCCATGGGCTGGTGGCCGACAGTAA  
TCTCAGCTGGGACCTGGCCTGCAGCCCCTGCCCCAGACCTCTCACCATCAC  
CGCCACCACCGTGCAGCTGCCACCAACCCTGCACGCTACTGCTGCCTCAGTG  
GCTGTACCCAACAAGACCTGCTGACCCTCTGTCCCTACTGATTCTCCTTGGG  
TGCAGCCTCAGAGTGGCCTGAGGCCAGAGGGTCTGGTCTGGTGAGCTCCT  
GAGGCCACACAGCACCATAAAGTCTCGCATCTACAGGCCTTTGATTACCTCCT  
GGGATGGGTGCTCACTATCTACCCAGACCAATGCCACCTGCAGCCTGTGGA  
GTCAACTGCAGAATAAATCACACCCTAGCCCTGGCTTGGAGGATCCCCGCTT  
TCACAGATGCTGGACACTGACAGCCAAATGTCCTCACTCCAGGGGAGCCCCA  
GACGCTCCGCTCCCTGCATGTGTAACACCCTTCTTGCTGTCTCTTAGTAAAT  
AAACGACCCAAAGCAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

>gi|38327534|ref|NM\_005543.2| Homo sapiens insulin-like 3 (Leydig cell) (INSL3),  
Mrna

### 2.5.1.3. Análisis mutacionales

Tomboc y cols, mediante el uso de SSCP, para realizar el tamizaje de las 2 regiones codificantes (exones) del gen INSL3, en muestras de ADN genómico obtenidas de 5 pacientes con criptorquidia y 36 controles masculinos, identificaron 2 mutaciones en casos y varias mutaciones en casos y controles (65).

Canto y cols, estudiaron el ADN genómico de 150 pacientes con criptorquidia idiopática. Una mutación asparagina 86 lisina fue encontrado en un paciente cuya

madre era una portadora heterocigota de la mutación y cuyo padre era homocigoto wildtype(14).

Ferlin y cols, secuenciaron los genes INSL3 y LGR8 en una cohorte de 87 pacientes con criptorquidia corregida y 80 controles y encontraron 3 mutaciones en el gen INSL3 en 4 pacientes y 1 mutación en el gen LGR8 (T222P) en 4 pacientes (8 de 87, el 9.2 %). Los autores concluyeron que mutaciones INSL3-LGR8 con frecuencia son asociadas con criptorquidia humana (21).

Referencia	Número de Controles	Mutaciones	Número de Casos	Mutaciones
(3) 2002	48	A60T (178G-A)	118	A60T (178G-A)
(14) 2003	50	(1167G-A)	150	(1167G-A)
		(1266G-A)		(1266G-A)
		(1318G-A)		(1318G-A)
				N86K (2560C-G)
(21) 2003	87	L9L (27G-A) 5%	87	L9L (27G-A) 3%
		A60T (178G-A) 47%		A60T (178G-A) 42.5%
		L42L (126G-A) 47%		L42L (126G-A) 57%
				P93L (278C-T) 4.6%. Heter
				R102C (304C-T) 4.6%. Heter
				R102H (305G-A) 4.6%. Heter
(24) 2004	100	L9L	135	L9L
		A24G		A24G
		A60T		A60T
		L42L		L42L
				P93L. Heter
				R102C. Heter
				R102H. Heter
(63) 2004	31	A9A (27G-A)	13	A9A (27G-A)
		A60T (178G-A)		A60T (178G-A)
		L42L (126G-A)		L42L (126G-A)
(76) 2006	60	A60T (178G-A)	62	A60T (178G-A)
		A9A (27G-A)		A9A (27G-A)
		A24A (72G-A)		A24A (72G-A)
(23) 2006	450	A24G	967	A24G
		V43L		V43L
		A60T		A60T
				R4H (11G-A)

				P93L
				R102C
				R102H
				R102C (304C-T)
				R102H (305G-A)
(29) 2007	270	L9L (27G-A)	109	L9L (27G-A)
		L42L (G126A)		L42L (G126A)
		A60T (G178A)		A60T (G178A)
				V18M
				R105H
				C19G

**Tabla 3. Mutaciones reportadas en la literatura para el gen INSL3.**

Heter: Heterocigotos.

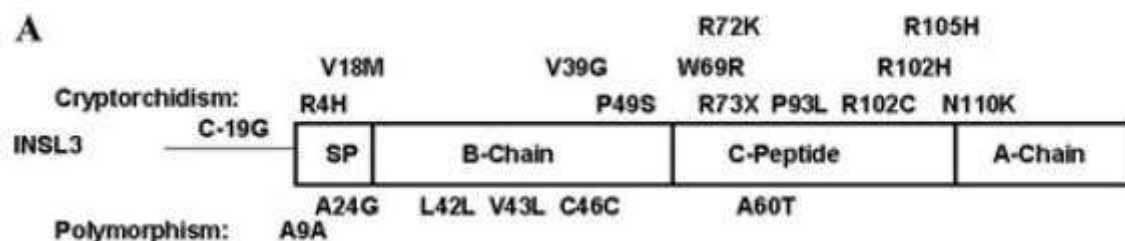


Figura 5. Mutaciones en el gen INSL3.

Esquema en el que se ilustran las mutaciones halladas en las secuencias del gen INSL3, tanto en pacientes como en controles (mostrándose sobre la estructura de la proteína). Tomado (19)

### 2.5.2. LGR8

**SIMBOLO OFICIAL:** RXFP2

**NOMBRE:** relaxin/insulin-like family peptide receptor 2 [*Homo sapiens*]

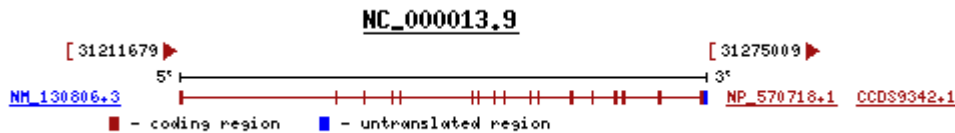
**OTRAS DESIGNACIONES:** G protein coupled receptor affecting testicular descent; G-protein coupled receptor 106; G-protein coupled receptor affecting testicular descent; leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 8; leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 8; relaxin family peptide receptor 2; relaxin receptor 2. GPR106, GREAT, INSL3R, LGR8, LGR8.1, RXFPR2

**CROMOSOMA:** 13; **LOCALIZACION:** 13q13.1

**ANOTACION:** Cromosoma 13, NC\_000013.10 (32313679..32377009)

**MIM:** 606655

Receptor 8 acoplado a la proteína G que contiene repeticiones ricas en leucina, también llamado GREAT (Figura 6) (receptor acoplado a la proteína G que afecta el descenso testicular), ha sido recientemente identificado (9, 32), compuesto por 18 exones. La longitud del RNAm es de 2838pb.



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=search&term=lgr8>

Figura 6. Gen LGR8

Análisis filogenéticos muestran que LGR8 es cercanamente relacionado a su ortólogo receptor en *Drosophila* DmLGR3 (32).

Es un miembro de la familia de las proteínas acopladas a la proteína G, ricas en repeticiones de leucina, que ejerce sus efectos celulares por la activación de la proteína G a partir de cascadas de segundos mensajeros (31). Ocho genes LGR han sido identificados, clasificados según su homología estructural: el grupo 1 (LGR1-3) comprende los receptores para la hormona luteinizante (LH), la hormona folículo estimulante y la hormona estimulante del tiroides (TSH), el grupo 2 consiste en los receptores huérfanos LGR4, el LGR5 y el LGR6 y el grupo 3 contiene los receptores para relaxina (LGR7) y LGR8 (30, 32).

Estos receptores se caracterizan por la presencia de un ectodominio extra celular largo (amino terminal), siete dominios transmembrana, característico de los receptores acoplados a la proteína G, un dominio intracelular (carboxiterminal). El ectodominio contiene varias repeticiones ricas en leucina las cuales tienen forma similar a una herradura. El extremo amino terminal de LGR7 y LGR8 contiene un modulo receptor LDL clase a, estabilizado por puentes de sulfuro y en coordinación con iones de calcio. Se ha demostrado que ambos dominios interactúan con un

ligando. Sin embargo mientras las repeticiones ricas en leucina involucradas en la unión han sido activamente estudiadas, el rol del módulo LDLa no es claro (8, 27).

LGR8 también conocido como receptor 2 de la familia de péptidos relaxina; RXFP2 (6) posee un alto nivel de semejanza con la secuencia de aminoácidos para LGR7 (RXFP1), ambos receptores contienen un dominio LDL, en el extremo amino terminal extracelular, seguidos de 10 repeticiones ricas en leucina y una región similar a una bisagra (32) (30). Datos experimentales considerables han manifestado que el péptido 3 similar a la insulina (INSL3), también conocido como el péptido similar a la insulina de células de Leydig (30, 36), es el ligando original para LGR8 (27, 48).

INSL3 se une con una alta afinidad al LGR8 recombinante transfectado en células fetales de riñón humano, en células 293T de fibroblastos, causando un aumento en la producción de AMPc(45). Adicionalmente ratones homocigotos para la delección del receptor génico LGR8, expresan criptorquidia (54).

LGR8 es expresado altamente en el *gubernaculum*, el ligamento que controla el movimiento testicular durante el desarrollo y por lo tanto puede ser responsable de mediar la señalización hormonal que afecta el descenso testicular (38).

### **2.5.2.1 Análisis mutacionales**

Gorlov y cols, realizaron un tamizaje mutacional del gen LGR8 en ADN de 60 pacientes criptorquídicos. Una mutación missense (A664C – T222P) en el ectodominio del receptor LGR8 fue identificada en un paciente. El receptor del mutante falló en responder al estímulo del ligando, implicando al gen LGR8 en la etiología en algunos casos de criptorquidia en humanos (27).

La mutación A664C (localizada en el exón 8), es la única mutación dentro del gene LGR8 asociado con el fenotipo de criptorquidia (8, 70, 76). Ha sido descrita en 5

pacientes: 1 paciente francés y otros 4 italianos. La mutación causa un cambio de una A por una C en el nucleótido 664 que causa una sustitución missense de tirosina a prolina en el aminoácido 222 (T222P). Esta mutación tiene consecuencias significativas sobre la función del receptor LGR8; disminuyendo la unión de la hormona INSL3 a su receptor en estudios *in vitro* (27).

Referencia	Número de Controles	Mutación	Número de Casos	Mutación
(21) 2003	87	No Hallada	87	T222P 9.2%
(24) 2004	100	No Hallada	135	T222P 3 %
(63) 2004	31	No Hallada	13	No Hallada
(76) 2006	60	No Hallada	62	No Hallada
(28) 2008	250	T222P 2.7%	109	T222P 1.6%

**Tabla 4. Reportes de la mutación A664C en el gen LGR8, en diferentes estudios.**

Controles	Pacientes	Mutaciones halladas en pacientes y controles	Mutación específica para paciente con criptorquidia	Posible caso familiar	Referencia
89	30	A60T Péptido C INSL3		7 total	Koskimies y cols 2000
9	30	A60T Péptido C INSL3			Krausz y cols 2000
36	145	A60T Péptido C INSL3	P93L Péptido C INSL3		
90			R73X	1?	Tomboc y cols 2000
30	65	A60T Péptido C INSL3			Marin y cols 2001
70	5	A60T Péptido C INSL3			Takahashi y cols 2001
82		A24G Péptido señal INSL3			Lim y cols 2001
29		V43L Cadena B INSL3			
29	24		P49S Cadena B INSL3		
126	85	A60T Péptido C INSL3			
82		R102H Péptido C INSL3			
48	118	A60T Péptido C INSL3			Baker y cols 2002
50	150	A60T Péptido C INSL3	N110K Cadena A INSL3	27	Canto y cols 2003
193	61	I604V Transmembrana LGR8	T222P Extremo N terminal		Gorlov y cols 2002
80	87	A60T Péptido C INSL3			Ferlin y cols 2003
			P93L Péptido C INSL3	1	
			R102H Péptido C INSL3		
			R102C Péptido C INSL3		
			T222P Extremo N terminal	1	
33	23	I604V Transmembrana		23	Roh y cols 2003

		LGR8			
31	13	A60T Péptido C INSL3		13	Feng y cols 2004
		I604V Transmembrana LGR8			

**Tabla 5. Mutaciones reportadas en la literatura en los genes INSL3 y LGR8. (7)**



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

Determinar las mutaciones presentes en el gen INSL3 e identificar la mutación A664C en el gen LGR8, en relación con la presencia o ausencia de criptorquidia de una muestra de pacientes colombianos.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Describir la variabilidad fenotípica de la criptorquidia en los casos estudiados.
2. Determinar la presencia de mutaciones en el gen INSL3 tanto en casos como en controles.
3. Determinar la presencia de la mutación A664C en el gen LGR8 tanto en casos como en controles.
4. Evaluar la asociación entre las mutaciones presentes en el gen INSL3 y la criptorquidia aislada.
5. Evaluar la asociación entre la mutación A664C en el gen LGR8 y la criptorquidia aislada.

## **4. METODOLOGÍA**

### **4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO**

Estudio de casos y controles.

El tamaño de la muestra se calculó utilizando el programa EPIINFO (casos y controles no apareados), con un valor de  $\alpha$  0,05 y un intervalo de confianza 95% OR.

### **4.2. PARTICIPANTES EN LA INVESTIGACIÓN**

Previa aprobación del protocolo de investigación por el comité de ética de la Universidad Nacional, se expusieron los protocolos en diferentes hospitales de la ciudad dentro de los cuales se encontraron; el Hospital de la Misericordia, el Hospital Tunal, el Policlínico del Olaya; previamente se contactó al urólogo pediatra o cirujano pediatra jefe de estas instituciones con quienes se discutió el protocolo y dieron aprobación al proyecto para presentarlo al comité de ética de estas instituciones.

Los comités de ética de las 3 instituciones recibieron el protocolo, lo analizaron y posteriormente a pesar de múltiples llamadas, el Policlínico del Olaya no respondió, no expresando respuesta de aceptación, ni de rechazo del estudio. El Hospital Tunal convocó a una reunión al investigador estudiante en donde se realizó una exposición del proyecto con la explicación de cada una de las dudas existentes al respecto, pero se recibió una respuesta negativa debido a que manifestaron no contar con un evaluador experto de la parte molecular y el uso del ADN, aduciendo que el protocolo y los consentimientos debían reevaluarse; se realizaron reformas al protocolo las cuales se enviaron de nuevo sin obtener aprobación por este comité de ética.

Con respecto al Hospital de la Misericordia, hubo un prolongado tiempo de espera para la aprobación del protocolo, por el comité de ética. Posterior a lograrse, el coordinador científico autorizó una búsqueda en las bases de datos de los pacientes que presentaran como impresión diagnóstica criptorquidia y o alteración del descenso testicular. Al encontrar estos pacientes, nos fue entregada la lista y el permiso correspondiente para revisar cada una de las historias clínicas de estos pacientes, se leyó la totalidad de historias clínicas, dentro de las cuales encontramos un gran número de pacientes con criptorquidia pero que adicionalmente presentaban otras alteraciones clínicas morfológicas asociadas; por lo cual se excluyeron del estudio. Al ser el Hospital de la Misericordia una entidad de referencia nacional (IV nivel de atención); la complejidad de sus pacientes llevó a que el número de pacientes con criptorquidia aislada no fuera el esperado.

Se logró la consecución de los correos electrónicos de los cirujanos pediatras de la asociación de cirugía pediátrica, se envió vía correo electrónico el protocolo a 80 cirujanos pediatras en diferentes ciudades del país, algunos de los cuales respondían. Pese a los esfuerzos, asuntos de tipo administrativo no permitieron aplicar el protocolo en sus instituciones. Excepto con el cirujano pediatra Dr. Santiago Rodríguez García del Hospital Universitario Erasmo Meoz en Cúcuta quien envió un total de 6 pacientes y 2 controles.

Se comentó el protocolo con urólogos de adultos quienes consideraron que la patología era más prevalente en la infancia.

Con respecto a los controles se abordaron en la consulta médica, quienes dentro de sus antecedentes patológicos y quirúrgicos no refirieran alteración del descenso testicular.

#### **4.2.1. Consideraciones éticas**

Los participantes fueron informados del estudio, se les explicó a los mayores de edad y en el caso de los menores de edad a sus padres o representantes legales, los objetivos del protocolo de investigación, el procedimiento a seguir con las muestras, el riesgo de la toma de muestra, el cual fue considerado mínimo y la importancia de su participación la cual sería, absolutamente voluntaria.

Se leyó y explicó a cada uno de los pacientes y controles el consentimiento informado correspondiente según la edad del participante. (ANEXOS 1,2,3,4).

Posterior a la resolución de dudas, la explicación y firma del consentimiento informado se procedió a llenar un cuestionario de los datos básicos y los relevantes para el estudio. Los participantes considerados como casos en el estudio, al cumplir con el requisito de aceptación, firmaron el consentimiento y se procedió a llenar un formato de datos clínicos en el cual se realizaba el árbol genealógico de aquellos casos que manifestaran una historia clínica familiar de criptorquidia.

#### **4.2.2. Consideraciones de bioseguridad**

Tanto a casos como a controles se les extrajeron, 3 cc de sangre periférica en un tubo tapa lila con EDTA. Posterior a recolectar la muestra los productos derivados de la toma y procesamiento de la misma se descartaron en condiciones especiales, para protección del personal que realizó el procedimiento y del medio que lo rodea, evitando posible contacto con otros humanos.

Las agujas se descartaron en contenedores rígidos de paredes imperforables “guardianes”, los tubos, guantes y demás materiales de laboratorio, se recolectaron en bolsas rojas de material biológico, según las indicaciones establecidas por el Ministerio de la Protección Social y la Secretaria Distrital de

Salud, para finalmente ser descartados por una empresa contratada por la Universidad para tal fin.

#### **4.2.3 Criterios de selección de los participantes**

Los participantes en el estudio fueron 252 hombres de los cuales 52 presentaron al nacimiento alteración en el descenso testicular que no se resolvió durante los primeros 12 meses de vida y 200 hombres que presentaron normal descenso de los testículos al nacimiento.

#### **CRITERIOS DE INCLUSIÓN PARA LOS CONTROLES**

1. Hombres de cualquier edad con normal descenso de los testículos. Sin presencia de malformación externa.

#### **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN PARA LOS CONTROLES**

1. Antecedente familiar de criptorquidia.
2. Controles que no aceptaran firmar el consentimiento informado.

#### **CRITERIOS DE INCLUSIÓN PARA LOS CASOS**

1. Pacientes con criptorquidia intra abdominal aislada no sindrómica.
2. Pacientes con criptorquidia inguinal aislada no sindrómica.
3. Hombres de cualquier edad con la presencia de los criterios de inclusión para los casos 1 y/o 2.

#### **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN PARA LOS CASOS**

1. Niños menores de 1 año con antecedente de: prematuridad y/ o bajo peso para la edad gestacional.

2. Exposición materna a estrógenos durante el primer trimestre.
3. Pacientes con testículos retráctiles.
4. Pacientes con hipogonadismo hipo o hiper gonadotrófico sintomático.
5. Pacientes con antecedente de criptorquidia intra-abdominal sin evidencia médica de la presencia del testículo en la cavidad abdominal.
6. Pacientes que no aceptaron firmar el consentimiento informado.

### **4.3. MUESTRAS**

Las muestras de sangre periférica de los participantes se recolectaron en tubos que contienen EDTA como anticoagulante.

En ningún caso se utilizó heparina como anticoagulante por el riesgo inhibir la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Siguiendo el protocolo de toma de muestra del laboratorio de Genética del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia:

Todo el procedimiento se realizó con las prácticas adecuadas de asepsia para asegurar la calidad de la muestra.

1. Se prepararon los elementos necesarios para la extracción de la muestra: algodón impregnado de alcohol antiséptico, algodón seco, torniquete o esfigmomanómetro, jeringa desechable de 3 ml, aguja desechable No 21 o 22 estéril, esparadrapo (para rotulación de la muestra), guantes desechables.
2. Tubos con EDTA tapa violeta de 5, 7 o 12 cc.
3. Se tomaron al paciente los datos para realizar una adecuada identificación de la muestra: nombre, documento de identidad, fecha de nacimiento, nombre y documento de identificación de los padres (en caso de menores de edad), procedencia, ocupación, dirección y número telefónico, entidad o médico que remitió al paciente, impresión diagnóstica.
4. Se seleccionó el sitio para tomar la muestra: región venosa ante cubital, o región venosa superficial del dorso de la mano.

Las muestras de los participantes considerados casos para el estudio adicional a la muestra en el tubo de EDTA, se realizó goteo de sangre total en tarjetas de FTA 1 por cada uno de los individuos, como una forma de realizar un archivo de las muestras en caso de pérdida o daño del ADN extraído de las muestras de sangre total, debido a que estas se tomaron en diferentes momentos en el transcurso de 2 años.

#### **4.4. EXTRACCIÓN DE ADN**

La extracción a partir de sangre periférica se realizó por medio de dos metodologías, los primeros 100 controles se extrajeron con la metodología de “salting out” (49), la cual se fundamenta en una ruptura de membranas y precipitación de proteínas por medio de sales y se tomó el total de sangre. Los restantes 100 controles y los 52 casos fueron extraídos con el Kit comercial Kit extraction ADN Ultra Clean DNA Blood Isolation Kit Catálogo No. 12000-100 Mo-Bio. Extracciones a partir de 300  $\mu$ L de sangre total.

En los casos en los que la muestra de ADN extraída de sangre no fue suficiente, se realizó extracción de la tarjeta FTA.

#### **4.5. CUANTIFICACIÓN DE ADN**

Cada una de las muestras obtenidas fue cuantificada en el nanoDrop 2000, el cual posee un espectrofotómetro UV-Vis que cubre un rango espectral de 220 a 750 nm (Figura 7 y 8).

Se utilizó 1  $\mu$ L de muestra de ADN, obteniéndose para cada una:

1. Concentración.
2. Control de la pureza del ADN por medio del cálculo directo de las relaciones A260/A280 y A260/A230.

Con estos resultados se determinó qué muestras serían utilizadas para amplificación en la concentración inicial, qué muestras se diluirían para la PCR y qué muestras debían extraerse de nuevo.

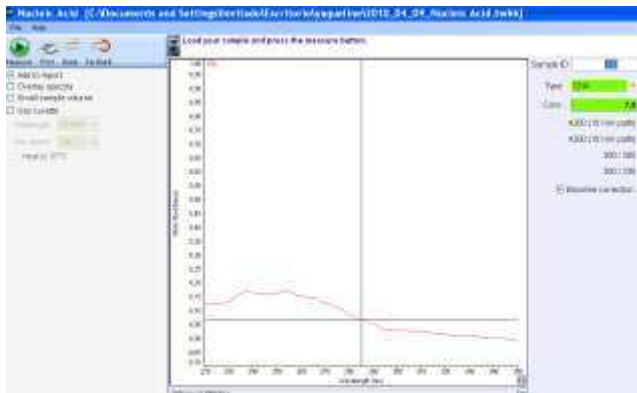


Figura 7. Cuantificación en NanoDrop2000. Se observa la curva de ADN de la muestra control 150 en la que hay 7.5 ng/mL.

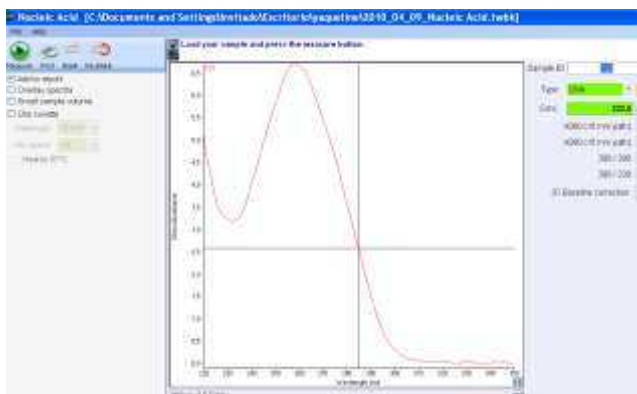


Figura 8. Cuantificación en NanoDrop2000. Se observa la curva de ADN de la muestra control 122 en la que hay 333 ng/mL.

#### 4.6. AMPLIFICACIÓN DE LOS EXONES 1 Y 2 DEL GEN INSL3

##### 4.6.1. PCR

Se amplificaron los segmentos de los exones 1 y 2 del gen INSL3 según los “primers” previamente publicados (15, 18, 53) (Tabla 6).

INSL3	EXON 1	EXON 2
FORWARD	5'CTCGTTGCCAGTGCTCCC3'	5'GGATTCTGCACATGCAGC3'
REVERSE	5'CATGCAAACCTGCCACC3'	5'GGCCTGTAGATGCGAGAC3'

**Tabla 6. Primers para el Gen INSL3**



Se trabajó a un volumen final de 40  $\mu$ L que contiene 400 ng de ADN genómico, bajo las siguientes condiciones de preparación del amplificado y del termociclador.

#### **4.6.2. Condiciones para PCR y programa de PCR**

Se utilizaron las siguientes concentraciones de reactivos para cada uno de los exones (Tabla 7). Se aplicaron los protocolos específicos en el termociclador para cada uno de los exones (Tablas 8 y 9).

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	
		Exón 1	Exón 2
Buffer	10X	1X	1X
Primer Forward	10 $\mu$ M	8 $\mu$ M	8 $\mu$ M
Primer Reverse	10 $\mu$ M	8 $\mu$ M	8 $\mu$ M
dNTPs	4 $\mu$ M	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub>	50Mm	1,5mM	1,5mM
Taq Polimerasa	50U/ $\mu$ L	1U	1U
DNA	50ng/ $\mu$ L	200ng	200ng

**Tabla 7. Concentraciones de reactivos para PCR del gen INSL3.**

1.	1 ciclo	95°C	5 minutos
2.	35 ciclos	95°C	1 minuto
		68.3 °C	30 segundos
		72°C	1 minuto
3.	1 ciclo	72°C	5 minutos
4.	1 ciclo	4°C	$\alpha$

**Tabla 8. Protocolo del termociclador para el exón 1 del gen INSL3.**

1.	1 ciclo	95°C	5 minutos
2.	35 ciclos	95°C	1 minuto
		59.5 °C	30 segundos
		72°C	1 minuto
3.	1 ciclo	72°C	5 minutos
4.	1 ciclo	4°C	$\alpha$

**Tabla 9. Protocolo del termociclador para el exón 2 del gen INSL3.**

### **4.6.3. Secuenciación**

Los amplificadores obtenidos del exón 1 y 2 del gen INSL3, fueron enviados para secuenciación a la empresa Macrogen donde previa purificación, fueron procesadas en el Secuenciador automático de ácidos nucleicos “3730 DNA Analyzer” de Applied Biosystems. Con el primer forward de cada una de las secuencias Exón 1. 5'CTCGTTGCCAGTGCTCCC3', Exón 2 5'GGATTCGTGCACATGCAGC3' y 5 muestras fueron secuenciadas con el primer reverse para cada uno de los exones.

La secuenciación nos permitió determinar el orden de los nucleótidos (A,C,G y T) en los oligonucleótidos de ADN.

### **4.6.4. Análisis de secuencias**

Al recibir las secuencias correspondientes a los amplificadores analizados se procedió a:

1. Se revisaron los electroferogramas en formato pdf.
2. Se llevó a cabo el alineamiento inicial de nucleótidos con la secuencia reportada en NCBI para el gen INSL3, exones 1 y 2. En el programa Bioedit se editaron los alineamientos y se analizaron las secuencias.
3. Se descartaron las secuencias fallidas.
4. Se determinaron los cambios a nivel de los nucleótidos.
5. Se convirtieron las secuencias de nucleótidos a secuencia de proteína.
6. Se analizaron las secuencias de proteínas.
7. Se determinaron de los cambios en la proteína.

#### **4.7. AMPLIFICACIÓN PCR ALELO ESPECÍFICA DE LA MUTACIÓN A664C EN EL GEN LGR8**

ARMS-PCR. Amplification Refractory Mutation System-PCR, es un sistema que permite analizar una mutación puntual conocida en el DNA, a través de la generación de iniciadores específicos para la mutación (corriente arriba ó corriente abajo) que tan solo varían, con respecto a un iniciador para la secuencia silvestre, en la última base del extremo 3'. Este sistema permite genotipificar simplemente por inspección de las reacciones de mezcla después de la electroforesis en gel de agarosa (65).

##### **4.7.1. Diseño de primers**

Para este gen se diseñaron los primers (Tabla 10) con los cuales se realizó la amplificación alelo específica, debido a la ausencia de primers reportados en la literatura para esta mutación con esta metodología.

Los primers se diseñaron utilizando el programa primer3, el cual es de libre acceso por internet en el siguiente link: [http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)

Las secuencias de referencia fueron descargadas del GeneBank con el código de acceso NC\_000013.10, la secuencia que fue hallada dentro del rango adecuado, para esta variable polimórfica en primer3. Fue enfrentada al genoma humano a través del programa BLAST, al cual se accede a través del portal en internet del NCBI, de modo que se lograra garantizar la especificidad de los primers hacia la secuencia objetivo.

LGR8 EXON 8	Mutación A664C
FORWARD WT	5'CAGAATTCTAGATGACAATCCAATAA3'
FORWARD MUTADO	5'CAGAATTCTAGATGACAATCCAATAC3'
REVERSE	5'CTGGTCAGCTCTCCCTTTG3'

**Tabla 10. Primers para la mutación A664C del gen LGR8.**

Se trabajó a un volumen final de 12.5  $\mu$ L que contiene 100 ng de ADN genómico, bajo condiciones específicas de preparación del amplificado y del termociclador.

#### **4.7.2. Condiciones para PCR y programa de PCR**

Se utilizaron las siguientes concentraciones de reactivos para la amplificación de la mutación A664C del gen LGR8 (Tabla 11). Se aplicó el siguiente protocolo en el termociclador para esta mutación (Tabla 12).

Reactivo	Concentración Inicial	Concentración final
Buffer-MgCl <sub>2</sub>	10X	1X
Primer Forward	10 $\mu$ M	8 $\mu$ M
Primer Reverse	10 $\mu$ M	8 $\mu$ M
dNTPs	4 $\mu$ M	200 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub>	50mM	1,5mM
Taq Polimerasa	50U/ $\mu$ L	1U
DNA	50ng/ $\mu$ L	200ng

**Tabla 11. Concentraciones de reactivos para la mutación A664C del gen LGR8.**

1.	1 ciclo	95°C	5 minutos
2.	35 ciclos	95°C	1 minuto
		63 °C	30 segundos
		72°C	1 minuto
3.	1 ciclo	72°C	5 minutos
4.	1 ciclo	4°C	$\alpha$

**Tabla 12. Protocolo del termociclador para la mutación A664C del gen LGR8.**

Los amplificadores fueron separados en agarosa al 2%, utilizando el marcador de peso molecular (GeneRuler™ 100pb DNA Ladder, Fermentas).

#### **4.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Una prueba de chi<sup>2</sup> fue realizada para evaluar diferencias entre los pacientes con criptorquidia y los controles con respecto a cada uno de las mutaciones halladas en los exones 1 y 2 del gen INSL3.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se contó con la participación de 252 sujetos de estudio.

#### 5.1.1. Controles

El número de controles obtenidos fue de 200 individuos, de género masculino, procedentes de Bogotá en su mayoría, naturales de diversos sitios demográficos de Colombia. De edades que oscilaron entre 1 año y 55 años de edad (Figura 9).

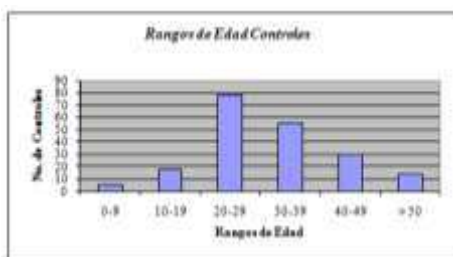


Figura 9. Rangos de edad de los controles estudiados.

Entre los controles analizados se encontraron individuos con hijos en un 45% y sin hijos 52% el restante 3% corresponden a controles menores de edad (Figura 10).



Figura 10. Fertilidad de los controles estudiados.

### 5.1.2. Casos

Número: 52 individuos.

Los casos oscilaron en edades entre 1 a 49 años. La distribución de las edades por el número de casos es mostrada en la figura 11.



Figura 11. Rangos de edad en los casos estudiados.

El tipo de criptorquidia que presentó nuestro grupo de casos fue unilateral en un 75% (N.39) y bilateral en un 25% (N.13) (Figura 12).



Figura 12. Tipo de criptorquidia.

Con respecto a la localización del testículo un 84,62% (N. 44) fue hallado a nivel inguinal, el 11,54% (N. 6) de los casos fue localizado a nivel Intra-abdominal y un 3,85% (N.2), presentaron un testículo a nivel intra-abdominal y el otro a nivel inguinal. (Figura 13).

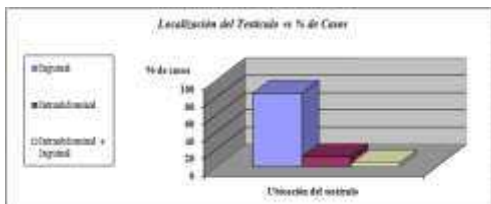


Figura 13. Localización del testículo vs porcentaje de casos.

Al ser la población de casos en su mayoría menores de 18 años, el 88,46% de los pacientes aún no tiene hijos y el restante 11,54% tiene uno o dos hijos (Figura 14)

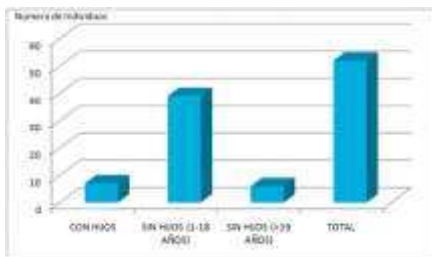


Figura 14. Número de pacientes con hijos y sin hijos.

De los casos estudiados el 17,31% (N.9) presentó antecedente familiar de criptorquidia en primer grado (N 8) y en segundo grado (N 1). Los casos restantes negaron historia familiar con esta patología (N.43) (Figura 15).

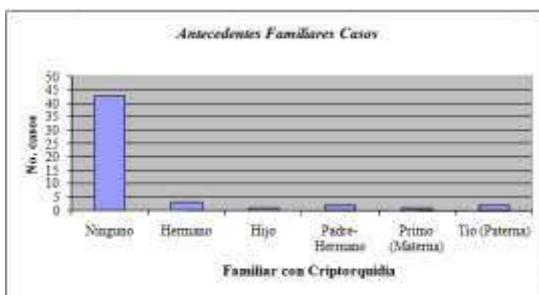


Figura 15. Antecedentes familiares de criptorquidia en los casos.

El 11,54% de los pacientes no se había sometido a tratamiento quirúrgico, el restante 88,46% se ha practicado al menos 1 procedimiento quirúrgico para lograr la normal localización del testículo y/o evitar complicaciones futuras (Figura 16).

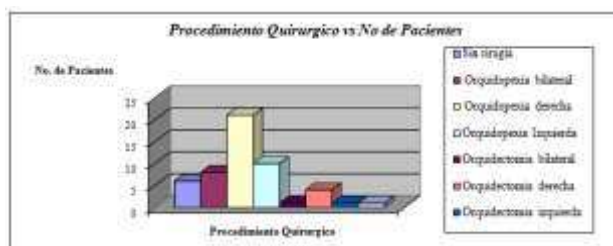


Figura 16. Procedimiento quirúrgico vs número de pacientes.

## 5.2. GEN INSL3

### 5.2.1. Amplificados de PCR

Los amplificados se observaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%, utilizando bromuro de etidio como reactivo de tinción de ADN, verificándose el tamaño de los amplificados (Figuras 17 a 21).

#### 5.2.1.1. Exón 1



Figura 17. Amplificación del Exón 1 del gen INSL3 en controles.

Fotografía de la amplificación del exón 1, en controles. Fuente: La autora. El gel muestra los amplificados de controles para el exón 1 del gen INSL3, una banda de 492 pb, para las muestras 1, 4, 9, 10, 11, 12, 14, 18, 22, 26, 31, 32, 33, 34, 36, 77. En este ensayo no se obtuvieron los amplificados para los controles 7, 16, 23, 35, 72. No se observa banda en el blanco (b), hay 2 carriles de marcador de peso molecular (100pb por cada banda) que corroboran el tamaño de la banda (ladd).

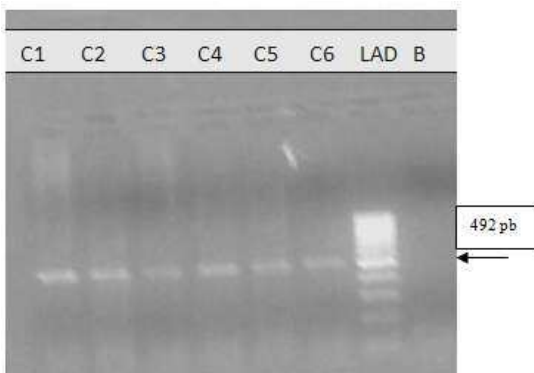


Figura 18. Amplificación del Exón 1 del gen INSL3 en casos.

Fotografía de la amplificación del exón 1, en casos. Fuente: La autora. Gel de algunos de los casos amplificados para el exón 1, donde se observa la banda de 492 pb esperada, no hubo amplificación del control negativo (B), se observa 1 carril con el marcador de peso molecular (LAD).



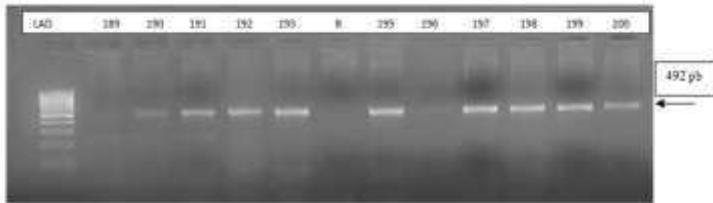


Figura 19. Amplificación del Exón 1 del gen INSL3 en controles.

Fotografía de la amplificación del exón 1 en controles. Gel en el que se observan amplificaciones del exón 1 de algunos de los controles, se observa una banda en las muestras 190, 191, 192, 193, 195, 197, 198, 199, 200, bandas muy tenues para las muestras 189 y 196, las cuales se repitieron posteriormente, el marcador de peso molecular (LAD), permite corroborar el peso de la banda 492pb.

### 5.2.1.2. Exón 2

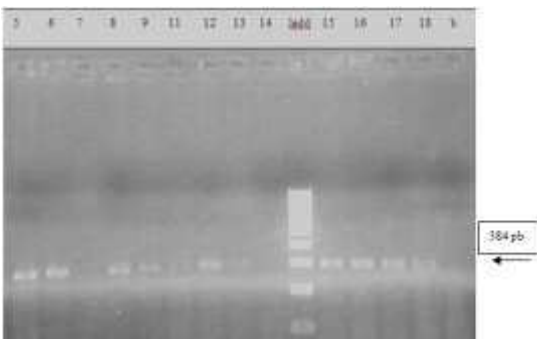


Figura 20. Amplificación del Exón 2 del gen INSL3 en controles.

Fotografía de la amplificación del exón 2, en controles. En este gel se observan los amplificados de los controles 5, 6, 8, 9, 11, 12, 15, 16, 17, 18. No hay banda en el control negativo (b). No hay amplificación satisfactoria de los controles 7, 13, 14, los cuales se repitieron posteriormente. Se observa que el peso de la banda corresponde a 384 pb al ser comparada con el marcador de peso molecular (ladd).

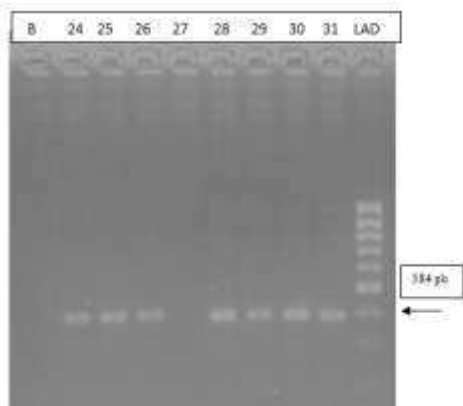


Figura 21. Amplificación del Exón 2 del gen INSL3 en casos.

Fotografía de los amplificadores del exón 2, en casos. Gel del exón 2 donde se observan amplificadores de los controles 24, 25, 26, 28, 29, 30, 31, no se observa amplificador en la muestra 27, se corrobora con la presencia del marcador de peso molecular (LAD) la banda de 384 pb.

Posterior a observar los amplificadores en el gel de agarosa se procedió a almacenar cada uno de los amplificadores con un volumen final de 40  $\mu$ L para ser enviados a la empresa MacroGen en donde fueron purificados y secuenciados.

Hubo dificultades con la obtención de los amplificadores para el exón 1, debido a que a pesar de haberse estandarizado la PCR, en ocasiones no se lograba el amplificador en muestras que sí presentaban un normal amplificador para el exón 2, requiriendo en múltiples ocasiones repetir la PCR hasta obtener el amplificador esperado. Se enviaron a secuenciar 48 muestras para el exón 1 de los 52 casos recolectados, dado que en los casos 48 a 52 no fue posible obtener el amplificador, las restantes secuencias fueron enviadas en su totalidad.

### **5.2.2. Secuenciación**

A pesar de los múltiples cuidados tenidos para la realización de la PCR y la adecuada amplificación de los exones buscados, hubo secuencias fallidas en los resultados obtenidos.

La extensión y calidad de la secuencia depende en gran medida de la calidad y pureza de la muestra, de modo que el ADN que se secuencie debe encontrarse libre de ARN, fenol, sales, etanol, EDTA, proteínas. Adicionalmente es necesario que un solo fragmento de ADN se observe en el gel, por lo cual, para el envío de las muestras esto fue confirmado en el gel de agarosa al 2% y el servicio de purificación fue contratado con la empresa que secuenció las muestras. Con respecto a los controles también hubo secuencias fallidas en donde a diferencia de los casos el número final de controles secuenciados fue mayor.

De los amplificados enviados se obtuvo secuencias adecuadas para cada uno de los exones como se observa en las tablas 13 y 14.

Primer	CASOS	CONTROLES
Primer	CASOS	CONTROLES
Reverse	Porcentaje de secuencias adecuadas ()	Porcentaje de secuencias adecuadas ()
EXON 1	22/48 (45,8%)	157/200 (78,5%)
EXON 2	39/52 (75%)	178/200 (89%)

**Tabla 13. Porcentaje de secuencias adecuadas primer reverse.**

Primer	CASOS	CONTROLES
Forward	Porcentaje de secuencias adecuadas ()	Porcentaje de secuencias adecuadas ()
EXON 1	5/5(100%)	5/5(100%)
EXON 2	5/5(100%)	5/5(100%)

**Tabla 14. Porcentaje de secuencias adecuadas primer forward.**

Tanto en la población de casos como de controles se encontraron las mutaciones G89A, G100C, G178A, G276C, descritas en las tablas 15 y 16.

Exón	Nucleótido	Aminoácido	Localización	Número de pacientes	%	Número de controles	%	prueba $\chi^2$
1	G89A	R30H	Cadena B	1	4,55	5	3,18	0,7398
1	G100C	G35R	Cadena B	2	9,09	1	0,63	0,0038
1	G178A	A60T	Péptido C	8	36,36	35	47,77	0,5463
2	G276C	Q92H	Péptido C	2	5,26	4	2,34	0,1253

**Tabla 15. Mutaciones halladas tanto en pacientes como en controles.**

Mutaciones	Cambio de aminoácido	Grupo R
R30H	Arginina/Histidina	Con carga positiva/Con carga positiva
G35R	Glicina/Arginina	Átomo de Hidrogeno/Con carga positiva
A60T	Asparagina/Treonina	Polar / Polar
Q92H	Glutamina/Histidina	Polar/ Con carga positiva

**Tabla 16. Cambio de aminoácido en las mutaciones halladas en controles y casos vs cambios con relación a su cadena lateral R.**

## MUTACIONES EN CASOS

Para el exón 1, 2 variantes de nucleótido fueron halladas dentro del grupo de pacientes.

1. Caso 45. Paciente de 29 años de edad con antecedente de criptorquidia inguinal derecha, orquidopexia a los 7 años de edad.

Se observó un cambio de una T por una G en la posición 26 (T26G).

Este cambio significó una sustitución de CTG (codifica para una leucina) por CCG (codifica para una arginina), ocasionando una mutación missense en el aminoácido (L10R).

Leucina (L) Arginina (R)

Leucina aminoácido grupo R no polar

Arginina aminoácido grupo R con carga negativa

ATGGACCCCGTCTGCCCGCCTGGGCACGGGTGCTGCTGGGCCCTGCCCTG  
GTGTTGCGGTTGGGCCCGCGCCACCCAGAGATGCGTGAGAAGTTGTGC

GGCCACCACTTCGTACGCGCGCTAGTGCGCGTGTGCGGGGGCCCCCGCTG  
 GTCCACCGAAGCCAGGAGGCCTGCGGCCGGAGGCGAC

```

+2  E D F R L F A V A R V L L C F A L V F A
1  ATGACCCCGC GTTTCGCCCT CTGGGACCGG TGTCTGCTTG GCCTTCCGCT GHTTTCGCG
   TACTTGGGGG CAGACGGGCG GACCCGTGGC CACACAGACT CCGACCGGGA CCAAGAGCC

+5  L Q P A P T P E R R E K L C G H R F V R
61 TTGGGCCCCG CCGCCACCCC AGAATGCTT GAGAAGTTT CCGGCCACCA CTTCCATCC
   AACCCCGGGC GGGGTTGGG TCTCTAGCA CTCTTAAKA CCGCGTGGT GAAGCATGC

+9  A L V R V C S G P R H E T E A R R P A
121 GCGCTATGTC GCTTTCGCGG GGGCCCCGCG TGTTCACCG AACCCAGGAG GCTTTCGCGC
   CCGATCCAG CACACAGCC CCGGGGGGG ACCAGTGGC TGGGTCTC CCGACCGGCG

+2  S G D
181 GAGGCGAC
   CTTCCGCTG
  
```

Figura 22. Proteína, ADN mutación L10R (T26G).

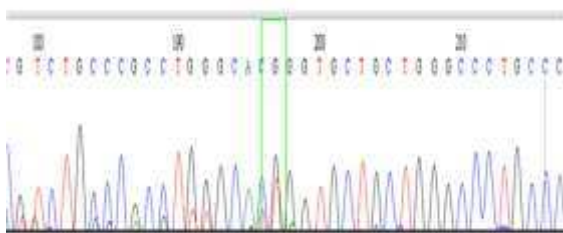


Figura 23. Electroferograma mutación L10R (T26G).

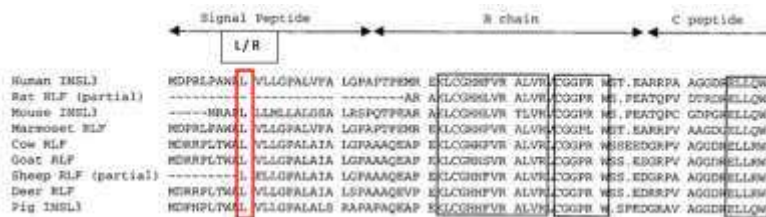


Figura 24. Localización de la mutación L10R (T26G) en la proteína. Alineamiento multi-especies.

2. Caso 31. Paciente de 21 meses con antecedente de criptorquidia inguinal bilateral, orquidopexia bilateral a los 21 meses de edad.

Se observó un cambio de una C por una T en la posición 77 (C77T).

Este cambio significó una sustitución de CCA (codifica para prolina) por CTA (codifica para una leucina), ocasionando un cambio en el aminoácido (P27L).

Prolina (P) Leucina (L)

Prolina aminoácido grupo R no polar.

Leucina aminoácido grupo R no polar.

ATGGACCCCGTCTGCCCGCCTGGTCACTGGTGCTGCTGGGCCCTGCCCT  
 GGTGTTTCGCGTTGGGCCCCGCGCCACCC<sup>T</sup>AGAGATGCGTGAAAAGTTGT  
 GCGGCCACCACTTCGTACGCGCGCTAGTGCGCGTGTGCGGGGGCCCCCGC  
 TGGTCCACCGAAGCCAGGAGGCCTGCGGCCGGAGGCGAC

```

43 H E P F H I L F A W D L V E L G P A L V F A
1 ATGGACCCCGTCTGCCCGCCTGGTCACTGGTGCTGCTGGGCCCTGCCCT
TAGCTNNSNS CADACGNSNS GACCAATGAG CAGACTGACC CAGGACGNSA CCACAGNSC
43 L G F A P T L E E H E E L C G H F V E
61 TTGGGCCCGG CGCCACCCY AGAGATGCGT GAAAAGTTGT GCGGCCACCA CTTCGTACGC
AACCCGNSNS HGGGNSNSA TCTTAGGCA CTTTTLACA CNGGNSNSY GAAAGATGCG
43 A L V R V C D D P H N B T E A R R F A A
121 GCGCTAATGC GCTGTGCGG GCGCCCGCCT TGTTCACCG AAGCAGNSA GCGTCCGNSC
CGCATACG CGACACGCG CCGGNSNSG ACCAGTGGC TTGGTCTC GAGACGNSG
43 H E P
181 GAAGNSAG
CCTCCGCTG
  
```

Figura 25. Proteína, ADN mutación P27L (C77T).

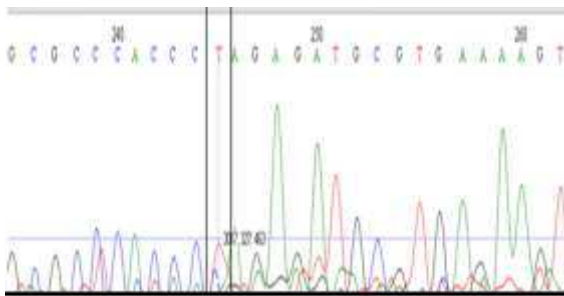


Figura 26. Electroferograma mutación P27L (C77T).

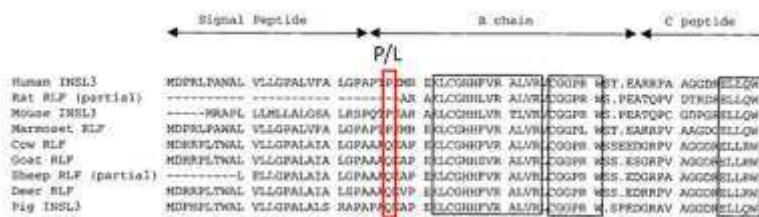


Figura 27. Localización de la mutación P27L (C77T) en la proteína. Alineamiento multi-especies.

## EXÓN 2

Para el exón 2, 6 variantes de nucleótido fueron halladas dentro del grupo de pacientes.

1. Caso 50. Paciente de 5 años de edad con antecedente de criptorquidia intra-abdominal bilateral, orquidopexia en 2 tiempos quirúrgicos a los 11 meses y 2 años de edad.

Se observó un cambio de una T por una A en la posición 260 (T260A)

Este cambio significó una sustitución de CTG (codifica para una leucina) por CAG (codifica para una glutamina), ocasionando un cambio en el aminoácido (L87Q).

Leucina (L) Glutamina (Q)

Leucina aminoácido no polar.

Glutamina aminoácido polar.

```
TCCAACACAGGGACCTGGCCTGCAGCCCCTGCCCAAACCTCTCACCATCAC
CGCCACCACCGTGCAGCTGCCACCAACCCTGCACGCTACTGCTGCCTCAGTG
GCTGTACCCAACAAGACCTGCTGACCCTCTGTCCCTAC
```

```
      P T Q G P S L Q P L P O T S E H H
OCAAACAGG GACCTGGCT GCAGCCCCTG CCCAAACCT CTCACCATCA
GGTTGTGCC CTGGACCGGA CGTGGGGAC GGGGTTGGA GAGTGGTAGT
+2 R H E R A A A T N P A E Y C C L E G C T
41 CCGCCACCAC CGTGCAGCTG CCACCAACC TGCACGCTAC TGCTGCCTCA GTGGCTGTAC
GGCGGTGGTG CCACGTGCAC GGTGGTGGG ACGTGGGATG ACGACGGAGT CACCGACATG
+2 Q Q D L L T L C P Y
121 CCAACAAAGC CTGCTGACCC TCTGTCCCTA C
GGTTGTTCTG GACGACTGGG AGACAGGGAT G
```

Figura 28. Proteína, ADN mutación L87Q (T260A) Caso 50.

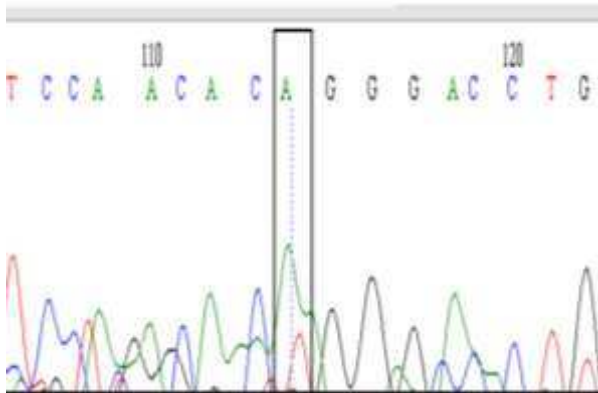


Figura 29. Electroferograma de la mutación L87Q (T260A) Caso 50.

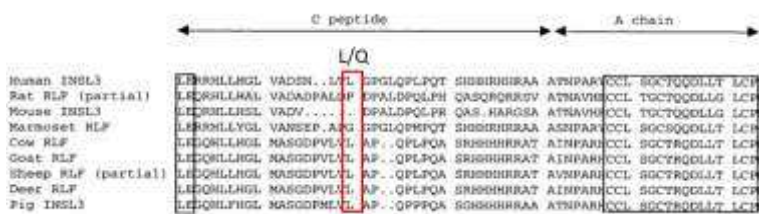


Figura 30. Localización de la mutación L87Q (T260A) en la proteína (Caso 50).

Alineamiento multi-especies.

2. Caso 51. Paciente de 41 años de edad con antecedente de criptorquidia intra abdominal bilateral, orquidopexia bilateral a los 7 años de edad. Se observó un cambio de una T por una A en la posición 260 (T260A). Este cambio significa una sustitución CTG (codifica para una leucina) por CAG (codifica para una glutamina), ocasionando un cambio en el aminoácido (L87Q).

Este paciente tiene 2 hijos con criptorquidia. Que no fueron analizados para la mutación, pero consideramos que es un caso de excepcional importancia y debe buscarse la asociación entre la patología y la presencia de la mutación intra-familiarmente.

Leucina (L) Glutamina (Q)

Leucina aminoácido no polar.

Glutamina aminoácido polar.



TCTCACACAGGGACCTGGCCTGCAGCCCCTGCCCAAACCTCTCACCATCAC  
 CGCCACCACCGTGCAGCTGCCACCAACCCTGCACGCTACTGCTGCCTCAGTG  
 GCTGTACCCAACAAGACCTGCTGACCCTCTGTCCCTAC

```

      P T Q G P Q L Q P L P Q T S E R R
      CCAACACAGG GACCTGGCCT GCAGCCCCT GCCCAAACCT CTCACCATCA
      GGTGTGTCCT CTGGACCGGA CGTCGGGGAC GGGGTTTGGG GAGTGTAGT
+2 R H E R A A A T N P A E Y C C L S G C T
  61 CCGCCACCAC CGTGCAGCTG CCACCAACCCT TGCACGCTAC TGCTGCCTCA GTGGCTGTA
      GCGGTGGTGG CACGCTGCAC GGTGGTTGGG ACGTGGGATG ACGACGGAGT CACCGACATG
+2 Q Q D L L T L C E Y
 121 CCAACAAAGC CTGCTGACCC TCTGTCCCTA C
      GGTGTGTCCT GACGACTGGG AGACAGGGAT G
  
```

Figura 31. Proteína, ADN mutación L87Q (T260A) Caso 51.

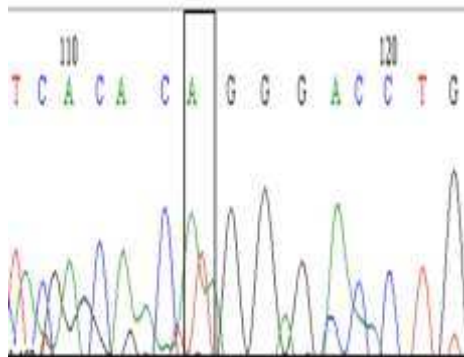


Figura 32. Electroferograma mutación L87Q (T260A) Caso 51.

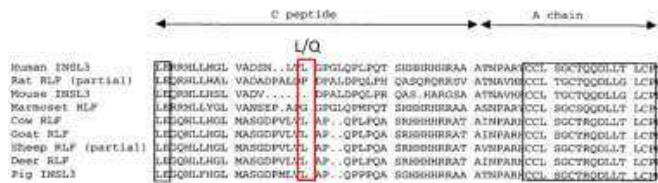


Figura 33. Localización de la mutación L87Q (T260A) en la proteína (Caso 51).

Alineamiento multi-especies.

3. Caso 52. Paciente de 2 años de edad con antecedente de criptorquidia inguinal bilateral, pendiente tratamiento quirúrgico.

Se observó un cambio de una G por una C en la posición 319 (G319C).

Este cambio significó una sustitución GCT (codifica para una alanina) por CCT (codifica para una prolina), ocasionando un cambio en el aminoácido (A107P).

Alanina (A) Prolina (P)

Alanina aminoácido no polar.

Prolina aminoácido no polar.

TTCTTACACTGGCCCCTGGCCTGCAGCCCCTGCCCAAACCTCTCACCATCA  
CCGCCACCACCGTGCACTGCCACCAACCCTGCACGCTACTGCTGCCTCAGT  
GGCTGTACCCAACAAGACCTGCTGACCCTCTGTCCCTAC

```
+3      F L T L A P G L Q P L P O T S H H  
1      TTTTACACT GGGCCCTGGC CTGCAGCCCCTGCCCAAACCTCTCACCAT  
      AAGAAATGTGA CCGGGGACCG GACGTGGGGG ACGGGGTTTG GAGAAATGTGA  
+3      H R N H R A P A T N P A R Y C C L E G C  
61      CACCGCCACC ACCGTGCACC TCCACCAAC CCTGCAGCCT ACTGCTGCCT CAGTGCCT  
      GTGCGGGTGG TGGCACCTGG ACGGTGGTTG GAGCCTGCGA TGACGACGGA GTCAACGACA  
+3      T O Q D L E T L C P Y  
121      ACCCAACAAG ACCTGCTGAC CCTCTGTCCC TAC  
      TGGGTTTGTTC TGGACCACTG GAGACACGGG ATG
```

Figura 34. Proteína, ADN mutación A107P (G319C).

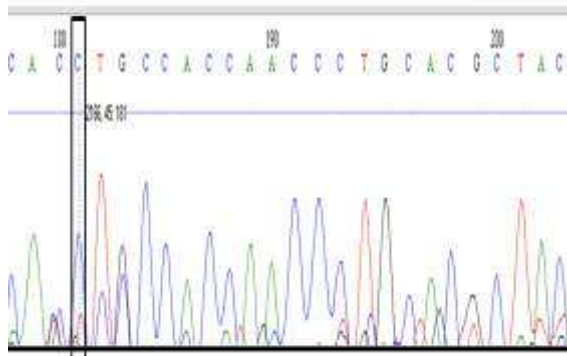


Figura 35. Electroferograma de la mutación A107P (G319C).

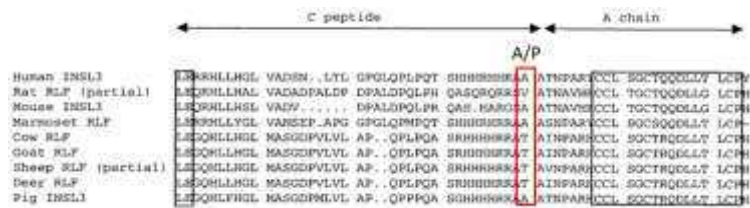


Figura 36. Localización de la mutación A107P (G319C) en la proteína. Alineamiento multi-especies.

4. Caso 49. Paciente de 48 años de edad con antecedente de criptorquidia inguinal derecha, orquidectomía derecha a los 48 años.

Se observó un cambio de una C por una T en la posición 278 (C278T).

Este cambio significó una sustitución CCC (codifica para una prolina) por CTC (codifica para una leucina), ocasionando un cambio en el aminoácido (P93L).

Prolina (P) Leucina (L)

Prolina aminoácido no polar.

Leucina aminoácido no polar.

**GGGCCCTGGCCTGCCACTCCTGCCCCAAACCTCTCACCATCACCGCCACCA  
CCGTGCAGCTGCCACCAACCCTGCACGCTACTGCTGCCTCAGTGGCTGTAC  
CCAACAAGACCTGCTGACCCTCTGTCCCTAC**

```
      G P G L P L L P Q T B B H  
GGGCCCTGGC CTGCCACTCC TSCCCAAAC CTCTCACCAT  
CCCGGGACCG GACGGTGAGG ACGGGGTTTG GAGAGTGGA  
43 H H H H R A A A T M F A N Y C C L B G C  
61 CACCGCCACC ACCGTGCAGC TGCCACCLAC CCTGCAGCT ACTGCTGCCT CAGTGGCTGT  
GTGGCGGTGG TGGCAGCTCG ACGGTGGTTG GACGTGCGA TGACGACGGG CTCACCGACA  
43 T Q Q D L L T L C P Y  
121 ACCCAACAAG ACCGTGTGAC CCTGTGTCCC TAC  
TGGTGTGTTT TGGACGACTG GAGGACAAGG ATG
```

Figura 37. Proteína, ADN mutación P93L (C278T).

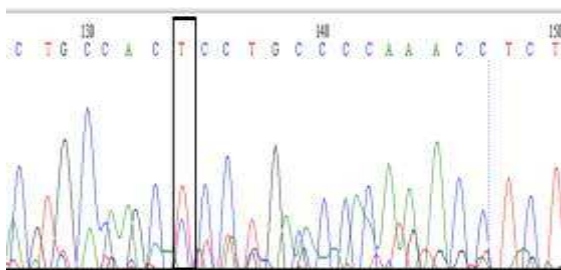


Figura 38. Electroferograma de la mutación P93L (C278T).

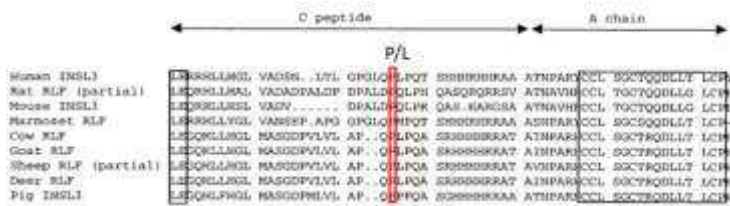


Figura 39. Localización de la mutación P93L (C278T) en la proteína. Alineamiento multi-especies.

5. Caso 10. Paciente de 8 años de edad con antecedente de criptorquidia inguinal derecha, orquidopexia derecha a los 2 años.

Se observó un cambio de una G por una C en la posición 319 (G319C). Este cambio significó una sustitución GCT (codifica para una alanina) por CCT (codifica para una prolina), ocasionando un cambio en el aminoácido (A107P).

Alanina (A) Prolina (P)

Alanina aminoácido no polar.

Prolina aminoácido no polar.

TAATCTCACGCTGGGACCTGGCTTGCACCCCCTGCCACAAACCTCTCACAAT  
 CACCGCCACCACCGGGCACCTGCCACCAACCCTGCACGCTACTGCTGCCTC  
 AGTGGCTGTACCCAACAAAACCTGCTGACCCTCTGTCCCTAC

```

N L T L G F G L H F L P Q T S H N
ATCTCACGCT GGGACCTGGC TTGCACCCC TGCCACAAAC CTCTCACAAT
TAGAGTGGCA CCTTGGACCG AACGTGGGGG ACGGTGTTTG GAGAGTGTTA

+3 H R H H R A P A T N P A R Y C C L S G C
61 CACCGCCACC ACCGGGCACC TGCCACCAAC CCTGCACGCT ACTGCTGCCT CAGTGGCTGT
GTGGCGGTGG TGGCCCGTGG ACGGTGGTTG GGACGTGGCA TGACGACGGG GTCACCGACA

+3 T Q Q N L L T L C P Y
121 ACCCAACAAA ACCTGCTGAC CCTCTGTCCC TAC
TGGGTGTTT TGGACGACTG GGAGACAGGG ATG

```

Figura 40. Proteína, ADN mutación A107P (G319C) Caso 10.

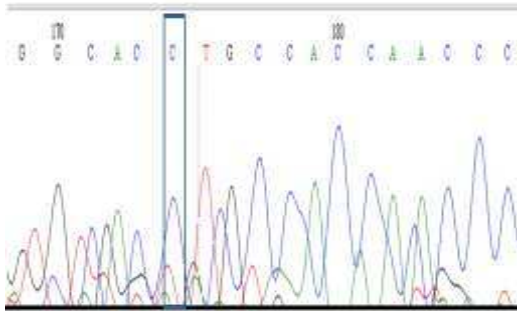


Figura 41. Electroferograma de la mutación A107P (G319C) Caso 10.

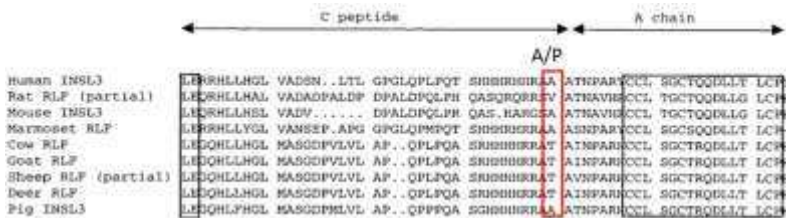


Figura 42. Localización de la mutación A107P (G319C) en la proteína. Alineamiento multi-especies. Caso 10.

6. Caso 31. Paciente de 2 años de edad con antecedente de criptorquidia inguinal bilateral, orquidopexia a los 2 años.

Se observó un cambio de una C por una G en la posición 313 (C313G). Este cambio ocasiono una sustitución CGT (codifica para una arginina) por GGT (codifica para una glicina), ocasionando un cambio en el aminoácido (R105G).

Arginina (R) Glicina (G)

Arginina aminoácido con carga positiva.

Glicina aminoácido presenta el en extremo R un átomo de hidrogeno.

```

+3 H R H H G A A A T N P A R Y C C L S G C
61 CACCGCCACC ACGGTGCAGC TGCCACCAAC CCTGCGCGCT ACTGCTGCCT CAGTGGCTGT
   GTGGCGGTGG TGCCACGTCG ACGGTGGTTG GGACGCGCGA TGACGACGGA GTCACCGACA

+3 T Q Q D L L T L C P Y
121 ACCCAACAAG ACCTGCTGAC CCTCTGTCCC TAC
   TGGTTGTTC TGGACGACTG GGAGACAGGG ATG
  
```

Figura 43. Proteína, ADN mutación R105G (C313G).

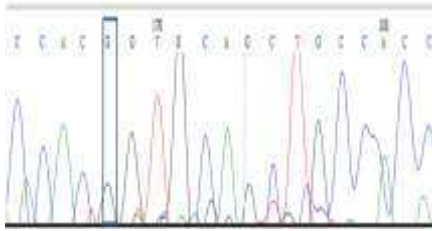


Figura 44. Electroferograma mutación R105G (C313G).

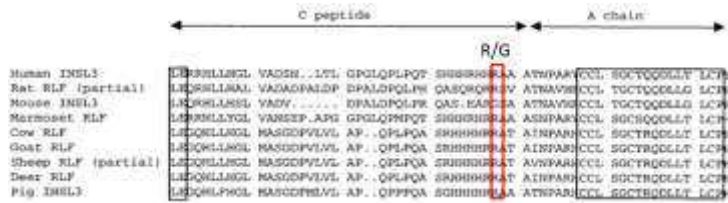


Figura 45. Localización de la mutación R105G (C313G) en la proteína. Alineamiento multi-especies.

Nucleótido	Exón	Aminoácido	Localización	Número de pacientes	Frecuencia alelica para este estudio
T26G	1	L10R	Péptido señal	1	2,25%
C77T	1	P27L	Cadena B	1	2,25%
T260A	2	L87Q	Péptido C	2	2,5%
G319C	2	A107P	Péptido C	2	2,5%
C278T	2	P93L	Péptido C	1	1,28%
C313G	2	R105G	Péptido C	1	1,28%

**Tabla 17. Mutaciones en el gen INSL3 hallados en casos.**

MUTACIONES	CAMBIO DE AMINOÁCIDO	GRUPO R
L10R	Leucina/Arginina	No polar/ Con carga positiva
P27L	Prolina/Leucina	No polar / No polar
L87Q	Leucina/Glutamina	No polar / Polar
A107P	Alanina/Prolina	No polar / No polar
P93L	Prolina/Leucina	No polar / No polar
R105G	Arginina/Glicina	Con carga positiva / Átomo de Hidrogeno

**Tabla 18. Cambio de aminoácido en las mutaciones halladas en los casos vs cambios con relación a su cadena lateral R.**

Se realizó la búsqueda en las bases de datos NCBI, UNIPROT, PDBe de las mutaciones halladas en nuestra población.



Figura 46. Búsqueda de mutaciones en el gen INSL3 (NCBI).

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?locusId=3640](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=3640)

Se encontró cambio de aminoácido reportado en las posiciones 9 (sinónima 1), 42 (sinónimas 3), 53 (sinónima 1), 60 (missense 1), 100 (sinónima 1), 101 (missense 1). De estos hallazgos, el cambio missense en la posición 60 fue encontrado en nuestra población de casos como de controles.





Figura 47. Esquema de las mutaciones halladas en NCBI para el gen INSL3. Se observan 2 variantes reportadas para el gen INSL3, P93L y R102C, de las cuales P93L fue encontrada en nuestra población.

Tipo de criptorquidia	Número de secuencias analizadas	Mutaciones halladas en el gen INSL3
Bilateral Exón 1	5	1 (P27L)
Exón 2	12	4 (L87Q X2, A107P, R105G)
Unilateral Exón 1	17	1 (L10R)
Exón 2	27	2 (A107P, P93L)

**Tabla 19. Relación tipo de criptorquidia vs Número de mutaciones halladas en el gen INSL3.**

Localización del testículo	Número de secuencias analizadas	Mutaciones halladas en el gen INSL3
Intra-abdominal Exón 1	2	0
Exón 2	6	2 (L87Q X2)
Inguinal Exón 1	19	2 (L10R, P27L)
Exón 2	31	4 (A107P, P93L, R105G)
Intra-abdominal e inguinal Exón 1	1	0
Exón 2	2	0

**Tabla 20. Relación localización del testículo vs Número de mutaciones halladas en el gen INSL3.**

X2: 2 pacientes



### 5.3. GEN LGR8

#### 5.3.1. Amplificados de PCR para la mutación A664C (T222P)

Se amplificaron 252 muestras para las formas mutada y Wild Type de la mutación A664C en el gen LGR8.

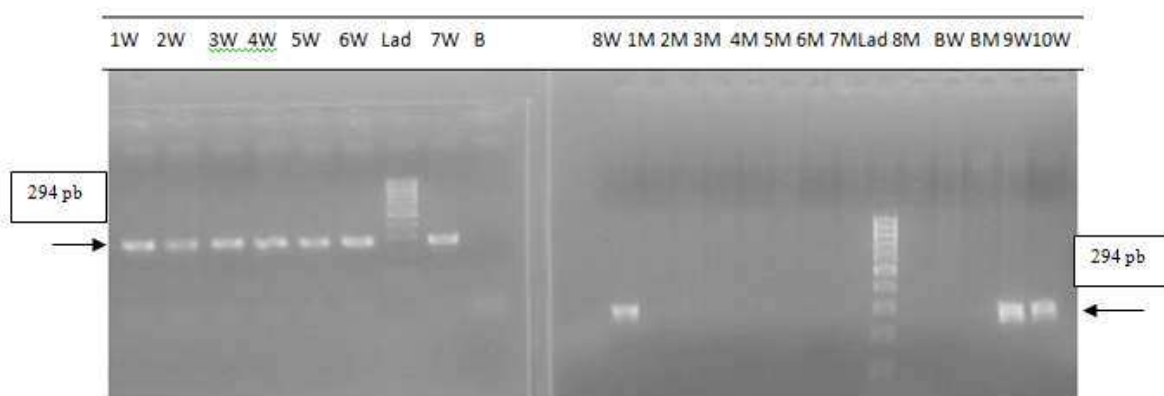


Figura 48. Amplificados del gen LGR8.

Fotografía de los amplificados para LGR8, en donde se evidencia el amplificado normal de 294 pb en las muestras 1W, 2W, 3W, 4W, 5W, 6W, 7W, 8W, 9W y 10W. Se confirma el peso molecular con la banda marcada por el ladder (Lad). No se observó el amplificado mutado para estas mismas muestras.

La secuencia normal (Wild Type) fue confirmada por secuenciación.

No se encontró la mutación en casos ni en controles (200 controles y 52 casos).

## 6. DISCUSIÓN

La criptorquidia (falta de descenso, o descenso insuficiente de los testículos), es una de las anomalías más comunes en recién nacidos a término (71). En Colombia, estudios de frecuencias de anomalías congénitas muestran frecuencias entre 3,4% y 13.3 X 10.000 nacidos vivos (13, 26). No obstante, no existen estudios específicos que demuestren la frecuencia de esta patología a nivel nacional, por lo que se hace difícil determinar su incremento en las últimas décadas como ha sido evidente en otras poblaciones (67, 71).

En 1999 (50, 80) ratones knockout para el gen *Insl3*, mostraron infertilidad con presencia de testículos a nivel intra-abdominal, con células de Leydig y células de Sertoli normales. En el año 2001(54) mutaciones en *Lgr8* (GREAT) mostraron un fenotipo similar al knockout para el gen *Insl3*, mostrando que las anomalías en esta vía (*INSL3/LGR8*) conllevan a una falla del descenso normal del testículo al escroto. La similitud en estos fenotipos conduce a una subsecuente identificación de su relación ligando-receptor.

Se han descrito múltiples variables asociadas a la criptorquidia en diferentes estudios (4, 44, 74) y es posible que varias de ellas sean causa del mal descenso testicular.

En el año 2000 (65) se describieron 2 mutaciones en el gen *INSL3*, en pacientes con criptorquidia, en el año 2002 (27) se encontraron mutaciones en el gen *LGR8* en pacientes con criptorquidia, lo cual sugirió una asociación específica entre mutaciones en los genes *INSL3* y *LGR8* en pacientes con criptorquidia. Sin embargo, no se tienen aún datos definitivos disponibles debido a la alta variabilidad de las frecuencias de las mutaciones observadas en los diferentes estudios. Probablemente como resultado de diferencias étnicas y/o como resultado de los criterios de selección de los pacientes. Sin embargo, la frecuencia de mutaciones reportada puede llegar al 4,6% (21).

Las variaciones fenotípicas descritas en los pacientes que presentan mutaciones, van desde formas graves que incluyen testículos intra abdominales bilaterales e infertilidad, hasta formas leves que incluyen pacientes con testículos retráctiles con normospermia, sin que se hayan encontrado mutaciones predominantemente asociadas con la gravedad de la patología (23) .

En este estudio se analiza la presencia de mutaciones en estos 2 genes, en nuestra población y exploramos la hipótesis de que mutaciones presentes en estos genes están asociadas con el no descenso de los testículos.

Dentro de la población control se incluyeron hombres en diferentes grupos etáreos con y sin fertilidad probada. El 45% de los sujetos considerados controles tenían descendencia, confirmando de esta manera su fertilidad.

El rango de edad de los 52 casos está entre 1 y 50 años, similar al de los 200 controles. La criptorquidia se observó en forma unilateral en el 75% de los casos y bilateral en el 25%. Los testículos se hallaron a nivel inguinal en el 84.2% de los casos, e intra abdominal en el 11,54%; dos de los pacientes presentaron un testículo a nivel inguinal y el otro intra abdominal (3,85%), observándose esta frecuencia semejante a la de otros estudios (23, 76).

El 17,31% de nuestros pacientes presentaron antecedente familiar de criptorquidia en un pariente de primero o segundo grado de consanguinidad. Para el momento de la toma de la muestra el 11,54% de los pacientes no se había sometido a tratamiento quirúrgico. Los tratamientos quirúrgicos practicados a los pacientes incluyeron desde orquidopexia uni o bilateral, hasta orquidectomía uni o bilateral.

No se incluyeron pacientes con otro tipo de patologías genitourinarias, como hipospadias, micropene, infertilidad (adultos) o seminoma, debido a que en los

trabajos reportados (29) no hubo asociación significativa entre mutaciones en esta vía y la presencia de estas patologías.

Dentro de nuestro grupo de pacientes 7 (13,46 % de los adultos) de ellos tenían 1 o 2 hijos, los restantes 45 pacientes aún no han tenido descendencia.

El número inicial de muestras se redujo en casos a 22 para el exón 1 y 39 para el exón 2 (45,8% exón 1 y 75 % exón 2) y en controles a 157 para el exón 1 y 178 para el exón 2 (Tablas 12 y 13). A partir de esta nueva población de estudio se realizó el análisis de los datos.

Cuatro mutaciones se encontraron tanto en pacientes como en controles (R30H, G35R, A60T, Q92H). Se realizó una búsqueda de estas mutaciones en la base de SNP existente en NCBI, (Figura 45) UNIPROT, PDBe y se halló la mutación A60T, las restantes mutaciones no han sido encontradas en otras poblaciones.

La mutación A60T, considerada polimorfismo ha sido reportado previamente (42). Estos autores encontraron la frecuencia de este alelo en el 38% en la población de Finlandia. Otros autores (43) encontraron una frecuencia para este alelo en el 31% en toda la población Europea. La frecuencia de este alelo fue del 27% en la población Japonesa (76). El porcentaje similar de frecuencias alélicas en estas tres poblaciones sugiere que puede estar presente en varios grupos étnicos. En nuestro estudio se observó con una frecuencia del 12% en la población total, lo que podría significar una frecuencia sustancialmente menor en poblaciones como la nuestra, situación que se desconoce en otros países latinoamericanos.

En el presente trabajo se encontraron seis mutaciones en condición heterocigota en el grupo de pacientes: L10R, P27L, L87Q, A107P, P93L, R105G. Solo una de ellas ha sido reportada previamente (P93L) por lo cual consideramos como hallazgo muy importante el reporte de 5 mutaciones nuevas, presuntamente asociadas con la presencia de criptorquidia.

La mutación P93L (reportado previamente) fue ocasionada por un cambio de una C por una T en la posición 278, en el exón 2. Esta mutación genera el cambio de una prolina por una leucina. La prolina 93 hace parte de una secuencia conservada QPLPQ, del péptico C, la cual se halla presente de manera conservada en un BLAST realizado de 8 especies diferentes (37).

Análisis previos del modelo de la proteína mostraron un reordenamiento de la estructura secundaria con pérdida total de la hélice  $\alpha$ , lo cual podría conducir a inestabilidad de la proteína. El paciente de nuestro estudio que presenta esta mutación es un individuo de 48 años de edad, quien presentaba antecedente de criptorquidia inguinal derecha y le fue practicada orquidectomía a los 48 años de edad. Este paciente es padre de 2 hijos sanos, y negó antecedentes de criptorquidia en otros familiares. El paciente reportado por Ferlín y colaboradores (21) al igual que nuestro caso presentaba criptorquidia unilateral y le fue practicada orquidectomía a los 9 años de edad. Este paciente tenía antecedente familiar de un primo afectado con criptorquidia bilateral. En el 2004 Foresta y colaboradores (24) también encontraron la mutación en 2 de sus pacientes uno de los cuales tenía antecedente familiar de criptorquidia. No hay descripción fenotípica específica reportada de estos pacientes. En el año 2006, Ferlín y colaboradores (23) publicaron esta mutación en 5 pacientes con criptorquidia tanto uní como bilateral, no evidenciándose correlación fenotípica entre esta mutación y el tipo de criptorquidia presente, sugiriendo que otros factores (genéticos y/o ambientales) pueden contribuir con la expresividad variable del fenotipo. Algunos de los padres de estos pacientes sin antecedente de criptorquidia fueron estudiados encontrándose la mutación en forma heterocigota en sus madres sanas.

En nuestro paciente, sería importante, descartar la presencia de la mutación en los hijos sanos con el propósito de dar mayor fuerza a la asociación entre la mutación o la ausencia de mutación y el fenotipo.

Estudios *in vitro*, para observar la capacidad de la proteína mutada (P93L), mediante estimulación del receptor, cuantificando la producción de AMPc han sido realizados por Bogatcheva y colaboradores (9) no observándose alteración de la capacidad de esta proteína para activar el receptor. Sin embargo, otras características del péptido como eficiencia de la transcripción celular específica, traducción, procesamiento de la proteína madura o estabilidad podrían ser afectadas.

La mutación L10R, localizada en el exón 1 a nivel del péptido señal, corresponde a un cambio de un aminoácido no polar por un aminoácido con carga positiva. Fue encontrada en un individuo de 29 años con historia de criptorquidia inguinal derecha, orquidopexia a los 7 años de edad, sin antecedentes familiares de criptorquidia y sin descendencia hasta el momento.

La mutación P27L, localizada en el exón 1 a nivel de la cadena B, corresponde a un cambio de un aminoácido no polar por otro aminoácido no polar. Fue encontrada en un paciente de 2 años con historia de criptorquidia inguinal bilateral, orquidopexia a los 2 años de edad. Sin antecedentes familiares de criptorquidia.

La mutación L87Q localizada en el exón 2 a nivel del péptido C, corresponde al cambio de un aminoácido no polar por un aminoácido polar. Fue encontrada en dos pacientes no relacionados. 1. Un individuo de 5 años de edad con antecedente de criptorquidia intra-abdominal bilateral, orquidopexia en 2 tiempos quirúrgicos a los 11 meses y 2 años de edad y sin antecedentes familiares de criptorquidia. 2. Un individuo de 41 años de edad con antecedente de criptorquidia intra abdominal bilateral, orquidopexia bilateral a los 7 años de edad y con el antecedente de dos hijos con criptorquidia. En este caso la transmisión dominante de la criptorquidia, nos obliga a descartar la presencia de la mutación en los 2 hijos afectados con el propósito de establecer una asociación más fuerte. Por otro lado la presencia de la mutación en dos pacientes no relacionados y en ninguno de los controles le confiere una particular importancia al hallazgo.

La mutación A107P localizada en el exón 2 a nivel del péptido C, corresponde al cambio de un aminoácido no polar por otro del mismo grupo lateral R. Fue encontrada en dos pacientes no relacionados: 1. Un paciente de 2 años de edad con antecedente de criptorquidia inguinal bilateral, quien aun no ha sido sometido a tratamiento quirúrgico y sin antecedente familiar. 2. Un paciente de 8 años de edad con antecedente de criptorquidia inguinal derecha, orquidopexia derecha a los 2 años y sin antecedente familiar.

La mutación R105G, la cual es localizada al final del gen, en el péptido C, corresponde al cambio de un aminoácido con carga positiva por un aminoácido con un extremo de hidrogeno. Fue encontrada en un paciente de 2 años de edad con antecedente de criptorquidia inguinal derecha, orquidectomía derecha a los 2 años y sin antecedente familiar.

El INSL3 fue aislado y caracterizado en varias en varias especies de mamíferos (5, 30, 73).

El INSL3 es expresado como una preprohormona, con un péptido señal amino terminal, una cadena B, un péptido C y una cadena A carboxiterminal. La estructura primaria del factor prepro INSL3 es similar a la de los miembros de la super familia de hormonas similares a la insulina y hay una alta homología entre las cadenas A y B de las hormonas pertenecientes a este grupo (30).

La preprohormona se transforma en un péptido maduro a través de la escisión del péptido señal y la formación de dos inter cadenas y un puente di sulfuro al interior de la cadena A, seguido por la eliminación proteolítica del péptido C (60).

El INSL3 maduro se compone de una cadena A y una B, de 26 y 31 aminoácidos respectivamente. INSL3 tiene una estructura básica similar a la encontrada en la insulina y la relaxina, especialmente en la región de limitada por los puentes di sulfuro (1).

En los miembros de esta familia de hormonas, el péptido señal facilita la secreción de la prohormona, lo cual podría estar relacionado con el no descenso testicular en el paciente que presenta el aminoácido L10R, debido a que este cambio se encuentra localizado en este dominio.

En cuanto al péptido C, se ha descrito como mediador del plegamiento de la proteína y la formación de los tres puentes de sulfuro en la hormona activa (1). 4 de las mutaciones descritas en este estudio se encuentran localizadas en este péptido (L87Q, A107P, P93L, R105G).

Para determinar los residuos implicados en la unión al receptor, recientes estudios estructura actividad (62), concluyendo que INSL3 se une a su receptor usando principalmente residuos localizados en la cadena B.

La deleción de la cadena A, conduce a la pérdida de la estructura  $\alpha$  helicoidal de la cadena B, por lo tanto la pérdida de la afinidad de unión de la cadena B al receptor (5).

El modulamiento de la proteína con cada una de las mutaciones halladas se realizó por medio de los software SWISS-MODEL y SWISS-PDBVIEWER, los cuales generan imágenes del estado secundario y en 3D de la proteína. Sin embargo, la forma como estas mutaciones afectan la proteína y la vía de señalización no es claramente soportada. Estudios adicionales y análisis funcionales *in vitro*, en los que se analicen las nuevas mutaciones descritas son necesarios para precisar la alteración funcional en la vía INSL3-LGR8 y su relación con la alteración en el descenso testicular.

La mutación A664C es la única mutación descrita en el gen LGR8 asociada con criptorquidia (27) conduce a una sustitución de una tirosina por una prolina en la posición 222. Esta mutación presenta una consecuencia drástica sobre el



receptor, que consiste en abolir la unión con el ligando INSL3 en estudios *in vitro* (27).

Estudios recientes muestran asociación entre la mutación A664C y pacientes con criptorquidia (7) por lo que se realizó la búsqueda de esta mutación por medio de PCR ARMS dentro de nuestra población, no encontrándose en ninguno de los 252 sujetos estudiados.

Emmen y colaboradores (17), demostraron una reducida expresión del ARNm de *Insl3*, después de la exposición prenatal de fetos de ratón masculinos a estrógenos exógenos (dietilestilbestrol), los cuales inhiben el desarrollo del *gubernaculum* durante la primera fase del descenso testicular, por lo que consideramos que tanto factores genéticos como factores ambientales pueden alterar el mecanismo del descenso testicular.

## 7. CONCLUSIONES

1. Se encontraron 4 mutaciones en el gen INSL3 tanto en casos como en controles (R30H, G35H, A60T y Q92H).
2. La mutación A60T considerada polimorfismo, ha sido reportada en la literatura con frecuencias mayores a la encontrada en nuestra población.
3. La mutación G35H se presenta con diferencias estadísticamente significativas en los casos lo cual sugiere que pueda corresponder a una mutación patogénica.
4. Las mutaciones R30H y Q92H al hallarse en ambos grupos sin diferencias significativas sugieren ser mutaciones polimórficas.
5. Se encontraron 6 mutaciones en el gen INSL3 en el grupo de casos. La mutación P93L reportada previamente y 5 mutaciones nuevas (L10R, P27L, L87Q, R105G, A107P) presuntamente asociadas con el fenotipo criptorquidia.
6. Se realizó una búsqueda de estas mutaciones en la base de SNP existente en NCBI, UNIPROT, PDBe y se halló el polimorfismo A60T y la mutación P93L, las restantes mutaciones no han sido encontradas en otras poblaciones.
7. Se hallaron cambios de aminoácido en los 4 dominios de la proteína.
8. La mutación A664C en el gen LGR8 no está presente en nuestra población de estudio.

## 8. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS

1. Confirmar cada una de las mutaciones halladas por medio de RLFP (Restriction Fragment Length Polymorphism).
2. Estudios adicionales y análisis funcionales *in vitro*, en los que se analicen las nuevas mutaciones descritas son necesarios para precisar la alteración funcional en la vía INSL3-LGR8 y su relación con la alteración en el descenso testicular.
3. Implementar metodologías para buscar otras mutaciones en el gen del receptor por su obvia importancia biológica en el descenso testicular.
4. Desarrollar el estudio en cohortes amplias con gran número de pacientes y controles para obtener el poder estadístico necesario para detectar asociaciones moderadas.
5. Estudios colaborativos se hacen necesarios para obtener este tipo de cohortes de modo que se pueda contribuir al entendimiento de la genética de esta enfermedad identificando mutaciones con asociaciones robustas.
6. Se deben hacer estudios de replicación en diferentes poblaciones para poder confirmar los resultados y determinar la presencia de estas mutaciones en pacientes con criptorquida.
7. Es importante estudiar los familiares afectados y no afectados de los pacientes que presentaron la mutación.
8. Investigar otros genes que podrían estar relacionados con la criptorquidia HOXA10, AMH, CGRP.

9. Realizar estudios que permitan establecer: 1. La incidencia de la criptorquidia, 2. La asociación o no asociación entre criptorquidia y cáncer testicular y/o infertilidad en nuestra población a nivel nacional.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. **Adham I, Emmen J, and Engel W.** The role of the testicular factor INSL3 in establishing the gonadal position. *Molecular and Cellular Endocrinology* 160(1-2): 11-16., 2000.
2. **Aschim E, Nordenskjold A, Giwercman A, Lundin K, Ruhayel Y, Haugen T, Grotmol T, and Giwercman Y.** Linkage between cryptorchidism, hypospadias, and GGN repeat length in the androgen receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 5105-5109, 2004.
3. **Baker LA, Nef S, Nguyen MT, Stapleton R, Nordenskjold A, Pohl H, and LF. P.** The insulin-3 gene: lack of a genetic basis for human cryptorchidism. *The Journal of urology* 167: 2534-2537, 2002.
4. **Barthold JS.** Undescended testis: current theories of etiology. *Current Opinion in Urology* 18: 395-400, 2008.
5. **Bathgate R, Balvers M, Hunt N, and Ivell R.** Relaxin-like factor gene is highly expressed in the bovine ovary of the cycle and pregnancy: sequence and messenger ribonucleic acid analysis. *Biology of Reproduction* 55: 1452-1457, 1996.
6. **Bathgate RA, Ivell R, Sanborn BM, Sherwood OD, and Summers RJ.** International union of pharmacology LVII: Recommendations for the nomenclature of receptors for relaxin family peptides. *Pharmacol Rev* 58: 7-31, 2006.
7. **Bogatcheva N, and Agoulnik A.** INSL3/LGR8 role in testicular descent and cryptorchidism *Reproductive BioMedicine Online* 10: 49-54, 2005.
8. **Bogatcheva N, Ferlin A, Feng S, Truong A, Giancesello L, Foresta C, and Agoulnik A.** T222P mutation of the insulin-like 3 hormone receptor LGR8 is associated with testicular maldescent and hinders receptor expression on the cell surface membrane. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 292: 138-144, 2007.
9. **Bogatcheva NV, Truong A, Feng S, Engel W, Adham IM, and Agoulnik AI.** GREAT/LGR8 is the only receptor for Insulin-Like 3 peptide. *Mol Endocrinol* 17: 2639-2646, 2003.
10. **Brennan J, and Capel B.** One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nat Rev Genet* 5: 509-521, 2004.
11. **Brokken LJS, Adamsson A, Paranko J, and Toppari J.** Antiandrogen exposure in utero disrupts expression of desert hedgehog and insulin-like factor 3 in the developing fetal rat testis. *Endocrinology* 150: 445-451, 2009.
12. **Bullesbach E, and Schwabe C.** A novel Leydig cell cDNA-derived protein is a relaxin-like factor. *The Journal of biological chemistry* 270: 16011-16015, 1995.
13. **Calderón J, and Zarante I.** Anomalías congénitas urológicas: descripción epidemiológica y factores de riesgo asociados en Colombia 2001-2004. *Archivos españoles de urología* 59: 7-14, 2006.
14. **Canto P, Escudero I, Soderlund D, Nishimura E, Carranza-Lira S, Gutierrez J, Nava A, and Mendez JP.** A novel mutation of the insulin-like 3 gene in patients with cryptorchidism. *J Hum Genet* 48: 86-90, 2003.
15. **Cavanagh G, Dunn AN, Chapman CE, and P. M.** HPA genotyping by PCR sequence-specific priming (PCR-SSP): a streamlined method for rapid routine investigations. *Transfus Med* 7(1): 41-45, 1997

16. **Dieckmann KP, and Pichlmeier U.** Clinical epidemiology of testicular germ cell tumors. *World Journal of Urology* 22: 2-14, 2004.
17. **Emmen J, McLuskey A, Adham I, Engel W, Verhoef-Post M, Themmen A, Grootegoed J, and Brinkmann A.** Involvement of insulin-like factor 3 (Insl3) in diethylstilbestrol-induced cryptorchidism. *Endocrinology* 141: 846-, 2000.
18. **Erlich HA.** PCR technology: principles and applications for DNA amplifications. Stockton Press, NY, EU 1989.
19. **Feng S, Ferlin A, Truong A, Bathgate R, Wade JD, Corbett S, Han S, Tannour-Louet M, Lamb DJ, Foresta C, and AI A.** INSL3/RXFP2 signaling in testicular descent. *Ann NY Acad Sci Apr*;1160: 197-204., 2009.
20. **Feng S, Bogatcheva NV, Truong A, Korchin B, Bishop CE, Klonisch T, Agoulnik IU, and Agoulnik AI.** Developmental expression and gene regulation of insulin-like 3 receptor RXFP2 in mouse male reproductive organs. *Biol Reprod* 77: 671-680, 2007.
21. **Ferlin A, Simonato M, Bartoloni L, Rizzo G, Bettella A, Dottorini T, Dallapiccola B, and Foresta C.** The INSL3-LGR8/GREAT ligand-receptor pair in human cryptorchidism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88: 4273-4279, 2003.
22. **Ferlin A, Zuccarello D, Garolla A, Selice R, and Foresta C.** Hormonal and genetic control of testicular descent. *Reproductive biomedicine online* 15: 659-665, 2007.
23. **Ferlin A, Bogatcheva NV, Giancesello L, Pepe A, Vianzi C, Agoulnik AI, and Foresta C.** Insulin-like factor 3 gene mutations in testicular dysgenesis syndrome: clinical and functional characterization. *Molecular Human Reproduction* 12: 401-406, 2006.
24. **Foresta C, and Ferlin A.** Role of INSL3 and LGR8 in cryptorchidism and testicular functions. *Reproductive biomedicine online* 9: 294-298, 2004.
25. **Foresta C, Zuccarello D, Garolla A, and Ferlin A.** Role of hormones, genes and environment in human cryptorchidism. *Endocr Rev er.2007-0042*, 2008.
26. **García HA, Salguero GA, Moreno J, Arteaga C, and Giraldo A.** Análisis comparativo de las frecuencias de anomalías congénitas del Instituto Materno Infantil de Bogotá. *Acta Biológica Colombiana* 6: 2001.
27. **Gorlov I, Kamat A, Bogatcheva N, Jones E, Lamb D, Truong A, Bishop C, and Ken.** Mutations of the GREAT gene cause cryptorchidism. *Human Molecular Genetics* 11: 2309-2318, 2002.
28. **Houate B, Rouba H, Imken L, Sibai H, Chafik A, Boulouiz R, Chadli E, Hassar M, McElreavey K, and A. B.** No association between T222P/LGR8 mutation and cryptorchidism in the Moroccan population. *Hormone Research in Paediatrics* 70: 236-239, 2008.
29. **Houate B, Rouba H, Sibai H, Barakat A, Chafik A, Chadli el B, Imken L, Bogatcheva NV, Feng S, Agoulnik AI, and McElreavey K.** Novel mutations involving the INSL3 gene associated with cryptorchidism. *J Urol* 177(5): 1947-1951, 2007.
30. **Hsu S.** New insights into the evolution of the relaxin-LGR signaling system. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 14: 303 - 309, 2003.
31. **Hsu SY, Kudo M, Chen T, Nakabayashi K, Bhalla A, van der Spek PJ, van Duin M, and Hsueh AJW.** The Three Subfamilies of Leucine-Rich Repeat-Containing G Protein-Coupled Receptors (LGR): Identification of LGR6 and LGR7 and the Signaling Mechanism for LGR7. *Molecular Endocrinology* 14: 1257 - 1271, 2000.

32. **Hsu SY, Nakabayashi K, Nishi S, Kumagi J, Kudo M, Sherwood OD, and Hseuh AJW.** Activation of Orphan Receptors by the Hormone Relaxin. *Science* 295: 671 - 674, 2002.
33. **Hughes I, and Acerini C.** Factors controlling testis descent. *Eur J Endocrinol* EJE-08-0458, 2008.
34. **Husmann D, and Levy J.** Current concepts in the pathophysiology of testicular undescended Urology 46: 267-276., 1995
35. **Hutson J, Hasthorpe S, and Heyns C.** Anatomical and functional aspects of testicular descent and cryptorchidism. *Endocrine Reviews* 18(2): 259-280, 1997.
36. **Ivell R, Balvers M, Domagalski R, Ungefroren H, Hunt N, and Schulze W.** Relaxin-like factor: a highly specific and constitutive new marker for Leydig cells in the human testis. *Molecular Human Reproduction* 3: 459-466, 1997.
37. **Ivell R, and Bathgate R.** Reproductive biology of the relaxin-like factor (RLF/INSL3). *Biology of reproduction* 67: 699-705, 2002.
38. **Ivell R, and Hartung S.** The molecular basis of cryptorchidism. *Mol Hum Reprod* 9: 175-181, 2003.
39. **Kawamura K, Kumagai J, Sudo S, Chun S-Y, Pisarska M, Morita H, Toppari J, Fu P, Wade JD, Bathgate RAD, and Hsueh AJW.** Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 7323-7328, 2004.
40. **Koskimies P, Spiess A, Lahti P, Huhtaniemi I, and R. I.** The mouse relaxin-like factor gene and its promoter are located within the 3' region of the JAK3 genomic sequence. *FEBS Lett* 419 186-190, 1997.
41. **Koskimies P SA, Lahti P, Huhtaniemi I, Ivell R.** The mouse relaxin-like factor gene and its promoter are located within the 3' region of the JAK3 genomic sequence *FEBS letters* 15;419(2-3):: 186-190, 1997.
42. **Koskimies P, Virtane H, Lindstrom M, Kaleva M, Poutanen M, Huhtaniemi I, and Toppari J.** A common polymorphism in the human relaxin-like factor (RLF) gene: no relationship with cryptorchidism. *Pediatric research* 47(4 Pt 1): 538-541, 2000.
43. **Krausz C, Quintana-Murci L, Fellous M, Siffroi JP, and McElreavey K.** Absence of mutations involving the INSL3 gene in human idiopathic cryptorchidism. *Molecular Human Reproduction* 6: 298-302, 2000.
44. **Kristensen D, Hass U, Lesnã L, Lottrup G, Jacobsen P, Desdoits-Lethimonier C, Boberg J, Petersen J, Toppari J, Jensen T, Brunak S, Skakkebaek N, Nellemann C, Main K, JÃgou B, and Leffers H.** Intrauterine exposure to mild analgesics is a risk factor for development of male reproductive disorders in human and rat. *Human reproduction* 2010.
45. **Kumagai J, Hsu S, Matsumi H, Roh J, Fu P, Wade J, Bathgate R, and Hsueh A.** INSL3/Leydig Insulin-like peptide activates the LGR8 receptor important in testis descent. *The Journal of biological chemistry* 277: 31283-31286, 2002.
46. **Lim HN, Raipert-de Meyts E, Skakkebaek NE, Hawkins JR, and Hughes IA.** Genetic analysis of the INSL3 gene in patients with maldescent of the testis. *Eur J Endocrinol* 144: 129-137, 2001.
47. **M. Balvers, A.-N. Spiess, R. Domagalski, N. Hunt, E. Kilic, A. K. Mukhopadhyay, E. Hanks, H. M. Charlton, and R. Ivell.** Relaxin-like factor expression

as a marker of differentiation in the mouse testis and ovary. *Endocrinology* 139: 2960–2970, 1998.

48. **Marin P, Ferlin A, Moro E, Rossi A, Bartolon Li, Rossato M, and Foresta C.** Novel insulin-like 3 (INSL3) gene mutation associated with human cryptorchidism. *American Journal of Medical Genetics* 103: 348-349, 2001.

49. **Miller SA, Dykes DD, and HF. P.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 11;16(3): 1215, 1998.

50. **Nef S, and Parada LF.** Cryptorchidism in mice mutant for *Insl3*. *Nature Genetics* 22: 295 - 299, 1999.

51. **Nef S, and Parada LF.** Hormones in male sexual development. *Genes and Development* 14: 3075-3083, 2000.

52. **Nitsche E, and Hiort O.** The Molecular Basis of Androgen Insensitivity. *Hormone Research* 54: 327-333, 2000.

53. **Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, and Hayashi K.** Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989.

54. **Overbeek P, Ivan P, Gorlov R, Sutherland J, Houston W, Harrison H, Boettger-Tong C, Bishop A, and Agoulnik.** A transgenic insertion causing cryptorchidism in mice. *genesis* 30: 26-35, 2001.

55. **Park S, and Jameson J.** Minireview: Transcriptional regulation of gonadal development and differentiation. *Endocrinology* 146: 1035-1042, 2005.

56. **Paust H, Wessels J, Ivell R, and Mukhopadhyay A.** The expression of the RLF/INSL3 gene is reduced in Leydig cells of the aging rat testis. *Experimental Gerontology* 37: 1459–1465, 2002.

57. **Pettersson A, Richiardi L, Nordenskjold A, Kaijser M, and Akre O.** Age at surgery for undescended testis and risk of testicular cancer. *The New England Journal of Medicine* 356(18): 1835-1841, 2007.

58. **Pusch W, Balvers M, and Ivell R.** Molecular cloning and expression of the relaxin-like factor from the mouse testis. *Endocrinology* 137: 3009-3013, 1996.

59. **Richard Ivell, and Stefan Hartung.** The molecular basis of cryptorchidism. *Molecular Human Reproduction* 9 (4): 175-181, 2003.

60. **Rosengren KJ, Zhang S, Lin F, Daly NL, Scott DJ, Hughes RA, Bathgate RA, Craik DJ, and JD. W.** Solution structure and characterization of the LGR8 receptor binding surface of insulin-like peptide 3. *J Biol Chem* 281(38): 2006.

61. **Schnack TH, Zdravkovic S, Myrup C, Westergaard T, Wohlfahrt J, and M. M.** Familial aggregation of cryptorchidism--a nationwide cohort study. *Am J Epidemiol* 15;167(12): 1453-1457, 2008

62. **Shabanpoor F, Hughes R, Zhang S, Bathgate R, Layfield S, Hossain M, Tregear G, Separovic F, and Wade J.** Effect of helix-promoting strategies on the biological activity of novel analogues of the B-chain of INSL3. *Amino Acids* 38: 121-131, 2010.

63. **Shu F, Victoria KC, Andrew H, Brian H, Chester JK, Natalia VB, and Alexander IA.** Mutation analysis of INSL3 and GREAT/LGR8 genes in familial cryptorchidism. *Urology* 64: 1032-1036, 2004.



64. **Skakkebaek N, Meyts E, and Main K.** Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Human reproduction* 16: 972-978, 2001.
65. **Tomboc M, Lee P, Mitwally M, Schneck F, Bellinger M, and Witchel S.** Insulin-like 3/relaxin-like factor gene mutations are associated with cryptorchidism. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 4013-4018, 2000.
66. **Toppari J, and Kaleva M.** Maldescendus testis. *Hormone Research* 51: 261-269, 1999.
67. **Toppari J, Kaleva M, and Virtanen H.** Trends in the incidence of cryptorchidism and hypospadias, and methodological limitations of registry-based data. *Human reproduction update* 7: 282-286, 2001.
68. **Tremblay J.** What Signals Testis Descent? *Biology of reproduction* 83: 687-689, 2010.
69. **Virtanen H, Bjerknes R, Cortes D, Jørgensen N, Rajpert-De Meyts E, Thorsson A, Thorup J, and Main K.** Cryptorchidism: classification, prevalence and long-term consequences. *Acta Pædiatrica* 96: 611-616, 2007.
70. **Virtanen HE, Cortes D R-DME, Ritzen EM, Nordenskjold A, Skakkebaek NE, and J T.** Development and descent of the testis in relation to cryptorchidism. . *Acta Paediatr* 96: 622–627., 2007.
71. **Virtanen HE, and Toppari J.** Epidemiology and pathogenesis of cryptorchidism. . *Hum Reprod Update* 14: 49-58, 2008.
72. **Welsh M, Saunders PTK, Fisker M, Scott HM, Hutchison GR, Smith LB, and Sharpe RM.** Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. *The Journal of Clinical Investigation* 118: 1479-1490 2008.
73. **Wilkinson T, Speed T, Tregear G, and Bathgate R.** Evolution of the relaxin-like peptide family. *BMC Evolutionary Biology* 5: 14, 2005.
74. **XF Song, GH Wei, X Liu, DY Zhang, X Chen, and YJ Deng.** Effects of diethylhexyl phthalate (DEHP) on INSL3 mRNA expression by Leydig cells derived from mouse embryos and in newborn mice. *The Journal of International Medical Research* 36: 512 – 521, 2008.
75. **Xunrong Luo, Yayoi Ikeda, and Parker KL.** A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation *Cell* 77: 481 - 490, 1994.
76. **Yamazawa K, Wada Y, Sasagawa I, Aoki K, Ueoka K, and T O.** Mutation and polymorphism analyses of INSL3 and LGR8/GREAT in 62 Japanese patients with cryptorchidism. . *Horm Res* 67 73–76, 2007.
77. **Yuan FP, Lin DX, Rao CV, and Lei ZM.** Cryptorchidism in LhrKO animals and the effect of testosterone-replacement therapy. . *Hum Reprod* 21(4):: 936-942., 2006.
78. **Zarreh-Hoshyari-Khah M, Einspanier A, and Ivell R.** Differential splicing and expression of the relaxin-like factor gene in reproductive tissues of the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Biology of reproduction* 60: 445–453, 1999.
79. **Zimmermann S, Schwarzler A, Buth S, Engel W, and Adham I.** Transcription of the Leydig insulin- like gene is mediated by steroidogenic factor-1. *Molecular Endocrinology* 12: 706–713, 1998.

80. **Zimmermann S, Steding G, Emmen J, Brinkmann A, Nayernia K, Holstein A, Engel W, and Adham I.** Targeted disruption of the *Insl3* gene causes bilateral cryptorchidism. *Molecular Endocrinology* 13: 681 - 691, 1999.

## ANEXO 1

### Asentimiento Del Niño Menor De Edad para Participación en estudio

El Instituto de Genética y \_\_\_\_\_ quienes averiguaran si la criptorquidia que presentas está relacionada con una alteración que consiste en una variante en uno de tus genes INSL3 y/o LGR8 los cuales son importantes para el desarrollo del *gubernaculum* el cual hace parte de la primera fase del descenso testicular. Para ello estamos realizando este estudio.

Si estás de acuerdo en participar en este estudio, Un médico especialista en enfermedades heredadas te observará, examinará y le hará unas preguntas a tu mamá/papá o acudiente sobre tu familia, te tomaremos una pequeña muestra de sangre de la vena de tu brazo, para analizar tu material genético y determinar si tienes alguna mutación en estos genes.

Puedes sentir algo de temor o un ligero dolor en el momento del pinchazo pero este pinchazo no conlleva ningún riesgo ni te ocasionará molestias posteriores.

Tus datos, muestras y resultados de este estudio serán utilizados únicamente con fines diagnósticos, nunca revelaremos tu nombre y puedes retirarte de él únicamente con solicitarlo al Dr. Alejandro Giraldo del Instituto de Genética de la Universidad Nacional o a \_\_\_\_\_

Puedes decidir no aceptar y nadie, ni padres ni médicos te obligarán o presionarán.

Si tienes alguna pregunta sobre este estudio puedes hacerla y con gusto resolveremos tus inquietudes.

Si estás de acuerdo en participar en este estudio, puedes escribir tu nombre en el espacio abajo.

Fecha: \_\_\_\_\_

NOMBRE/FIRMA DEL NIÑO: \_\_\_\_\_

T.I.: \_\_\_\_\_

NOMBRE TESTIGO 1: \_\_\_\_\_

FIRMA: \_\_\_\_\_

C.C. \_\_\_\_\_

NOMBRE TESTIGO 2: \_\_\_\_\_

FIRMA: \_\_\_\_\_

C.C. \_\_\_\_\_

## ANEXO No 2

### PERMISO PARA PARTICIPACIÓN DE MENORES DE EDAD EN ESTUDIO

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE MEDICINA  
INSTITUTO DE GENÉTICA**

Bogotá D.C., \_\_\_\_\_ de 200

Yo \_\_\_\_\_, identificado con cédula de ciudadanía \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_, en calidad de padre/madre o representante legal del paciente \_\_\_\_\_, el cual tiene \_\_\_\_\_ de edad, (en cumplimiento de los artículos 11 y 15 de la resolución 008430 de 1993, expedida por la Dirección de Desarrollo Científico y Tecnológico del Ministerio de Salud) ACEPTO la invitación para que mi hijo o representado participe como sujeto de investigación en el estudio “DETERMINACIÓN DE POLIMORFISMOS EN EL GEN INSL3 Y DEL POLIMORFISMO A664C (T222P) EN EL GEN LGR8 EN PACIENTES COLOMBIANOS CON CRIPTORQUIDIA Y EN UN GRUPO CONTROL”, que adelanta el Instituto de Genética Humana de la Universidad Nacional de Colombia.

El propósito del presente estudio es evaluar las variantes del gen INSL3 e identificar la variante T222P LGR8 en relación con la presencia o ausencia de criptorquidia de una muestra de pacientes colombianos.

Se me ha informado sobre la garantía de **CONFIDENCIALIDAD** de este estudio: Los registros con la información de cada individuo permanecerán archivados en el Instituto de Genética Humana mínimo por 20 años a partir de la fecha de la última atención, mínimo 5 años en el archivo de gestión del Instituto de genética y mínimo 15 años en el archivo central de la Universidad Nacional de Colombia; una vez transcurrido el término de conservación, la historia se destruirá. Todo esto de acuerdo a la resolución 1995 de 1999 del Ministerio de Salud. Las historias médicas, los resultados de exámenes y la información que yo he dado son de carácter absolutamente confidencial, de manera que solamente yo y el equipo de investigación tendremos acceso a estos datos. Por ningún motivo se divulgará esta información sin mi consentimiento. Cuando los resultados de este estudio sean reportados en revistas médicas científicas o en congresos científicos, el nombre del paciente y los de todos aquellos que tomaron parte en el estudio serán omitidos.

Este estudio no tiene ningún costo para mi, los resultados, serán informados obligatoriamente a mi tan pronto se tengan. Así mismo se me ha informado que el paciente no presentará molestias ni otros riesgos por fuera de la toma de la

muestra ni recibiré beneficios económicos ni de otro tipo y que puedo retirar al paciente del estudio cuando lo desee, sin que esto tenga ninguna consecuencia para él, únicamente con solicitarlo al Dr. Alejandro Giraldo del Instituto de Genética de la Universidad Nacional. Por participar en este estudio el paciente recibirá obligatoriamente la consejería genética que será realizada por un Genetista en el Instituto de Genética Humana de la Universidad Nacional de Colombia.

Finalmente, manifiesto que he leído y comprendido perfectamente lo anterior y que todos los espacios en blanco han sido completados antes de mi firma y que me encuentro en capacidad de expresar mi consentimiento.

\_\_\_\_\_  
Firma del paciente o persona responsable  
c.c.

\_\_\_\_\_  
Testigo 1  
c.c.

\_\_\_\_\_  
Testigo 2  
c.c.

Dejo constancia que he explicado la naturaleza, propósitos, ventajas, riesgos y molestias del estudio, y he contestado todas las preguntas que el paciente o persona responsable me ha formulado.

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Firma del Investigador  
Número de registro

### ANEXO No 3

## CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN DE MAYORES DE EDAD EN ESTUDIO

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE MEDICINA  
INSTITUTO DE GENÉTICA

Bogotá D.C., \_\_\_\_\_ de 200

Yo \_\_\_\_\_, identificado con cédula de ciudadanía \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_, (en cumplimiento de los artículos 11 y 15 de la resolución 008430 de 1993, expedida por la Dirección de Desarrollo Científico y Tecnológico del Ministerio de Salud) ACEPTO la invitación para participar como sujeto de investigación en el estudio “**DETERMINACIÓN DE POLIMORFISMOS EN EL GEN INSL3 Y DEL POLIMORFISMO A664C (T222P) EN EL GEN LGR8 EN PACIENTES COLOMBIANOS CON CRIPTORQUIDIA Y EN UN GRUPO CONTROL**” que adelanta el Instituto de Genética Humana de la Universidad Nacional de Colombia.

El propósito del presente estudio es evaluar las variantes polimórficas del gen INSL3 e identificar la variante T222P LGR8 en relación con la presencia o ausencia de criptorquidia de una muestra de pacientes colombianos. Se construirá un banco de DNA. Todo lo anterior será empleado **UNICAMENTE** con fines diagnósticos y académicos.

Se me ha informado sobre la garantía de **CONFIDENCIALIDAD** de este estudio: Los registros con la información de cada individuo permanecerán archivados en el Instituto de Genética Humana mínimo por 20 años a partir de la fecha de la última atención, mínimo 5 años en el archivo de gestión del Instituto de genética y mínimo 15 años en el archivo central de la Universidad Nacional de Colombia. Una vez transcurrido el término de conservación la historia se destruirá todo esto de acuerdo a la resolución 1995 de 1999 del Ministerio de Salud. Las historias médicas, los resultados de exámenes y la información que yo he dado son de carácter absolutamente confidencial, de manera que solamente yo y el equipo de investigación tendremos acceso a estos datos. Por ningún motivo se divulgará esta información sin mi consentimiento. Cuando los resultados de este estudio sean reportados en revistas médicas científicas o en congresos científicos, mi nombre y los de todos aquellos que tomaron parte en el estudio serán omitidos.

Este estudio no tiene ningún costo para mi, los resultados, serán informados obligatoriamente a mi tan pronto se tengan. Así mismo se me ha informado que no presentaré molestias ni otros riesgos por fuera de la toma de la muestra ni recibiré beneficios económicos ni de otro tipo y que puedo retirarme del estudio cuando lo desee, sin que esto tenga ninguna consecuencia para mi, únicamente con solicitarlo al Dr. Alejandro Giraldo del Instituto de Genética de la Universidad Nacional. Por participar en este estudio recibiré obligatoriamente la consejería genética que será realizada por un Genetista en el Instituto de Genética Humana de la Universidad Nacional de Colombia.

Finalmente, manifiesto que he leído y comprendido perfectamente lo anterior y que todos los espacios en blanco han sido completados antes de mi firma y que me encuentro en capacidad de expresar mi consentimiento.

\_\_\_\_\_  
Firma del paciente o persona responsable  
c.c.

\_\_\_\_\_  
Testigo 1  
c.c.

\_\_\_\_\_  
Testigo 2  
c.c.

Dejo constancia que he explicado la naturaleza, propósitos, ventajas, riesgos y molestias del estudio, y he contestado todas las preguntas que el paciente o persona responsable me ha formulado.

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Firma del Investigador  
Número de registro

## ANEXO 4

### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA BANCO DE DNA

**Nombre del proyecto:** “ DETERMINACIÓN DE POLIMORFISMOS EN EL GEN INSL3 Y DEL POLIMORFISMO A664C (T222P) EN EL GEN LGR8 EN PACIENTES COLOMBIANOS CON CRIPTORQUIDIA Y EN UN GRUPO CONTROL ”

La utilización de la muestra en estudios posteriores nos podría ayudar en el futuro a entender las causas y/o el comportamiento del descenso testicular. Se puede dar el caso en que usted y su familia no se beneficien directamente e inmediatamente de estos estudios, pero en un futuro los afectados podrían beneficiarse. Por lo tanto, respecto al almacenamiento del DNA extraído de la muestra y su utilización en estudios de investigaciones posteriores:

Yo \_\_\_\_\_ identificado con cédula de ciudadanía No \_\_\_\_\_, a nombre propio o en calidad de representante legal de \_\_\_\_\_ autorizo conservar el DNA de la muestra que fué extraída del paciente con la posibilidad de emplearlo en estudios complementarios de diagnóstico para mi o algún miembro de mi familia, en estudios de investigación colaborativos con otras instituciones nacionales y/o internacionales, en estudios de investigación específicos para la entidad. Esto se hará siempre y cuando exista acuerdo interinstitucional previo, aprobación del comité de ética y se conserve en anonimato mis datos de identificación.

No asumiré ningún costo por la conservación del DNA, ni recibiré beneficios económicos ni de otro tipo. Tampoco recibiré beneficios económicos por los resultados del presente estudio ni los posteriores.

\_\_\_\_\_  
Paciente o Acudiente o Representante Legal

\_\_\_\_\_  
Testigo 1

\_\_\_\_\_  
Testigo 2

\_\_\_\_\_  
Investigador



## **ANEXO 5**

### **FORMATO PARA IDENTIFICACIÓN DE CONTROLES**

Nombres y apellidos completos  
Fecha de nacimiento  
Edad  
Natural de  
Procedente de  
Dirección  
Teléfono  
Sabe que es la criptorquidia  
Ha tenido criptorquidia  
Tiene Hijos  
Número de Hijos

## **ANEXO 6**

### **FORMATO PARA IDENTIFICACIÓN DE PACIENTES**

Nombres y apellidos completos  
Fecha de nacimiento  
Edad  
Natural de  
Procedente de  
Dirección  
Teléfono  
Sabe que es la criptorquidia  
Ha tenido criptorquidia  
Tiene Hijos  
Número de Hijos  
Localización del testículo  
Tratamiento quirúrgico SI\_\_\_\_ NO\_\_\_\_ Fecha  
Observaciones

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMPC	Adenosin monofosfato cíclico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
GREAT testicular	Receptor acoplado a la proteína G que afecta el descenso
INSL3	Insulin-like 3 (Leydig cell) [ <i>Homo sapiens</i> ]
InsI3	Insulin-like 3 [ <i>Mus musculus</i> ]
LDLa	Lipoproteína de baja densidad clase a
LGR8 [ <i>Homo sapiens</i> ]	Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 8
Lgr8 [ <i>Mus musculus</i> ]	Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 8
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa