



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA
Unidad Cuajimalpa

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD CUAJIMALPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA

DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA

ÁREA DE CONCENTRACIÓN:
BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

**“IDENTIFICACIÓN DE UN PERFIL GENÉTICO ASOCIADO A CÁNCER
TESTICULAR DE CÉLULAS GERMINALES EN PACIENTES CON
CRIPTORQUIDIA AISLADA”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS NATURALES
E INGENIERÍA**

PRESENTA

M. en C. F. DANIEL ADRIAN LANDERO HUERTA
2161800864

COMITÉ TUTORAL

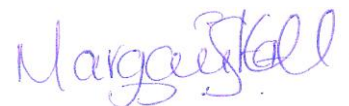
TUTORA: DRA. MARGARITA DOLORES CHÁVEZ SALDAÑA	INP
CO-TUTORA: DRA. ELENA ARÉCHAGA OCAMPO	UAM-C
ASESOR: DR. EDGAR VÁZQUEZ CONTRERAS	UAM-C

ENERO, 2021

**“IDENTIFICACIÓN DE UN PERFIL GENÉTICO ASOCIADO A CÁNCER
TESTICULAR DE CÉLULAS GERMINALES EN PACIENTES CON
CRIPTORQUIDIA AISLADA”**

VISTO BUENO DEL COMITÉ TUTORAL:

**TUTORA: DRA. MARGARITA DOLORES CHÁVEZ
SALDAÑA**



CO TUTORA: DRA. ELENA ARÉCHAGA OCAMPO



ASESOR: DR. EDGAR VÁZQUEZ CONTRERAS





M. en C. F. DANIEL ADRIAN LANDERO HUERTA

**“IDENTIFICACIÓN DE UN PERFIL GENÉTICO ASOCIADO A CÁNCER
TESTICULAR DE CÉLULAS GERMINALES EN PACIENTES CON
CRIPTORQUIDIA AISLADA”**

JURADO:

DRA. LEDA CAROLINA TORRES MALDONADO INP

DRA. LUCÍA GUADALUPE TAJA CHAYEB INCan

DR. HUMBERTO GARCÍA ORTÍZ INMEGEN



Esta idónea comunicación de resultados fue realizada dentro del Programa de Doctorado del **Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería** de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería (DCNI) de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa. El trabajo experimental **“Identificación de un perfil genético asociado a cáncer testicular de células germinales en pacientes con criptorquidia aislada”** fue realizado del 01-2016 al 10-2020 en los laboratorios del DCN de la DCNI.

DECLARACIÓN DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D. F. el día 21 del mes diciembre del año 2020, el que suscribe Daniel Adrian Landero Huerta alumno del Programa de Doctorado en Ciencias Naturales e Ingeniería de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa, manifiesta que es autor intelectual de la presente idónea comunicación de resultados intitulada; **“Identificación de un perfil genético asociado a cáncer testicular de células germinales en pacientes con criptorquidia aislada”** realizada bajo la dirección de la Dra. Margarita Dolores Chávez Saldaña y la codirección de la Dra. Elena Aréchaga Ocampo y cede los derechos de este trabajo a la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráfico o de datos del trabajo, sin el permiso expreso de la directora del trabajo la Dra. Margarita Dolores Chávez Saldaña y de la codirectora la Dra. Elena Aréchaga Ocampo como representante de la UAM. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones: mdoloreschs@gmail.com y earechaga@cua.uam.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



Daniel Adrian Landero Huerta

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“El que suscribe, Daniel Adrian Landero Huerta, alumno del Programa de Doctorado en Ciencias Naturales e Ingeniería declara que los resultados reportados en esta idónea comunicación de resultados son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Así mismo, declaro que hasta donde es de mi conocimiento no contiene material previamente publicado o escrito por otra (s) persona (s) excepto donde se reconoce como tal a través de citas y que este fue usado con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de este trabajo es producto de mi propia labor con la dirección y apoyo de mi director y de mi comité tutorial, en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación y a la expresión escrita.”



Daniel Adrian Landero Huerta

DECLARACIÓN DE NO LUCRO:

El que suscribe, Daniel Adrian Landero Huerta alumno del Programa de Doctorado en Ciencias Naturales e Ingeniería, manifiesta su compromiso de no utilizar con fines de difusión, publicación, protección legal por cualquier medio, licenciamiento, venta, cesión de derechos parcial o total o de proporcionar ventajas comerciales o lucrativas a terceros, con respecto a los materiales, datos analíticos o información de toda índole, relacionada con las actividades e intercambios de información derivados de la relación de investigación académica y tecnológica desarrollada entre la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) y Daniel Adrian Landero Huerta.



Daniel Adrian Landero Huerta

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al **Posgrado Ciencias Naturales e Ingeniería** de la **Universidad Autónoma Metropolitana de la Unidad Cuajimalpa** dentro del cual el M. en C. F. Daniel Adrian Landero Huerta con matrícula 2161800864 desarrolló sus estudios de Doctorado.

A la Coordinadora del Posgrado en Ciencias en Naturales e Ingeniería la Dra. Perla Yolanda López Camacho, que bajo su noble cargo me brindó en todo momento las facilidades y el apoyo necesario para la realización de mis estudios de posgrado.

Este trabajo se realizó bajo la cotutoría interna de la Dra. Elena Aréchaga Ocampo y de la asesoría del Dr. Edgar Vázquez Contreras pertenecientes al Departamento de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco al **Instituto Nacional de Pediatría S.S.**, debido a que este trabajo se realizó en el **Laboratorio de Biología de la Reproducción** de éste Instituto, en la Torre de Investigación “Dr. Joaquín Cravioto” de la Subdirección de Medicina Experimental, bajo la dirección de la Dra. Margarita Dolores Chávez Saldaña.

La realización de esta tesis se logró con el apoyo económico del **Fondo Federal** otorgado por el Instituto Nacional de Pediatría S.S. al proyecto general “Caracterización de marcadores tempranos de riesgo para el desarrollo del tumor testicular de células germinales en un grupo de pacientes con criptorquidia” con número de registro **INP: 01/2016**, del cual deriva la presente Tesis.

A la directora de investigación la Dra. María Dolores Correa Beltrán, al Subdirector de Medicina Experimental el M. en C. Heriberto Caballero Ortega y la jefa del Laboratorio de Biología de la Reproducción la Dra. Rosa María Viguera Villaseñor; que bajo su noble cargo me brindaron en todo momento las facilidades y el apoyo necesario para la realización de mis estudios de posgrado.

Al la Dra. Lorena Orozco y el Dr. Humberto García Ortiz del **Instituto Nacional de Medicina Genómica S. S.** por su invaluable colaboración y apoyo.

Al Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo y del Dr. José Díaz Chávez del **Instituto Nacional de Cancerología S. S.** por su apoyo entusiasta en todo momento.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**, por la beca No. 429258, otorgada al M. en C. F. Daniel Adrian Landero Huerta para estudios de Doctorado del Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería con matrícula 2161800864.

La realización de esta tesis se logró con el financiamiento otorgado por **CONACyT FOSISS (Proyecto: 272641/2017)** del cual deriva la presente Tesis.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Con cariño, profunda admiración y gratitud a la **Dra. Margarita Dolores Chávez Saldaña** me faltan palabras para agradecerle todo lo que ha hecho por mí y que aún sigue haciendo. Por creer en mí desde casi 10 años y por haber estado siempre pendiente de mi formación académica y personal. Por propiciar un ambiente lleno de libertad, respeto, compañerismo y por siempre considerar mi opinión durante estos años, simplemente me hizo sentir como en casa.

Con admiración y respeto a la **Dra. Elena Aréchaga Ocampo** a quien no tenía el privilegio de conocer hasta que llegué a la universidad y de quien he aprendido tanto, gracias por todo el conocimiento compartido tanto en lo académico como a nivel personal. Al **Dr. Edgar Vázquez Contreras** quien me brindó siempre su apoyo y contribuyó a mi formación durante el Doctorado. Gracias a ambos por hacerme sentir parte del equipo de la UAM-C.

Con cariño, admiración y gratitud a la **Dra. Rosa María Viguera Villaseñor**, por creer en mí y darme la oportunidad de hacer lo que tanto anhelé desde que tengo memoria, jamás la defraudaré. Al **Dr. Julio Cesar Rojas Castañeda** por todos los consejos que me ha dado y por siempre contagiarme del entusiasmo por la investigación. Gracias a los dos por hacerme sentir que el laboratorio es mi segundo hogar.

Al técnico **Pedro Medina Granados**, siempre insistiré que el laboratorio de Biología de la Reproducción no sería lo mismo sin usted, gracias por enseñarme que el compromiso, el talento y la humildad son fundamentales en cualquier labor; trato en medida de lo posible seguir su ejemplo.

A mis amigos del laboratorio de Biología de la Reproducción **Fabiola García Andrade, Andrea Gómez, Norma Hernández** y a **Edgar Cervantes** gracias por haberme acompañado y hacer tan llevaderos todos los momentos vividos en el laboratorio.

DEDICATORIA

Con cariño, admiración, gratitud y sobre todo con mucho compromiso para mi madre **Elisa Huerta Cruz**, día con día trato de no defraudarte, para que te sientas orgullosa de mí. Madre, me has dado todas las herramientas con las que hoy cuento, soy tremendamente afortunado de tenerte en mi vida. Te reconozco y agradezco de sobre manera que bajo cualquier situación siempre estás ahí, siempre dando el 100% y más. Admiro tu gran sabiduría y tu capacidad compasiva, tengo mucho que aprenderte aún. Este logro te lo dedico a ti, por apoyarme incondicionalmente en todos mis sueños y por siempre alentarme a conseguirlos.

A **Teodoro Domínguez**, te agradezco por todos los detalles que siempre tuviste con cada uno de nosotros y que aún sigues teniendo. Gracias por estar siempre a nuestro lado y por ser parte fundamental de nuestra familia.

A mi hermano **Alejandro Landero** y a mi sobrino **Matías Landero**, son el motor que me motiva a ser un mejor ser humano cada día. Saben que cuentan con mi apoyo incondicionalmente. Nunca lo olvides hermano, siempre seremos el mejor equipo.

A las **Doctoras Margarita Chávez y Rosa María Viguera**s, estaré eternamente agradecido con ustedes, por ser mis madres académicas. Día con día trato de darles lo mejor de mí para no defraudarles.

A **Eduardo Marrufo**, por siempre sacarme de mi mente y hacerme evidente otras formas de ver la vida y las cosas en general. Por apoyarme y brindarme tu cariño incondicionalmente siempre que lo he necesitado. No sabes cuánto te admiro y amo.

Finalmente, le dedico este trabajo a **Peña Nieto** mi gato, mis días no serían lo mismo sin tu compañía Peñita.

“Nada en la vida debe ser temido, solamente comprendido.
Ahora es el momento de comprender más, para temer menos”
Marie Curie.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

DNA: Ácido Desoxirribonucleico
RR: Riesgo Relativo
OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man
LSC: Ligamento Suspensor Craneal
GCNIS: Germ Cell Neoplasia *in Situ*
GWAS: Genome Wide Association Study
CO: Criptorquidia
TGCT: Tumor Testicular de Células Germinales
FTGCT: Tumor Testicular de Células Germinales Familiar
ITCLC: International Testicular Cancer Linkage Consortium
NGS: Next Generation Sequencing
SNV: Variación de un Solo Nucleótido
CNV: Variación en el Número de Copias
ROH: Región de Homocigosidad
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
HLOD: Heterogeneity Lod Score
OR: Odds Ratio
NAHR: Recombinación Homóloga No Alélica
NHEJ: Recombinación No Homóloga
FoSTes: Bloqueo de Horquilla y Cambio de Template
EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético
RCBL: Red Cell Blood Lysis
WCBL: White Cell Blood Lysis
EtOH: Etanol
RNA: Ácido Ribonucleico
FFPE: Formalin-Fixed Paraffin Embedded
PCA: Principal Component Analysis
AIM: Ancestry Informative Marker
CEPH: Residents with Northern and Western European Ancestry
YRI: Yoruban in Ibadan, Nigeria
NAT: Natives
MAF: Minor Allele Frequency
ChAS: Chromosome Analysis Suite
NC: Número de Copias
VEP: Variant Effect Predictor
dbSNP: The Single Nucleotide Polymorphism Database
DGV: Database of Genomic Variants
DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources
ECARUCA: European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations
KEEG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
SPSS: Statistical Package for the Social Sciences
nsTGCT: Tumor Testicular de Células Germinales no seminomatoso
sTGCT: Tumor Testicular de Células Germinales seminomatoso

JDP2: Jun dimerization protein 2
FOX: Forkhead Box
HOX: Homeobox
RARA: Retinoic Acid Receptor Alpha
TOP2A: DNA Topoisomerasa II Alfa
SMAD4: SMAD family member 4
BRCA2: Breast Cancer type 2
ORC6: Origin Recognition Complex Subunit 6
PHKB: Phosphorylase Kinase Regulatory Subunit Beta
Chr: Cromosoma
JPS: Juvenile Polyposis Syndrome

RESUMEN

La criptorquidia (CO) o no descenso testicular, es una malformación urogenital en los varones, que se sugiere está asociada con el riesgo del desarrollo del tumor testicular de células germinales (TGCT). Debido a esto, es necesario realizar estudios moleculares que apoyen la relación contundente entre la presentación de la CO y el riesgo subsecuente de desarrollar TGCT. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue identificar un perfil genético asociado al TGCT en pacientes con CO aislada. Se incluyeron 328 muestras de sangre periférica de varones, clasificadas en 3 grupos: 1) 79 pacientes con diagnóstico de TGCT, 2) 91 pacientes con CO aislada y 3) 158 individuos sanos como control. En la primera etapa del estudio, en todos los casos se obtuvieron los datos clínicos de relevancia para ambas enfermedades y se realizó la extracción de DNA y posteriormente se analizó de manera dirigida 6 SNV asociadas al TGCT, las cuales habían sido descritas previamente en otras poblaciones. En la segunda etapa, de acuerdo con la calidad del DNA se seleccionaron 25 muestras de TGCT, 25 de CO aislada y 125 de individuos control para realizar el análisis de genotipificación mediante el microarreglo *Genome-Wide Human SNP Array 6.0* de Affymetrix. Se realizó un análisis del genoma completo en donde se identificaron variantes de un solo nucleótido (SNV) utilizando la herramienta bioinformática *PLINK 1.90*, el análisis de ancestría se obtuvo mediante el programa *EIGENSOFT 7.2.1* y *ADMIXTURE 1.3.0* en tanto que las variaciones en el número de copias (CNV) y las regiones de homocigosidad (ROH) se analizaron mediante el programa ChAS 3.1 de Affymetrix. Los resultados se contrastaron con los datos depositados en el *Genome Browser* de la Universidad de California Santa Cruz (UCSC) y posteriormente se verificó si estas regiones se presentaban de manera normal en la población general o si estaban asociadas previamente con algún padecimiento con bases de datos curadas como el *DGV*, *DECIPHER*, *ISCA data base*, *ClinGen Genome Dosage Map* y *SNPdb*. Finalmente, se realizó la selección de los genes candidatos a partir de un estudio de priorización *in silico* basado en la búsqueda de función génica, participación de rutas ontológicas y de interacción proteína-proteína. En una primera etapa del estudio se encontró que los pacientes

con TGCT con antecedentes de CO aislada a los que no se les realizó la orquidopexia presentaron características clínicas más severas del TGCT, adicionalmente se identificó de manera dirigida a las variantes rs121913507 (D816V) y rs121913506 (D816H) del gen *KIT* por primera vez en pacientes con ambos padecimientos. En la segunda etapa mediante el análisis genómico, se identificó la presencia de un perfil genético compuesto por SNV, CNV y ROH con mayor frecuencia en pacientes con CO aislada y pacientes con TGCT respecto al grupo control. Para el caso de las SNV el perfil genético se conformó por las variantes rs6931053, rs12348251 y rs8013023, las dos primeras variantes ubicadas en regiones reguladoras y la tercera en región intrónica en el gen *JDP2*. Para el caso de las 6 CNV, 2 corresponden a ganancias en el número de copias de regiones intergénicas y 4 corresponden a pérdidas en el número de copias en regiones que incluyen a los genes *RARA*, *TOP2A*, *SAMD4* y *BRCA2*. Mientras que la ROH restante incluye a los genes *ORC6* y *PHKB*. De manera interesante el perfil genético identificado en este trabajo, está involucrado en rutas biológicas asociadas a la regulación del desarrollo embrionario, proliferación celular y del mantenimiento y diferenciación de las células germinales, procesos biológicos ampliamente relacionados con la carcinogénesis.

Palabras clave: Perfil genético; criptorquidia aislada; tumor testicular de células germinales; SNV; CNV; ROH.

ABSTRACT

Cryptorchidism (CO) or no testicular descent is a common genital malformation in men associated with the risk of developing testicular germ cell tumour (TGCT). Due to this, it is necessary to carry out molecular studies that support the strong relationship between the presence of CO and the subsequent risk of developing TGCT in the patient. Therefore, the objective of this work was to identify a genetic profile associated with TGCT in patients with isolated CO. In this study we initiated with 328 peripheral blood samples from males, we classified the samples into three groups: 1) 79 patients with a diagnosis of TGCT, 2) 91 patients with isolated CO, and 3) 158 healthy individuals as controls. In the first phase of the study in all cases we annotated the clinical data and then we extracted the DNA to analyze 6 SNVs that had been associated with TGCT in other populations previously. In the second phase, we selected for genotyping analysis with the Genome-Wide Human SNP Array 6.0 of Affymetrix the gDNA samples with good quality: 25 TGCT samples, 25 isolated CO samples and 125 controls. From these samples a genome-wide association study was performed to identify single nucleotide variants (SNVs) using PLINK 1.90 and the ancestry analysis were performed by EIGENSOFT 7.2.1 and ADMIXTURE 1.3.0 programs. On the other hand we identify copy number variants (CNVs) and regions of homozygosity (ROH) using ChAS 3.1 program of Affymetrix. We compared our results with the data deposited in the *Genome Browser* of the University of California (UCSC), Santa Cruz, the pathogenicity of these regions was look up in curated databases as *DGV*, *DECIPHER*, *ISCA database*, *ClinGen Genome Dosage Map* and *SNPdb*. Finally, to select candidate genes, we performed an *in silico* prioritization study based on the gene function, the ontological pathways and the protein-protein interaction. In the first stage of the study, we found that patients with TGCT with history of isolated CO who did not undergo orchidopexy presented more severe clinical features of TGCT, additionally we identified for the first time the variants rs121913507 (D816V) and rs121913506 (D816H) of the *KIT* gene in patients with both conditions. During the second stage, through genomic analysis, we identified the presence of a genetic profile composed of SNV, CNV and ROH more

frequently in patients with isolated CO and patients with TGCT compared to the control group.

In the case of SNVs, the genetic profile was made up of the rs6931053, rs12348251 and rs8013023 variants, the first two variants located in regulatory regions and the third in the intronic region in the *JDP2* gene. In the case of the 6 CNVs, 2 correspond to gains of intergenic regions and 4 correspond to losses in regions that include the *RARA*, *TOP2A*, *SAMD4* and *BRCA2* genes. Finally the remaining ROH included the *ORC6* and *PHKB* genes. Interestingly, the genetic profile identified in this work is involved in biological pathways associated with the regulation of embryonic development, cell proliferation and the maintenance and differentiation of germ cells, biological processes widely related to carcinogenesis.

Keywords: Genetic profile; isolated cryptorchidism; testicular germ cell tumour; SNV; CNV; ROH.

ÍNDICE	PÁGINA
CESIÓN DE DERECHOS	4
AGRADECIMIENTOS	8
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	13
RESUMEN	15
ABSTRACT	17
1. INTRODUCCIÓN	21
2. ANTECEDENTES	22
3. MARCO TEÓRICO	23
3.1 CRIPTORQUIDIA	23
3.2 TUMOR TESTICULAR DE CÉLULAS GERMINALES	25
3.3 ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN DEL GENOMA COMPLETO GWAS	25
3.3.1 GWAS REALIZADOS EN PACIENTES CON CRIPTORQUIDIA	25
3.3.2 GWAS REALIZADOS EN PACIENTES CON TUMOR TESTICULAR DE CÉLULAS GERMINALES	26
3.4 VARIACIONES DE UN SOLO NUCLEOTIDO	30
3.5 VARIACIONES EN EL NÚMERO DE COPIAS	32
3.6 REGIONES DE HOMOCIGOSIDAD	33
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
5. HIPÓTESIS	34
6. OBJETIVOS	35
6.1 OBJETIVO GENERAL	35
6.2 OBJETIVOS PARTICULARES	35
7. MATERIALES Y MÉTODOS	35
7.1 CLASIFICACIÓN DEL ESTUDIO	35
7.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO	35
7.2.1 POBLACIÓN OBJETIVO	35
7.2.2 POBLACIÓN ELEGIBLE	36
7.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN	36
7.3.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN	36
7.3.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	36
7.4 CONSIDERACIONES ÉTICAS	36
7.5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	37
7.6 DESCRIPCIÓN EXPERIMENTAL DEL ESTUDIO	39
7.6.1 MUESTRAS BIOLÓGICAS	39
7.6.2 EXTRACCIÓN DE DNA A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA	39
7.6.3 PURIFICACIÓN DE DNA	39
7.6.4 EXTRACCIÓN DE DNA DE TEJIDOS INCLUIDOS EN PARAFINA	40
7.6.5 EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL DNA	40
7.6.5.1 CUANTIFICACIÓN DEL DNA	40
7.6.5.2 INTEGRIDAD DEL DNA	41
7.6.6 DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS	

CLÍNICAS EN COMÚN ENTRE PACIENTES CON TGCT Y PACIENTES CON CO AISLADA	41
7.6.7 BÚSQUEDA DIRIGIDA DE 6 SNV ASOCIADAS AL DESARROLLO DE TGCT EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	41
7.6.8 GENOTIPIFICACIÓN MEDIANTE MICROARREGLOS	44
7.6.9 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DEL GENOMA COMPLETO ENTRE PACIENTES CON CO AISLADA Y PACIENTES CON TGCT	45
7.6.9.1 IDENTIFICACIÓN DE LAS SNV	45
7.6.9.2 IDENTIFICACIÓN DE LAS CNV Y ROH	47
7.6.10 COMPARACIÓN DEL PERFIL GENÉTICO CON LO ANOTADO EN BASES DE DATOS	48
7.6.11 DETERMINACIÓN DE LOS GENES CANDIDATOS	49
7.6.12 TAMAÑO DE LA MUESTRA	49
7.6.13 DEFINICIONES OPERACIONALES	50
7.6.14 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	51
8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
8.1 DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	52
8.2 BÚSQUEDA DIRIGIDA DE 6 SNV ASOCIADAS AL DESARROLLO DE TGCT EN NUESTRA POBLACIÓN	57
8.3 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DEL GENOMA COMPLETO ENTRE PACIENTES CON CO AISLADA Y PACIENTES CON TGCT	60
8.3.1 ANÁLISIS DE ANCESTRÍA GLOBAL	60
8.3.2 PERFIL GENÉTICO DE SNV	62
8.3.3 PERFIL GENÉTICO DE CNV Y ROH	67
9 CONCLUSIONES	75
10 REFERENCIAS	76
11 ANEXOS	86
11.1 TABLA 1	86
11.2 TABLA 2	87
11.3 TABLA 3	90
11.4 TABLA 4	94
11.5 TABLA 5	98
11.6 ARTÍCULO PUBLICADO	100

1. INTRODUCCIÓN

La identificación de un perfil genético compartido, entre pacientes con criptorquidia (CO) aislada y el tumor testicular de células germinales (TGCT, del inglés *testicular germ cell tumor*), es de suma importancia para poder establecer en un futuro, una herramienta diagnóstica y de seguimiento eficaz en la práctica clínica pediátrica actual, que permita determinar el riesgo de desarrollar la neoplasia testicular en pacientes con CO aislada en edad adulta. El objetivo de este trabajo fue identificar un perfil genético asociado al TGCT en pacientes con CO aislada mediante un estudio de asociación del genoma ampliado por medio de microarreglos, este perfil integró variantes de un solo nucleótido y variantes en el número de copias; las cuales se compararon mediante la revisión de diversas bases de datos y posteriormente se seleccionó el perfil con ayuda de herramientas *in silico* que permitieron realizar una priorización genética asociada a la biología del testículo y de los procesos por los cuales se propicia la carcinogénesis en este órgano.

Actualmente, este abordaje ha permitido identificar variantes genéticas predictivas de riesgo en otros modelos de enfermedades complejas de manera contundente y eficaz (Gu *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2018), evidenciando la necesidad de contemplar en la práctica clínica actual el efecto acumulativo de diversas variantes genéticas de riesgo, sumado al riesgo clínico establecido en padecimientos complejos y multifactoriales en individuos de una población común, mejorando la toma de decisiones del médico para ofrecer un asesoramiento clínico adecuado al paciente (Torkamani *et al.*, 2018).

2. ANTECEDENTES

La CO o no descenso testicular, es el defecto urológico más frecuente al nacimiento en los varones, el cual confiere a nivel clínico un riesgo relativo (RR) de 4.8 (95%; con un intervalo de confianza de 4.0-5.7) de desarrollar TGCT en jóvenes adultos (Kratz *et al.*, 2010; Dieckmann y Pichlmeier, 2004). Tanto la CO como el TGCT son problemas importantes de salud en México. El número de casos de CO registrados en el Instituto Nacional de Pediatría de la Secretaría de Salud es de aproximadamente 110 niños al año, según datos del archivo clínico; mientras que la incidencia y mortalidad del TGCT en los últimos años va en aumento. En nuestro país se documenta para el TGCT una incidencia y una tasa de mortalidad de 11.1 y 1.3 respectivamente por cada 100,000 varones recién nacidos vivos (Gco.iarc.fr, 2019).

Actualmente se han reportado algunas variantes genéticas asociadas al desarrollo del TGCT en diferentes poblaciones como en la italiana y holandesa (Looijenga *et al.*, 2003), sin embargo, se desconoce si estas variantes pueden presentarse en pacientes con CO aislada y específicamente en pacientes mexicanos, debido a que se trata de poblaciones con una estructura genética diferente a la presente en población mexicana. La relación molecular entre ambos padecimientos se desconoce, por lo que resulta relevante determinar los factores genéticos involucrados en ambas patologías que apoyen en un futuro con la predicción del riesgo de desarrollar TGCT en pacientes con CO aislada.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 CRIPTORQUIDIA

La criptorquidia (CO; *OMIM* # 219050), es el defecto congénito genitourinario más frecuente en varones y resulta de gran trascendencia debido a las repercusiones en la edad adulta como la infertilidad y el riesgo de desarrollar el TGCT (Sinopidis *et al.*, 2019; Kratz *et al.*, 2010). La CO puede presentarse en un testículo (unilateral) o en ambos (bilateral); además, con base en su localización el testículo con CO se clasifica en: 1) Abdominal, 2) Inguinal y 3) Ectópico (fuera de la vía normal del descenso) (Virtanen *et al.*, 2007). El descenso testicular en el humano se presenta en dos fases denominadas trans-abdominal o dependiente de los genes *INSL3*, *RXFP2* y *HOXA10* e inguinoescrotal o dependiente de andrógenos como se muestra en la Figura 1.

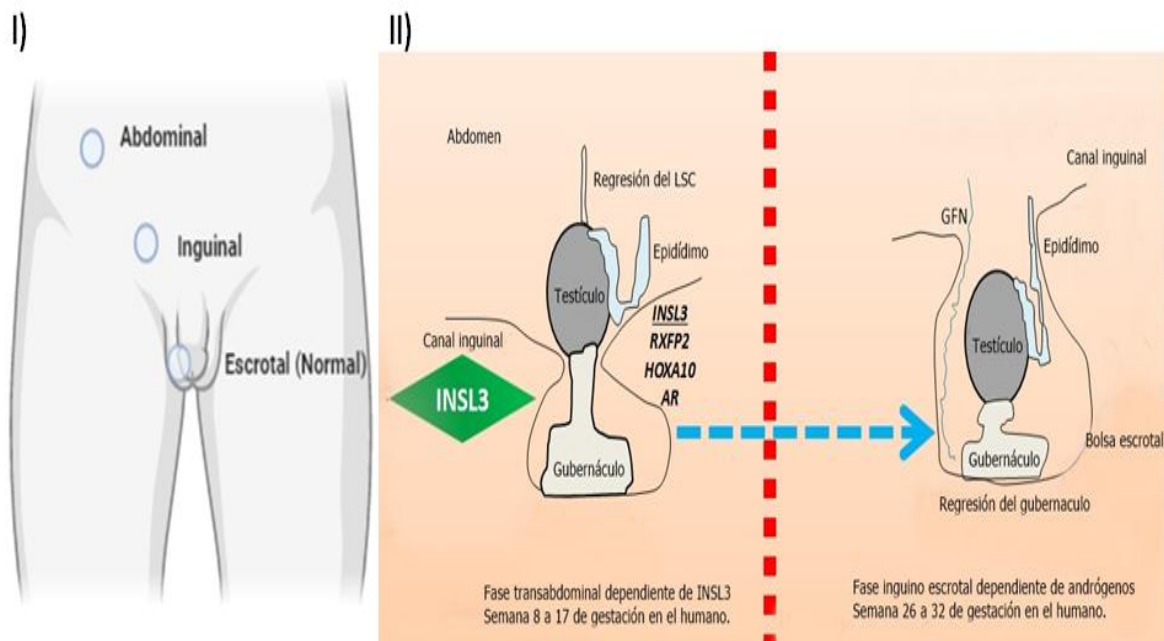


Figura 1. I) Vía normal de descenso testicular. II) Fases del descenso testicular en el varón. Fase transabdominal en donde se observa la regresión del ligamento suspensor craneal (LSC) y el crecimiento del gubernáculo, permitiendo el paso del testículo de la cavidad abdominal hacia el canal inguinal, mientras que en la fase inguinoescrotal se observa la regresión del gubernáculo y el cierre del anillo inguinal, permitiendo el paso del testículo de la canal inguinal hacia la bolsa escrotal. "Creado con [BioRender.com.](https://www.biorender.com/)"

Además, con base en su etiología, la CO puede presentarse como parte de alguno de los más de 250 síndromes genéticos descritos; aunque también puede presentarse como una patología aislada (Virtanen *et al.*, 2007; Foresta *et al.*, 2008). A pesar del amplio conocimiento de la fisiología testicular, la etiología de la CO se mantiene en gran medida desconocida. Además, se ha documentado que esta malformación es el segundo factor de riesgo para el desarrollo de neoplasia testicular. Pacientes con CO presentan un riesgo relativo (RR) de 4.8 (95% de intervalo de confianza 4.0-5.7) de desarrollar TGCT (Kratz *et al.*, 2010; Dieckmann y Pichlmeier, 2004). Aunque esta asociación está establecida clínicamente, los mecanismos que conducen a la carcinogénesis aún se desconocen (Ferguson y Agoulnik, 2013). Se ha documentado que algunos pacientes con CO sobreexpresan *POU5F1*, *c-KIT*, *PLAP*, *AP2γ*, y *SALL4*, los cuales son considerados marcadores característicos de la neoplasia de células germinales *in situ* (GCNIS, del inglés Germ Cell Neoplasia *in situ*), que es la lesión precursora del TGCT (Vigueras-Villaseñor *et al.*, 2015). Además, a nivel clínico se han identificado ciertas condiciones o fenotipos de riesgo en los pacientes con CO, como el desarrollo del TGCT en el testículo contralateral en los pacientes con CO unilateral, es decir el testículo que descendió correctamente (Gurney *et al.*, 2017). Así mismo, se ha demostrado que pacientes con CO intra-abdominal, pacientes con CO bilateral, pacientes con antecedentes familiares de CO o de TGCT y pacientes que no fueron sometidos a orquidopexia de manera oportuna, tienen mayor riesgo de desarrollar una neoplasia testicular (Kratz, Mai y Greene, 2010; Ferguson y Agoulnik, 2013; Elder *et al.*, 2016). Basados en estas observaciones, se ha propuesto por diversos autores que podrían existir factores genéticos que subyacen en la presencia de CO y TGCT. Así, la CO puede ser el primer síntoma de una alteración futura en donde el TGCT y la infertilidad pueden ser las manifestaciones del mismo defecto (Skakkebaek *et al.*, 2001).

3.2 TUMOR TESTICULAR DE CÉLULAS GERMINALES

El TGCT (TGCT; *OMIM* 273300), al igual que la CO se desarrolla en uno o ambos testículos, este tumor es una de las neoplasias genitourinarias que comprende una clase heterogénea de tumores malignos, clínicamente silenciosos en sus primeras etapas, en las que su tratamiento es exitoso, aunque se documenta con un índice significativo de morbilidad y mortalidad (Gco.iarc.fr, 2019; Garner *et al.*, 2005). El TGCT es el tumor sólido más frecuente de aparición temprana, generalmente se presenta en varones jóvenes de entre 15 y 45 años de edad (Trabert *et al.*, 2014). Aunque es muy variable en las diferentes poblaciones, en nuestro país representa el tumor sólido más frecuente y el quinto más mortal en el intervalo de edad ya citado, con una incidencia y una tasa de mortalidad estandarizada de 11.1 y 1.3 por cada 100 000 varones respectivamente (Gco.iarc.fr, 2019). Las razones del incremento en la incidencia y la disparidad racial del TGCT son desconocidas, sin embargo, se ha postulado que el estilo de vida y el ambiente juega un papel importante, así como también la contribución genética, específicamente el fondo genético de cada población a la susceptibilidad del TGCT (Bray *et al.*, 2006).

El esclarecimiento de una asociación genética entre la CO y el TGCT, siendo ambas enfermedades de carácter multifactorial y poligénico, resulta complicado mediante técnicas moleculares convencionales, surgiendo la necesidad de utilizar herramientas genómicas que permitan entender mejor la etiología de ambos padecimientos y su relación molecular.

3.3 ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN DEL GENOMA COMPLETO (GWAS)

3.3.1 GWAS REALIZADOS EN PACIENTES CON CRIPTORQUIDIA

Actualmente, existe poca información sobre estudios de asociación del genoma completo (GWAS, del inglés Genome Wide Association Study) en pacientes con CO (Barthold *et al.*, 2015, Wang *et al.*, 2018; Barthold and Ivell, 2018), y dichos estudios no analizan a esta malformación de manera exclusiva, sino como parte del síndrome de disgenesia testicular, el cual comprende al TGCT, CO, hipospadias e infertilidad (Dalgaard *et al.*, 2011). Los análisis de SNV han identificado genes que participan en el desarrollo de este síndrome, los cuales

funcionan en la vía de señalización TGF β (*TGFBR3* y *BMP7*), resaltando la estrecha relación entre el gen *TGFBR3*, el TGCT y la CO, relación que no había sido descrita previamente (Dalgaard *et al.*, 2011). Se sabe que el gen *TGFBR3* codifica para la proteína TGFBR3 que es expresada en la mayoría de los tejidos a nivel endocrino incluyendo al testículo, particularmente en células de Sertoli y de Leydig, tanto en células normales como en el *GCNIS* (Dias *et al.*, 2007). Además, en este estudio se corroboró la presencia de alteraciones en la vía de señalización *KIT/KITLG* en pacientes con TGCT. Estos reportes ponen de manifiesto el hecho de que el síndrome de disgenesia testicular es un síndrome real, aun cuando se ha cuestionado la relación entre las mismas patologías del síndrome de manera aislada (Loveland *et al.*, 2018). Se propone que el TGCT es altamente dependiente del ambiente y tiene un componente hereditario que es relativamente débil, debido al actual estilo de vida, en donde predomina el uso diario de materiales que contienen compuestos químicos que funcionan como disruptores endocrinos y que interfieren en el adecuado metabolismo hormonal en el varón (Kratz *et al.*, 2010).

3.3.2 GWAS REALIZADOS EN PACIENTES CON TUMOR TESTICULAR DE CÉLULAS GERMINALES

En los últimos años se ha realizado la búsqueda de biomarcadores para el TGCT, documentando diversos factores genéticos presentes en múltiples poblaciones estudiadas, sin embargo, resulta difícil realizar este tipo de estudios ya que es una neoplasia que afecta directamente a la reproducción del varón (Kratz *et al.*, 2010). Por lo tanto, resulta complicado el determinar la predisposición genética, entre una generación y la siguiente, e identificar las lesiones precursoras *in utero*.

Se sabe que los antecedentes familiares aumentan el riesgo de presentar TGCT, sin embargo, este factor de riesgo afecta aproximadamente del 1 al 3% de los pacientes (Kratz *et al.*, 2010). La diferenciación histológica producida al azar, en conjunto con la exposición ambiental de diversos disruptores endocrinos (DE) podría explicar la falta de un fenotipo distintivo entre los propios casos del tumor testicular de células germinales familiares (FTGCT) y los casos de TGCT esporádicos (Mai *et al.*, 2010).

En el año 2000, el *International Testicular Cancer Linkage Consortium (ITCLC)* reportó la asociación entre el *locus* Xq27 y 134 familias con diagnóstico confirmado de TGCT provenientes del *NIH Clinical Center* y de otros países participantes con un $HLOD = 2,01$ y $4,7$ en casos familiares (Kratz *et al.*, 2010). De manera interesante, el 73% de las familias vinculadas a este *locus* de el estudio contaba con antecedentes con CO, mientras que el 26% no presentaron este antecedente ($p=0.03$) (Rapley *et al.*, 2000; Kratz *et al.*, 2010). Este reporte proporcionó evidencia sobre la posible asociación del *locus* Xq27 con el FTGCT y el fenotipo criptorquídico. Sin embargo; un trabajo posterior de este mismo consorcio replicó este mismo estudio con la finalidad de ampliar el análisis a 273 familias y corroborar la asociación previa con el *locus* Xq27 en pacientes con FTGCT y con el fenotipo criptorquídico, sin embargo no se pudo replicar las asociaciones identificadas por el primer estudio. De modo interesante, en este último estudio no se logró identificar nuevos genes candidatos de susceptibilidad con alta penetrancia (Crockford *et al.*, 2006). Debido a la complejidad de la etiología del FTGCT y a los resultados obtenidos, algunos autores propusieron una nueva hipótesis de susceptibilidad genética para esta neoplasia, en donde, el efecto de la epístasis entre múltiples alelos de riesgo comunes de baja penetrancia, podrían ser los responsables del conjunto genético de esta enfermedad, cambiando el abordaje en la investigación del TGCT (Kratz *et al.*, 2010). Diversos autores han propuesto que el TGCT puede presentar múltiple alelos comunes de susceptibilidad como se demostró para la microdelección gr/gr en la región genómica AZFc, en donde esta delección se presentó en 13/431 (3.0%) de casos con FTGCT, 28/1376 (2.0%) con TGCT esporádica, y 33/2599 (1.3%) en hombres sin TGCT, obteniéndose un riesgo de asociación de 3.2 y de 2.1 respectivamente (Nathanson *et al.*, 2005). Concluyendo que esta microdelección en el cromosoma Y era una alteración de susceptibilidad de baja penetrancia. Actualmente, existen un gran número de genes (*DND1*, *ERS1*, *ERS2*, *RLN*, *LHCCGR*, *DICER1*, *AKT1*, *PTEN*, *PDE11A*) en donde se encuentran este tipo de alteraciones sin lograr identificar una asociación concordante y contundente con los casos familiares (Greene *et al.*, 2014). Además, es notable

que los tres genes implicados en casos de TGCT esporádicos identificados mediante GWAS, formen parte de la vía de señalización central KIT/KITLG para la biología de células germinales normales.

Actualmente, hay más de 30 variantes reportadas en más de 18 regiones genómicas asociadas al TGCT que proponen una serie de SNV en genes como *POU5F1*, *DND1*, *KIT*, *KITLG*, *AR*, *DMTR1*, *SPRY4*, *BCL2*, *NANOG*, *TGFBR2*, *PTEN*, *AKT1*, *PDE11A*, *GATA4*, *THOC1* (Turnbull y Rahman, 2011; Litchfield *et al.*, 2017; Kanetsky *et al.*, 2009; Kanetsky *et al.*, 2011; Turnbull *et al.*, 2010; Chung *et al.*, 2013; Ruark *et al.*, 2013; Schumacher *et al.*, 2013), en diferentes poblaciones de estudio, como se muestra en la Figura 2.

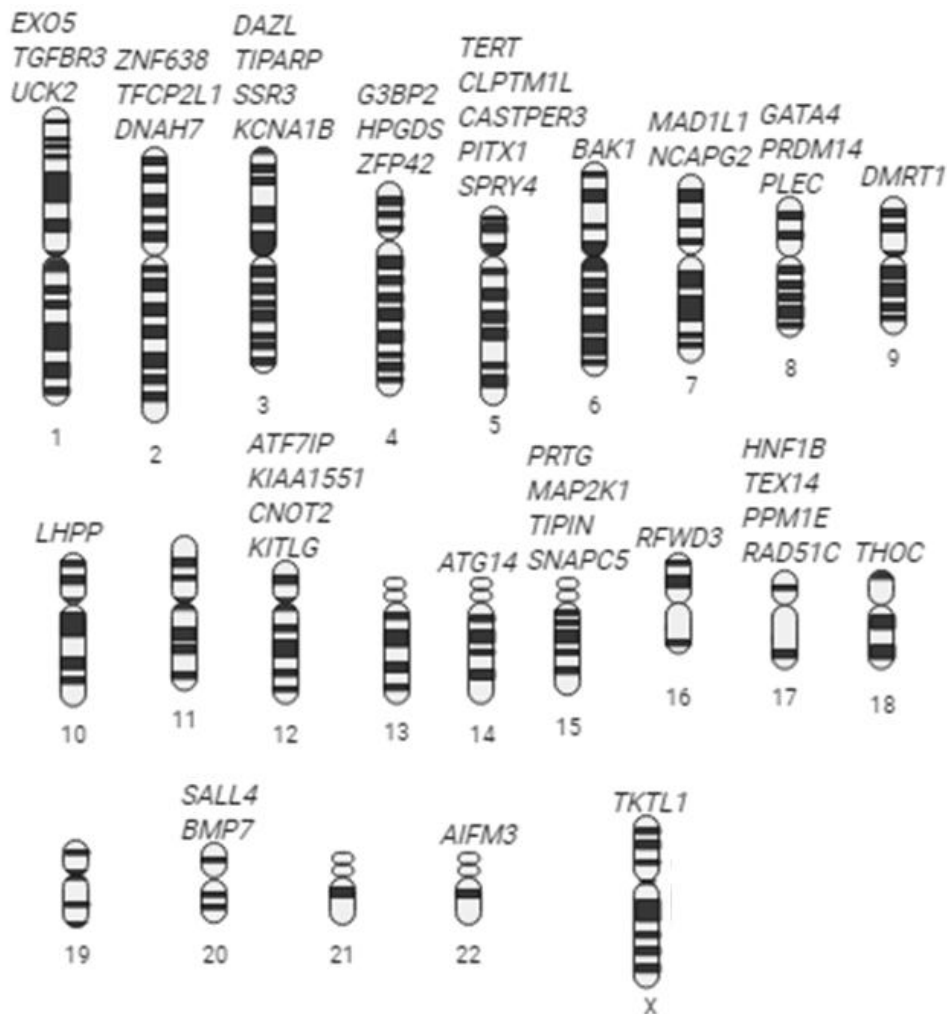


Figura 2. Genes asociados con el desarrollo del TGCT. "Creado con [BioRender.com](https://www.biorender.com/)."

Debido a los múltiples reportes provenientes de diversas poblaciones en donde se asocian SNV al TGCT, ha adquirido un mayor respaldo la hipótesis de susceptibilidad genética, en donde el conjunto de estos alelos de riesgo representa aproximadamente del 15 al 22% de riesgo en el TGCT familiar y esporádico (Kanetsky *et al.*, 2009; Turnbull *et al.*, 2010). Los intentos de asociación entre diversas variantes de un solo nucleótido (SNV, del inglés single nucleotide variant) de riesgo con algunos fenotipos específicos del TGCT como antecedentes familiares de TGCT, CO, hernia inguinal, la edad al diagnóstico, al tumor bilateral, y la histología del tumor, sin éxito contundente (Crockford *et al.*, 2006). Algunos de los genes que han coincidido en diversos GWAS son *KIT*, *KITLG*, *AR*, *BAK1*, *DMRT1*, y *TERT*, (Kratz, Mai y Greene, 2010) corroborando las similitudes genómicas, sin embargo, esto ha sido encontrado tanto en FTGCT como en TGCT esporádico sin distinción (Greene *et al.*, 2014).

Particularmente, se han descrito las siguientes 6 SNV de riesgo para el desarrollo del TGCT en múltiples poblaciones, las 3 primeras SNV rs121913507 (D816V), rs121913506 (D816H) y rs121913514 (N822K) en el gen *KIT* (Looijenga *et al.*, 2003) y las 3 SNV restantes rs201934623 (P392S), rs774171864 (A299T) y rs12014709 (g.67718624T>G) en el gen *AR* (Garolla *et al.*, 2005). Las variantes de ambos genes son de gran relevancia debido al número de reportes que existen de ellas en pacientes con TGCT, así como por el papel que juegan estos genes en el desarrollo del testículo y su influencia en el proceso carcinogénico cuando estos genes se ven alterados. Por su parte, el gene *KIT* resulta esencial para la sobrevivencia, migración y diferenciación de las células germinales tempranas (Sakuma *et al.*, 2003), mientras que el gene *AR* es necesario en la segunda fase del descenso testicular además de mediar la proliferación de los gonocitos de manera normal en el testículo (Garolla *et al.*, 2005).

3.4 VARIACIONES DE UN SOLO NUCLEOTIDO

Una SNV, es una variación en la secuencia del DNA, la cual afecta a una sola base de una secuencia del genoma [adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G)] (Vignal *et al.*, 2002). Las SNV son las variaciones genéticas de un solo nucleótido más comunes entre los individuos, se estima que una SNV se presenta cada 1000 bases. En el pasado, se diferenció entre el término polimorfismo de un solo nucleótido y mutación, siendo los polimorfismos aquellas variantes que se presentaban por arriba del 1% de la población y que en general no se asociaban a una enfermedad, mientras que se consideró mutación a las variaciones de *novó* que surgen en un individuo y éstas no se propagan en la población general (se presentan sólo bajo ciertas características patológicas). Sin embargo, ahora se sabe que incluso lo que puede considerarse una variante rara (< 1%) en una población determinada, puede tener una frecuencia mayor en otra población, por lo anterior el término más adecuado en la actualidad es SNV (Vignal *et al.*, 2002; Feuk *et al.*, 2006).

Se propone de manera general, que las SNV provienen de cambios silenciosos, sin embargo, la presencia de las SNV subyace de los mecanismos generales para la generación de cualquier variante génica, como puede ser 1) la sustitución de bases y 2) por corrimiento del marco de lectura mediante la inserción o delección de un nucleótido como se muestra en la Figura 3. En ambos casos se producen de manera espontánea daños fortuitos en el DNA por errores durante la replicación y por la movilización en el genoma de elementos genéticos transponibles o de forma inducida por exposición a agentes mutagénicos químicos, biológicos y radiaciones. (Antonarakis y Cooper., 2006).

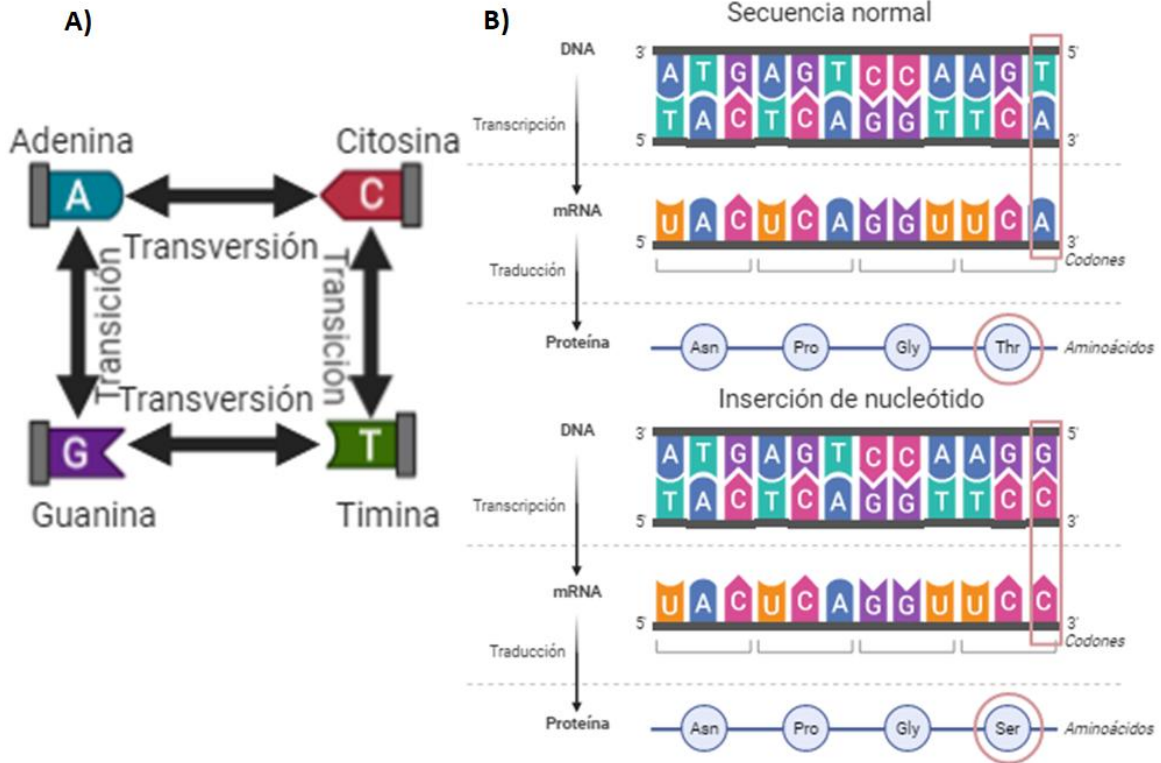


Figura 3. Mecanismos por los cuales se generan las SNV en donde se observa **A)** transiciones [que generan la sustitución entre bases púricas (A) o (G) o bases pirimídicas como (C) o (T)], o transversiones [por la sustitución de bases púricas (A) o (G) a bases pirimídicas como (C) o (T)] y **B)** corrimientos del marco de lectura ya sea por una delección o inserción de nucleótido. “Creado con [BioRender.com](https://www.biorender.com).”

En la actualidad las SNV en los genes *INSL3* (rs121912556), *RXFP2* (rs1555633), *HOXA10* (rs3779456), *RBFOX*, *AR* han mostrado un impacto importante en la determinación del riesgo en el desarrollo de la CO (Komarowska *et al.*, 2015, Barthold *et al.*, 2015, Gurney *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018; Barthold y Ivell, 2018; Cannistraci *et al.*, 2013; Rodríguez *et al.*, 2017; Rodríguez *et al.*, 2018). Mientras que en el TGCT se han identificado SNV en los genes *KITLG* [rs995030 ($OR = 2.55$)], *BAK1* [rs210138 ($OR = 1.37$)], *SPRY4* [rs4624820 ($OR = 1.50$)], *DMRT1* [rs755383 ($OR = 1.5$)], entre algunos otros (Batool *et al.*, 2019; Green *et al.*, 2014; Turnbull *et al.*, 2011; Turnbull *et al.*, 2010; Kratz *et al.*, 2010; Replay *et al.*, 2009; Litchfield *et al.*, 2015). Siendo hasta el momento las SNV, los marcadores genéticos por excelencia para determinar el riesgo en ambas enfermedades de manera individual.

3.5 VARIACIONES EN EL NÚMERO DE COPIAS

Las variaciones en el número de copias (CNV, del inglés copy number variant) representan otras de las variaciones génicas más importantes. Se le denomina CNV a un fragmento particular de DNA el cual contiene una variabilidad en el número de copias respecto al fragmento genómico de referencia. Las CNV se originan a partir de diversos mecanismos moleculares (Hu *et al.*, 2018), como se muestra en la Figura 4.

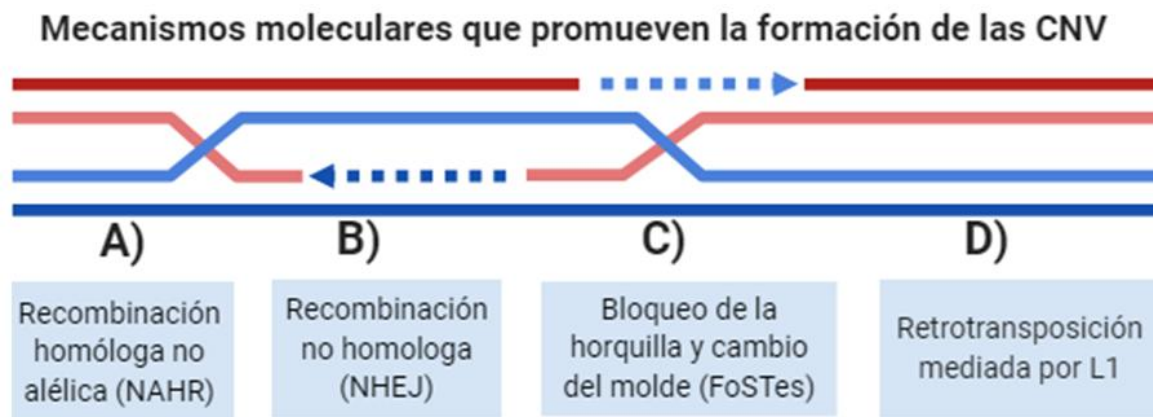


Figura 4. Mecanismos moleculares que promueven las CNV. **A)** Recombinación homóloga no alélica (NAHR), **B)** la recombinación no homóloga (NHEJ), **C)** bloqueo de la horquilla y cambio de hebra molde (FoSTes) y **D)** retrotransposición mediada por L1. “Creado con [BioRender.com](https://www.biorender.com/).”

Las CNV incluyen cambios mutacionales como deleciones, inserciones, duplicaciones, inversiones, translocaciones, siendo las dos primeras las más frecuentes y asociadas al término CNV (Hu *et al.*, 2018). Estos rearrreglos genómicos, difieren en esencia de las alteraciones tradicionalmente observadas en el apareamiento de bases tipo Watson-Crick, pero pueden considerarse polimorfismos neutros en función. Las CNV además de ser propiamente una variación génica, también pueden alterar los niveles de expresión por medio de dosis génica, fusión génica, disrupción génica y por efectos de regulación de largo alcance, afectando al fenotipo individual y jugando un papel crucial en la patogénesis de diversas enfermedades (Gu *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2018).

Evidencia científica reciente ha mostrado que las CNV podrían tener un impacto a nivel biológico en diversas enfermedades como las reproductivas y oncológicas, incluso en el desarrollo del TGCT en procesos tan específicos como el desarrollo

de las células germinales, segregación cromosómica y la respuesta al daño del DNA (Rocca *et al.*, 2017; Rodríguez *et al.*, 2017).

3.6 REGIONES DE HOMOCIGOSIDAD

Recientemente, la identificación y asociación de la presencia de múltiples *loci* que actúan de manera recesiva, confiriendo susceptibilidad al desarrollo de múltiples enfermedades y algunos tipos de cáncer ha ido en aumento (Demant *et al.*, 2003). En principio, esta relación es completamente plausible, debido al respaldo de diversos reportes que describen una mayor prevalencia de cáncer en descendencia de uniones consanguíneas con alto grado de endogamia (Baner *et al.*, 2009); se ha demostrado experimentalmente que la endogamia en ratones aumenta la carga tumoral, así como en la desregulación de la impronta genómica a través de la disomía uniparental, en estas situaciones específicas la homocigosidad puede asociarse directamente con el cáncer (Sud *et al.*, 2015).

De modo interesante, se ha demostrado que debido a la presión selectiva, se producen tramos largos contiguos de homocigosidad (LCSH, del inglés Long Contiguous Stretches of Homozygosity), también conocidas como regiones de homocigosidad (ROH, del inglés Runs of homozygosity) con alta frecuencia en poblaciones exogámicas, resultando en autocigosidad (ubicación conjunta de dos alelos en un *locus* determinado que se origina de un ancestro común de apareamiento no aleatorio) (Loveday *et al.*, 2019). Estas ROH de forma homocigota pueden ser ampliamente importantes como variantes deletéreas y raras en el cáncer (Baner *et al.*, 2009).

Resulta importante destacar que ha surgido evidencia para el TGCT que sugiere la susceptibilidad recesiva o ligada al cromosoma X, ya que se sabe que existe un riesgo más elevado entre hermanos, respecto al riesgo descrito entre padre e hijo (Loveday *et al.*, 2019). Sin embargo, no se han identificado ROH de manera individual en pacientes con TGCT o con CO aislada hasta el momento y mucho menos ROH que pudieran presentarse de manera compartida entre ambos padecimientos.

Debido a todos antecedentes anteriormente mencionados, este trabajo pretende identificar mediante un abordaje genómico, un perfil de variantes genéticas compuestas por SNV, CNV y ROH que permitan asociar a la CO aislada y al TGCT.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La CO es el defecto congénito genitourinario al nacimiento más frecuente en varones a término con una incidencia variable entre las diferentes poblaciones humanas, además es considerada una anomalía urogenital frecuente y uno de los factores de riesgo mejor documentado para el desarrollo de TGCT (Kratz *et al.*, 2010; Dieckmann y Pichlmeier, 2004). Esta neoplasia representa al tumor sólido más frecuente en varones jóvenes de entre 15 y 45 años de edad (Gco.iarc.fr, 2019). Recientemente se han identificado diversos genes involucrados con el desarrollo del TGCT de manera discordante, sugiriendo que el papel de las mutaciones altamente penetrantes no juegan un papel relevante en el TGCT al ser una neoplasia que afecta directamente a la reproducción (Rapley *et al.*, 2000; Nathanson *et al.*, 2005; Crockford *et al.*, 2006; Kratz *et al.*, 2010). El posible papel de la epístasis entre variantes frecuentes como las SNV, CNV, ROH o mutaciones con una baja penetrancia pudiera explicar de mejor manera la etiología del TGCT y su relación con la CO aislada como factor de riesgo (Greene *et al.*, 2014). Hasta la fecha no se cuenta con un panel de marcadores genéticos asociados al desarrollo de TGCT en pacientes con CO aislada, por lo que la búsqueda e identificación de SNV, CNV y ROH permitirá en un futuro identificar marcadores genéticos para un diagnóstico, pronóstico y un tratamiento más certero y oportuno en pacientes con TGCT.

5. HIPÓTESIS

El perfil genético en común entre pacientes con criptorquidia aislada y pacientes con tumor testicular de células germinales podría asociarse a vías de regulación de la carcinogénesis.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

- Identificar el perfil genético asociado al tumor testicular de células germinales en pacientes con criptorquidia aislada.

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar las características clínicas relevantes en pacientes con CO aislada y pacientes con TGCT.
- Rastrear de manera dirigida 6 SNV asociados al TGCT en la población de estudio.
- Determinar el componente ancestral de los grupos analizados.
- Identificar el perfil genético compuesto por SNV, CNV y ROH en pacientes con CO aislada y TGCT
- Buscar de manera *in silico* cuales son las rutas ontológicas implicadas en el perfil genético identificado.
- Determinar la frecuencia de las variantes identificadas en el estudio.
- Comparar las frecuencias obtenidas de las variantes identificadas con lo reportado en otras poblaciones de referencia.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 CLASIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Clasificación de acuerdo con los ejes de trabajo

- Finalidad: Descriptivo
- Secuencia temporal: Transversal
- Control de asignación de los factores de estudio: Observacional
- Direccionalidad: Ambispectivo

7.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO

7.2.1 POBLACIÓN OBJETIVO

Pacientes pediátricos mexicanos con diagnóstico confirmado de CO aislada y pacientes mexicanos con diagnóstico confirmado de TGCT.

7.2.2 POBLACIÓN ELEGIBLE

Pacientes pediátricos con diagnóstico de CO aislada que hayan acudido a recibir atención al Instituto Nacional de Pediatría entre 2008 y 2019 y pacientes con diagnóstico de TGCT que hayan acudido a recibir atención al Instituto Nacional de Cancerología entre 2003 y 2019.

7.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN

7.3.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Pacientes provenientes de la República Mexicana con ascendencia mexicana mínima de dos generaciones.
- Pacientes con diagnóstico confirmado de TGCT con y sin antecedentes de CO aislada.
- Pacientes con diagnóstico confirmado de CO aislada.

7.3.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Se excluyeron temporalmente a los pacientes que fueron transfundidos en los últimos tres meses previos a su captación.
- Pacientes con CO secundaria a procedimientos quirúrgicos previos.
- Pacientes con testículo retráctil o dudosamente criptorquídico.
- Pacientes e individuos con antecedente de cirugía inguinal.
- Pacientes con tumor testicular secundario.
- Pacientes e individuos con alguna otra anomalía genital.
- Pacientes e individuos con algún síndrome cromosómico.

7.4 CONSIDERACIONES ÉTICAS

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

Los individuos control, los pacientes adultos con TGCT y los pediátricos mayores de 12 años con CO idiopática firmaron una carta de asentimiento informado, mientras que los padres de los pacientes y controles menores de 12 años firmaron una carta de consentimiento informado. La información obtenida de los pacientes durante el estudio se mantuvo con estricta confidencialidad y se mantuvo estricto apego a la Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los derechos humanos promulgada por la UNESCO.

7.5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Se reclutó un total de 328 individuos, los cuales fueron clasificados en 3 grupos de estudio: **1)** 79 pacientes con diagnóstico confirmado de TGCT provenientes de la consulta externa del servicio de Urología, del Instituto Nacional de Cancerología (INCan), de los cuales 13 cursaron con CO aislada en edad pediátrica **2)** 91 pacientes pediátricos con diagnóstico de CO aislada, referidos del servicio de Urología del Instituto Nacional de Pediatría (INP) y **3)** 158 individuos control sin ningún tipo de padecimiento oncológico y urológico, referidos del servicio de cirugía del INP. En todos los casos se efectuó una historia clínica completa y se obtuvo el DNA genómico a partir de una muestra de sangre periférica y en el caso de los 13 pacientes con ambos padecimientos se obtuvo a partir de tejido testicular tumoral incluido en parafina, para iniciar el rastreo de 3 SNV en el gen *KIT* y 3 en el gen *AR* asociados con el TGCT en otras poblaciones mediante discriminación alélica, para buscar alguna asociación con las características clínicas analizadas en nuestra población de estudio. Para el GWAS se seleccionó una muestra representativa de 175 muestras, 25 del grupo 1 (TGCT), 25 del grupo 2 (CO aislada) y 125 de grupo 3 (controles), las cuales presentaron concentraciones adecuadas de DNA genómico integro para ser sometidas al análisis genotipificación masiva. El estudio se realizó mediante las herramientas bioinformáticas *PLINK 1.90* (Purcells *et al.*, 2007) y *ChAS 3.1* respectivamente para la búsqueda de un perfil genético compuesto de SNV, CNV y ROH. En ambos casos, se requirió que los datos obtenidos de la genotipificación cumplieran con criterios de calidad específicos, los cuales se describen posteriormente, de tal manera que para el caso del perfil de las SNV se realizó con 20 muestras del

grupo 1 (TGCT), 21 muestras del grupo 2 (CO aislada) y 116 muestras del grupo 3 (control), mientras que para el perfil de las CNV y ROH se realizó con 22 muestras del grupo 1 (TGCT), 19 muestras del grupo 2 (CO aislada) y 125 muestras del grupo 3 (control) como se observa en la Figura 5.

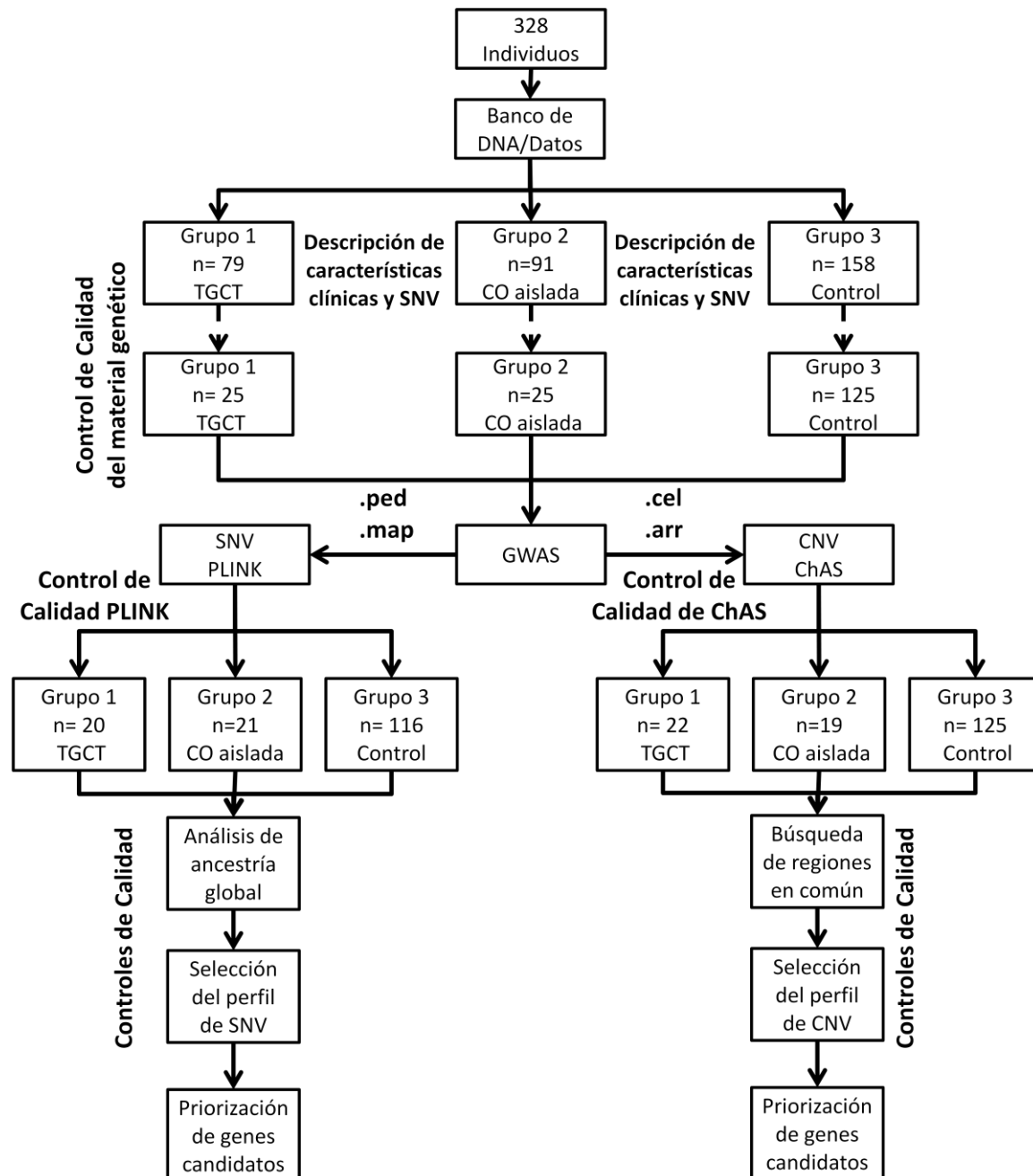


Figura 5. Algoritmo metodológico en donde se muestra a los 328 individuos clasificados en 3 diferentes grupos, en los que se analizaron las características clínicas y 6 SNV de riesgo reportados en población holandesa e italiana y posteriormente a partir de estos se seleccionó 175 muestras para realizar el GWAS para determinar el perfil de genético de SNV, CNV y ROH en común entre pacientes con CO aislada y pacientes con TGCT mediante análisis de microarreglos de genotipificación.

7.6 DESCRIPCIÓN EXPERIMENTAL DEL ESTUDIO

7.6.1 MUESTRAS BIOLÓGICAS

El estudio molecular se realizó a partir de linfocitos de sangre periférica de los individuos de todos los grupos, con excepción de los 13 pacientes que cursaron con ambos padecimientos (TGCT y CO aislada) de los cuales se utilizó el tejido testicular incluido en parafina.

7.6.2 EXTRACCIÓN DE DNA A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA

Se obtuvo el DNA genómico a partir de una muestra de 7 mL de sangre periférica colectada en tubos de 10 mL con EDTA como anticoagulante. La muestra sanguínea se centrifugó durante 30 minutos a 3,500 rpm, posteriormente se recolectó la capa de linfocitos y se les adicionaron 6 mL de solución para lisis de eritrocitos (*RCBL*) la cual contiene Tris 10mM, MgCl₂ 5mM y NaCl 10mM, se agitó suavemente y se centrifugó por 10 minutos a 3000 rpm. La pastilla celular se resuspendió en 6 mL de *RCBL*, se agitó suavemente y se centrifugó por 10 minutos a 3000 rpm, este paso se repitió hasta eliminar toda la hemoglobina de la muestra. Finalmente, se resuspendió el botón de linfocitos en 333 µL de *RCBL* con 1.5 mL de solución para lisis de linfocitos (*WCBL*) la cual contiene Tris 10mM, EDTA 10mM, NaCl 50mM, SDS 0.2% y proteinasa K 200µg/mL y posteriormente se incubó toda la noche a 42°C para tener un lisado de linfocitos.

7.6.3 PURIFICACIÓN DE DNA

Al lisado linfocitario se agregaron 2 mL de fenol, se agitó suavemente por 10 minutos y se centrifugó durante 10 minutos a 3000 rpm, la fase superior acuosa se transfirió a un tubo limpio sin tocar la fase intermedia del lisado y se repitió el proceso anterior. Una vez obtenida en la totalidad la fase acuosa, se le agregó 1 mL de fenol y 1 mL de cloroformo, se agitó suavemente y se centrifugó por 10 minutos a 3000 rpm, nuevamente la fase superior acuosa se transfirió a un tubo limpio sin tocar la fase intermedia y se repitió el proceso anterior. Posteriormente, a la totalidad de la fase acuosa se le transfirió a un tubo limpio y se agregó 2 mL de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se agitó suavemente y se centrifugó por

10 minutos a 3000 rpm. Finalmente, la fase superior acuosa se colocó en un tubo limpio y se agregaron 90 μL de NaCl 1M y 3 mL de EtOH absoluto a -20°C . La mezcla se agitó suavemente hasta que se precipitó el DNA, el cual se colectó con una pipeta Pasteur sellada, se colocó en un tubo limpio y se secó por 10 minutos a temperatura ambiente. El DNA se lavó con EtOH al 70% a -20°C , se dejó secar a temperatura ambiente una vez más, se resuspendió en 200 μL de H_2O destilada estéril y se almacenó a -4°C hasta su uso.

7.6.4 EXTRACCIÓN DE DNA DE TEJIDOS INCLUIDOS EN PARAFINA

Se obtuvieron 4 cortes de 20 μm de grosor de cada uno de los 13 bloques de tejido testicular incluido en parafina de los pacientes con TGCT y CO aislada. Las muestras se colocaron en microtubos de 2 mL. La extracción de DNA genómico se realizó utilizando el KIT FFPE RNA/DNA Purification Plus Kit de NORGEN BIOTEK CORP® mediante las especificaciones mencionadas por el fabricante. Brevemente, se eliminó la parafina y se lisó el tejido, posteriormente se purificó el DNA por columna y se obtuvo el DNA en 20 μL de H_2O estéril. Las muestras fueron almacenadas a -4°C hasta su uso.

7.6.5 EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL DNA

7.6.5.1 CUANTIFICACIÓN DEL DNA

La cuantificación del DNA y la determinación de su pureza se realizó mediante el NanoDrop ND-1000 de Thermo Fisher Scientific®. Para esto, se tomó 1 μL de muestra y se registró la concentración a una longitud de onda (λ) a 260 nm, la cantidad de DNA resultante se expresó en $\text{ng}/\mu\text{L}$, además de obtener la pureza con base en la relación 230 nm (longitud a la que absorben los alcoholes) y 280 nm (longitud de onda a la que absorben las proteínas). La pureza del DNA se calculó por medio del cociente obtenido de las lecturas 260/230 y 260/280 nm. Posteriormente, se obtuvo una dilución de trabajo a una concentración promedio de 200 $\text{ng}/\mu\text{L}$, creando así bancos de DNA con muestras de almacenamiento y muestras de trabajo.

7.6.5.2 INTEGRIDAD DEL DNA

La integridad del DNA se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se realizó una mezcla de 2.5 µL de muestra de DNA con 1.5 µL de amortiguador de carga (colorante azul de bromofenol-xilencianol (0.05%: 0.05%). El gel se corrió a 100 volts por 30 minutos y el DNA fue teñido con el intercalante EzVision® para visualizarse en un transiluminador Benchtop UV Transilluminator UVP.

7.6.6 DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS EN COMÚN ENTRE PACIENTES CON TGCT Y PACIENTES CON CO AISLADA

Se realizaron dos bases de datos para las poblaciones de interés, tanto para los pacientes pediátricos con diagnóstico confirmado de CO aislada como para los pacientes con diagnóstico confirmado de TGCT, recabándose los datos propuestos en este trabajo mediante la revisión de expedientes clínicos en versión electrónica y física provenientes del Instituto Nacional de Pediatría y del Instituto Nacional de Cancerología. Para el caso de los pacientes con CO aislada se buscó de manera intencionada la edad al diagnóstico, localización de la CO, la edad en la que los pacientes recibieron las intervenciones quirúrgicas como orquiectomía y orquidopexia, y la historia familiar de CO y de TGCT. Para el caso de los pacientes con TGCT se buscó de manera intencionada la edad al diagnóstico del tumor, su localización, el estadio clínico al momento del diagnóstico, la presentación y localización de metástasis, la clasificación histológica del tumor y antecedentes de CO aislada. Con estos datos clínicos se obtuvieron y analizaron las distribuciones y frecuencias de los fenotipos y rasgos clínicos de ambos grupos de estudio.

7.6.7 BÚSQUEDA DIRIGIDA DE 6 SNV ASOCIADAS AL DESARROLLO DE TGCT EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se genotipificaron tres SNV en el gen *KIT*: rs121913507 (D816V), rs121913506 (D816H), y rs121913514 (N822K) y tres SNV en el gen *AR*: rs201934623 (P392S), rs774171864 (A299T) and rs12014709 (g.67718624T>G) mediante el método de discriminación alélica 5' exonucleasa de TaqMan® (Applied Biosystems). Para este análisis se diseñaron dos sondas específicas para cada variante alélica, las

cuales fueron marcadas en el extremo 5' con VIC para el alelo 1 o silvestre (sonda 1) y FAM para el alelo 2 o variante (sonda 2), además ambas sondas tuvieron en el extremo 3' un *quencher* (TAMRA) el cual inhibe la emisión de fluorescencia mientras la sonda permanece intacta.

Para los experimentos de discriminación alélica, se realizó una mezcla de reacción en 5µL de volumen final como se indica en la Tabla 1. La reacción se hizo en un Termociclador Step One Real-Time PCR System de Applied Biosystems.

Tabla 1. Condiciones de la mezcla para los ensayos de discriminación alélica.

REACTIVO	VOLÚMEN
Universal PCR MASTER MIX	2.5µL
SONDA	0.0625µL
H ₂ O	0.4375µL
DNA	2.0 µL=100ng/µL (200 ng)
Volumen final	5.0µL

El reactivo TaqMan® Universal Master Mix de Applied Biosystems, contiene la enzima AmpliTaq Gold® DNA Polimerasa necesaria para la amplificación del DNA ya que esta enzima tiene actividad tanto de DNA polimerasa como de exonucleasa 5'-3', lo que la hace capaz tanto sintetizar la cadena de DNA, como de digerir la sonda marcada que ha sido hibridada con su cadena molde durante la amplificación y de esa manera liberar el fluorocromo de la acción inhibidora de fluorescencia del *quencher* sobre la sonda, como se muestra en la Figura 6.

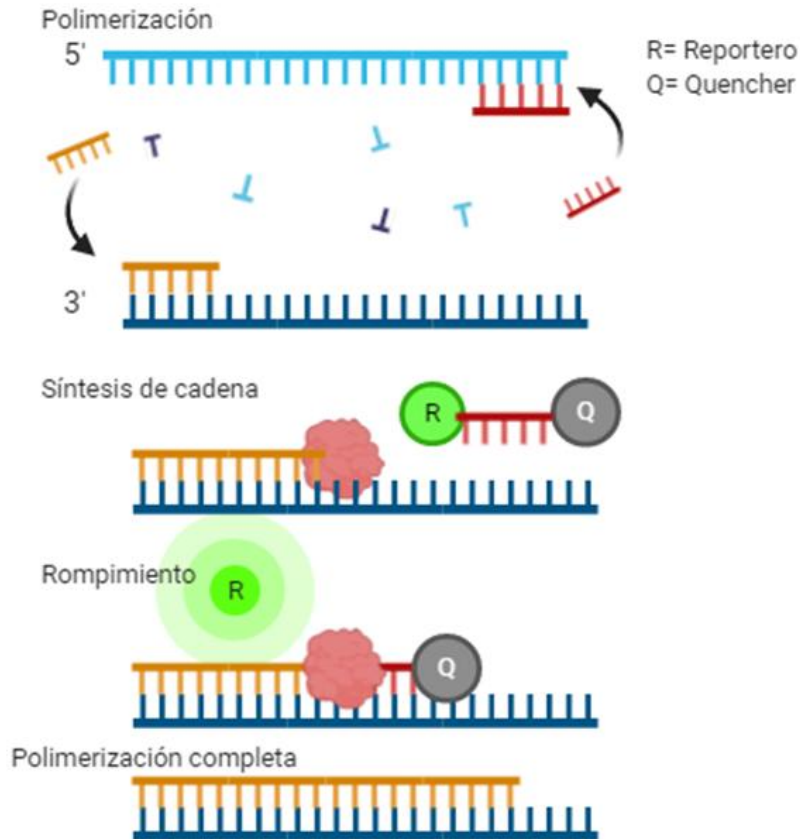


Figura 6. Método de fluorescencia de 5' exonucleasa (TaqMan®) para determinación de variantes de un solo nucleótido por discriminación alélica en donde se muestra un ensayo de PCR convencional. Este ensayo cuenta además con una sonda compuesta por una molécula reportera fluorescente (R) y un quencher (Q) que inhibe la fluorescencia de R. Cuando esta sonda hibrida con el alelo específico para la cual fue diseñada, la AmpliTaq Gold DNA polimerasa con función de exonucleasa degrada la sonda y libera la molécula reportera y se emite la señal fluorescente, finalizando la síntesis del material genético. "Creado con [BioRender.com](https://www.biorender.com)."

De tal manera que, dadas las condiciones de exigencia utilizadas durante la reacción, sólo la sonda específica para la SNV presente será capaz de hibridar. Por lo tanto, es posible diferenciar un alelo del otro con base en el tipo de fluorescencia emitida. Con esta técnica se pueden identificar pacientes heterocigotos u homocigotos para el alelo silvestre o variante como se muestra en la Figura 7.

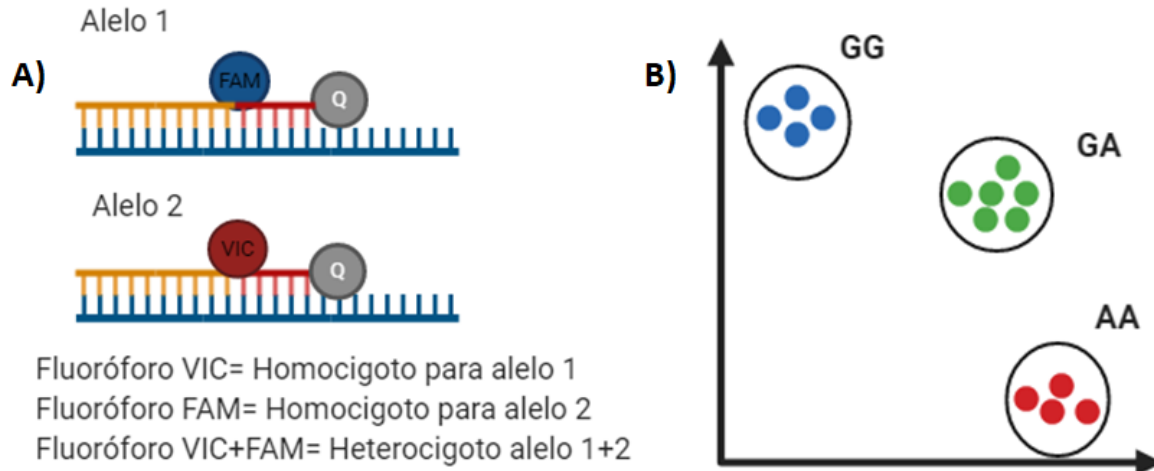


Figura 7. A) Opciones de hibridación de las sondas VIC y FAM generando genotipos homocigotos y heterocigoto. B) Gráfica de discriminación alélica que muestra la detección de genotipos GG en azul, AG en verde y AA en rojo. “Creado con BioRender.com.”

7.6.8 GENOTIPIFICACIÓN MEDIANTE MICROARREGLOS

La genotipificación del genoma completo de los 175 individuos seleccionados se realizó a partir de soluciones de trabajo de DNA con una concentración de entre 60 y 80ng/μL con índices de 260/280 y 260/230 ≥ 1.2 . Se utilizó el arreglo *Genome-Wide Human SNP Array 6.0* (Affymetrix, Santa Clara, CA) de acuerdo con lo establecido con las instrucciones del fabricante con origen en el National Center for Genome Medicine, Academia Sinica, Taipei, Taiwan (http://ncgm.sinica.edu.tw/ncgm_02/index.html). Este microarreglo contiene más de 1.8 millones de marcadores, de los cuales 906,600 corresponden a sondas para SNV y 946,000 a sondas para CNV. Estas sondas corresponden a secuencias que están distribuidas uniformemente en todo el genoma con una distancia media entre las sondas de ~0.7 kb. Las intensidades de fluorescencia después de la hibridación fueron capturadas en el GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix, Santa Clara, CA).

7.6.9 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DEL GENOMA COMPLETO ENTRE PACIENTES CON CO AISLADA Y PACIENTES CON TGCT

Para identificar los marcadores de riesgo compartidos entre CO aislada y TGCT, se realizaron dos *GWAS* de manera individual, el primero se obtuvo al contrastar TGCT vs controles y el segundo al contrastar CO aislada vs controles. A partir de estos perfiles, se seleccionó aquellos marcadores que destacaron por la concordancia en los valores significativos individuales *P*, lo que generó el perfil genético en común entre CO aislada y TGCT compuesto por SNV, CNV y ROH. Cabe señalar que para evitar la asociación espuria entre ambos padecimientos se llevó a cabo el análisis genómico bajo diferentes controles de calidad para la determinación de los marcadores de riesgo en el estudio.

7.6.9.1 IDENTIFICACIÓN DE LAS SNV

Para el caso de las SNV se llevó a cabo el análisis genómico bajo controles de calidad por persona previo a los controles de calidad por marcador genético, con la finalidad de maximizar los resultados obtenidos en el estudio, lo que evitó eliminar marcadores de riesgo debido a un error en la genotipificación de individuos.

Inicialmente los archivos .ped y .map obtenidos del procesamiento de los microarreglos fueron transformados a una extensión .bed, .bim, .fam y .log. y se integró aquellos datos con el sentido de lectura en la cadena complementaria del DNA (versiones diferentes del microarreglo). Posteriormente en una primera etapa, se sometieron los datos obtenidos del análisis de microarreglos a controles de calidad por individuo mediante el software *PLINK 1.90* (Purcells *et al.*, 2007), el cual se desempeña bajo el sistema operativo Linux®. Estos consistieron en cuatro pasos 1) Eliminación de individuos con información sexual discordante, las diferencias entre el genotipo y el sexo se calculó con la tasa de homocigosidad en todas las SNV del cromosoma X para cada uno de los individuo incluidos y se comparó con la tasa esperada (en el caso de muestras de varones la tasa es igual 1). 2) Eliminación de individuos con una tasa de heterocigosidad atípica, con un porcentaje que va del 3-7%, este control refleja la calidad de la muestra,

normalmente individuos con valores excesivos o reducidos de heterocigosidad son indicativos de una muestra de DNA contaminada o de presencia de endogamia respectivamente. 3) Eliminación de individuos duplicados o relacionados, esto induce un sesgo ya que los genotipos obtenidos pueden estar sobre representados al ser el mismo individuo o pertenecer a la misma familia, lo cual ya no es un reflejo fiel de la frecuencia alélica poblacional. 4) Eliminación de individuos por ancestría divergente, el no determinar este parámetro puede ser una fuente importante de sesgo, debido a las diferencias poblacionales influyen fuertemente en el efecto sobre riesgo-enfermedad.

Para este último parámetro los 3 grupos de estudio (pacientes con TGCT, pacientes con CO aislada y los individuos control) se sometieron al análisis de ancestría global 3K por componentes principales (PCA) con los programas *EIGENSOFT 7.2.1* (Price *et al.*, 2006) y *ADMIXTURE 1.3.0* (Alexander *et al.*, 2011). El análisis consistió en usar los PCA para detectar y corregir la estratificación de la población mediante la reducción de dimensiones al considerar las combinaciones lineales de datos originales de marcadores de ancestría (AIM), los cuales explican generalmente la mayor cantidad de variaciones entre los datos. En este análisis se incluyeron 96 AIM y se utilizaron 3 poblaciones de referencia obtenidas del Proyecto de los 1000 Genomas: 1) CEU (Utah Residents with Northern and Western European Ancestry), 2) YRI (Yoruban in Ibadan, Nigeria) y 3) NAT o MMs (Mestizo-mexicanos) MXL (Mexican Ancestry in Los Angeles, California).

En una segunda fase, se sometieron los datos a cuatro controles de calidad por marcador, los cuales consistieron en 1) Eliminación de SNV con una tasa de genotipificación baja, la eliminación de estos marcadores es de suma importancia para este tipo de estudios ya que estos pueden presentarse como falsos positivos, lo que reduce la capacidad real de identificar marcadores de riesgo, en este estudio se eliminó aquellos marcadores con una tasa de genotipificación <98%. 2) Eliminación de SNV que mostraron una desviación significativa del *HWE*, ya que

esto es un indicativo de un error en la genotipificación, en este trabajo se eliminó aquellos marcadores con un valor de $P < 0.001$ para este parámetro. 3) Eliminación de SNV con una tasa de genotipificación baja entre casos y controles, con la finalidad de eliminar SNV mal genotipificados y reducir confusión en la selección de SNV en el estudio. 4) Eliminación de todos los marcadores con una frecuencia baja del *MAF*, ya que estas SNV pueden generar falsos positivos entre casos y controles al ser marcadores raros presentes en pocos individuos resultando poco probable encontrar una asociación con estos marcadores, en este trabajo se considero eliminar una *MAF* de $< 1\%$.

7.6.9.2 IDENTIFICACIÓN DE LAS CNV Y ROH

A partir del análisis de microarreglos se obtuvieron los archivos CEL y ARR del *Genome-Wide Human SNP Array 6.0* de Affymetrix, su procesamiento se realizó mediante el software Chromosome Analysis Suite (ChAS) 3.1 para el análisis citogenético. El procesamiento de la señal se realizó por ajuste de covariable de señal, corrección de fragmento, normalización de doble cuantil y el resumen de señal de PLIER. La normalización de cuantil se realizó para igualar el número de copias de distribución de intensidad de cada matriz y las sondas de SNV por separado. Para los marcadores de SNV se resumieron múltiples sondas de cada alelo en valores individuales. El número de copias (NC) se calculó mediante los segmentos ocultos del número de copias del modelo de Markov después del cálculo de \log^2 , la corrección de la imagen del filtro de paso alto, el ajuste de covariables de la relación \log^2 y la eliminación sistemática de las variables residuales. La base de referencia para $NC=2$ (estado de número de copia autosómico normal) fue establecida y utilizada por el software de análisis por la compañía Affymetrix quienes utilizaron un conjunto de 380 individuos fenotípicamente normales como referencia. La muestra de referencia incluye 186 mujeres para el cromosoma X y 194 hombres para el cromosoma Y. Las relaciones de \log^2 para cada marcador se calcularon en relación con el perfil de señal de referencia. Los resultados de los datos resumidos (archivos CYCHP) se consideraron aberraciones cromosómicas en formatos de tablas y gráficos. También se agregó una inspección visual del rendimiento de la sonda para

segmentos alterados. Intensidad de referencia destinada a representar el número normal de copia (típicamente 2). Las relaciones superiores a 2 significan ganancia de NC, las relaciones inferiores a 2 significan pérdidas de NC. Los números de copia de DNA anormales se identificaron por la compañía Affymetrix automáticamente usando 25 marcadores de pérdida/50 marcadores de ganancia. Con la intención de obtener dos perfiles genéticos, a partir de los perfiles genéticos individuales se realizó una inspección visual basada en la concordancia de valores individuales de frecuencia de regiones genómicas idénticas y de los valores significativos de P , para la selección del perfil genético en común entre ambos padecimientos.

7.6.10 COMPARACIÓN DEL PERFIL GENÉTICO CON LO ANOTADO EN BASES DE DATOS

Para el caso de las SNV identificadas, se corroboró la información mediante el UCSC Genome Browser (NCBI37/hg19), además, se determinó la función de las SNV identificadas, se verificó si estaban descritas algunas correlaciones genotipo-fenotipo a nivel clínico y se compararon las frecuencias de las SNV con lo reportado en otras poblaciones en las bases de datos dbSNP, Ensembl, VEP (Variant Effect Predictor) respectivamente.

En cuanto al contenido de las regiones de CNV y ROH identificadas, se corroboró mediante el UCSC Genome Browser (NCBI37/hg19) y se compararon con bases de datos de variantes genómicas DGV (Database of Genomic Variants) para excluir las variantes de cambios en el número de copias benignas, es decir que estas pueden diferir entre diversas poblaciones humanas pero no están asociadas a ningún padecimiento. También se utilizaron las bases de datos de DECIPHER (Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources), Clin Gen Dosage Sensitivity Map y ECARUCA (European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations), como fuentes de información para la correlación genotipo-fenotipo.

7.6.11 DETERMINACIÓN DE LOS GENES CANDIDATOS

Se realizó la priorización de genes candidatos mediante ensayos bioinformáticos *in silico*, para identificar las principales funciones genéticas y las diferentes vías ontológicas, sumado a la identificación de la interacción proteína-proteína implicada en el perfil identificado. Para seleccionar los genes asociados al riesgo dentro de un conjunto de *loci* de SNV, CNV y ROH candidatos, se empleó un método de priorización de genes para los perfiles genéticos, utilizando la identificación de rutas biológicas y ontológicas, así como la formación de subredes de interacciones proteína-proteína. Con las SNV incluidas en regiones codificantes y los genes ubicados dentro de las regiones cromosómicas seleccionadas de las CNV y las ROH, se realizó el análisis de enriquecimiento para *KEEG* (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>), *Panther Pathway 16* (Mi *et al.*, 2020) y Gene Ontology (GO) (Ashburner *et al.*, 2000) mediante los softwares *GeneCodis 4.0* (Tabas *et al.*, 2012) y *DAVID 6.8* (Huang *et al.*, 2009) las cuales se utilizaron para identificar componentes de vías de señalización, ontología génica y funciones moleculares, posteriormente se evaluaron las posibles interacciones proteína-proteína con un valor de $K=3$ usando *STRING 11.0* (Szklarczyk *et al.*, 2019).

7.6.12 TAMAÑO DE LA MUESTRA

El tamaño de la muestra se calculó a partir del concepto teórico de la máxima determinación para el cálculo de sujetos necesarios para la estimación de una proporción (variable cualitativa), con un nivel de precisión de $\pm 4\%$ ($i=0.04$), un nivel de significancia del 95%, con una proporción esperada de 0.05; $Z_{\alpha} (2) = 1.96$, este cálculo resultó en una n de 212 individuos para cada grupo de estudio (TGCT, CO aislada y controles).

7.6.13 DEFINICIONES OPERACIONALES

1. **Criptorquidia:** testículo permanentemente por arriba del anillo inguinal externo, no descendible al escroto con maniobras bimanuales, o no palpable (detectado mediante ultrasonido abdominal).
2. **Tumor Testicular de Células Germinales:** es un tipo de tumor de testículo que se origina del epitelio germinal de los túbulos seminíferos.
3. **Aislada:** Se definió en este trabajo como aquellos pacientes que únicamente presentaron CO sin presentar otra anomalía urológica o algún síndrome cromosómico.
4. **Grupo control:** Individuo sin criptorquidia ni alteración genitourinaria, inguinal, oncológica o con cualquier otra patología referida en los criterios de exclusión.
5. **SNV:** Variante génica de un solo nucleótido, que carece de certeza en la determinación de su frecuencia poblacional.
6. **CNV:** Variación genética que consiste en un rearrreglo genómico que incluye deleciones, inserciones, duplicaciones, inversiones, translocaciones.
7. **ROH:** Regiones de homocigosidad con alta frecuencia en poblaciones exogámicas resultando en autocigosidad.
8. **Paciente mexicano:** Nacido en la República Mexicana con al menos 2 generaciones (padres y abuelos), igualmente nacidos en México, por rama paterna y materna y que mediante evaluación de marcadores genéticos de ancestría que coincidan con lo descrito para la población mexicana.
9. **Genotipificación:** Caracterización genética o genómica de los individuos incluidos en el estudio.

7.6.14 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se elaboró una base de datos en donde se capturaron los resultados obtenidos; antes del análisis se verificó que no existieran datos erróneos con la ayuda de la búsqueda de valores extremos, los valores perdidos quedaron excluidos del análisis de manera individual. Se analizaron los resultados clínicos y moleculares de la primera etapa con estadística descriptiva contemplando: 1) Medidas de tendencia central con desviación estándar y de dispersión para las variables cuantitativas, así como pruebas de normalidad. 2) Proporciones para las variables cualitativas. 3) Se realizaron tablas, así como gráficas de barras para las variables cualitativas e histogramas para variables cuantitativas. 4) Para cumplir con los objetivos analíticos se realizó un análisis bivariado en donde se compararon las variables numéricas de las características clínicas con las variantes alélicas de los genes. La significancia se probó mediante una prueba de U de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis al comparar la edad al diagnóstico de los pacientes con las variables numéricas mediante el programa SPSS® versión 20.0, en cualquier caso, se consideró significativa una $P \leq 0.05$.

Para el análisis de GWAS, particularmente en la determinación de las SNV se realizó una prueba primaria de un solo marcador de asociación alélica. La interacción gen-gen se analizó para las SNV asociadas en combinaciones de dos marcadores con todas las otras SNV individuales por un modelo de regresión logística mediante *PLINK 1.90* (Purcells *et al.*, 2007). La significancia nominal se obtuvo como un valor de $P < 0.05$, la cual se corrigió por ancestría y por control genómico mediante *ENGESOFT 7.2.1* (Price *et al.*, 2006) Y *ADMIXTURE 1.3.0* (Alexander *et al.*, 2011). Para estimar el nivel apropiado de corrección para el número de las SNV analizadas se tomó en cuenta el desequilibrio de ligamiento entre las SNV, el nivel requerido de la corrección de Bonferroni fue determinado usando el programa *PLINK 1.90* y el paquete estadístico R®. Mientras que, para la selección de las CNV, estas se determinaron en función a las diferencias entre las frecuencias encontradas para cada una de las regiones consenso con ayuda de la de X^2 mediante el programa OpenEpi versión 3.01.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

La edad al diagnóstico en los pacientes con CO aislada (n=91) fue de 3.5 ± 0.3 años, mientras que para los pacientes con TGCT (n=79) fue de 26.5 ± 0.9 años [De los cuales, la edad al diagnóstico de los pacientes con TGCT y CO (n=13) fue de 24.3 ± 2.5 años, mientras que la edad al diagnóstico en los pacientes que cursaron únicamente con TGCT (n=66) fue de 26.9 ± 1.0 años].

La frecuencia de CO bilateral fue de 48.3% (44/91); además aun cuando todos los pacientes con CO fueron sometidos a orquidopexia, el 73.6% (68/91) de ellos recibieron el tratamiento quirúrgico después de la edad recomendada (18 meses) con un intervalo de 2-16 años, y únicamente el 16.5% (15/91) requirió orquiectomía debido a la presencia de atrofia testicular (Tabla 2). Adicionalmente, el 13.2% (12/91) de los pacientes con CO aislada, presentó familiares afectados por CO y únicamente el 2.2% (2/91) mostró familiares afectados por TGCT, como se muestra en la Tabla 2.

En el grupo de pacientes con TGCT, el 16.5% (13/79) presentó CO aislada en la infancia y la orquidopexia únicamente se realizó en el 38.5% (5/13) de estos casos, con una edad promedio de 8.8 ± 2.5 años, el resto de estos pacientes jamás fueron sometidos al descenso testicular quirúrgico. Todos los pacientes con TGCT (79) fueron sometidos a orquiectomía, y el tipo histológico más frecuente fue el TGCT no seminomatoso (nsTGCT) con el 61% (48/79). La historia familiar de CO o de TGCT en los 13 pacientes con CO aislada y TGCT no fue documentada, mientras que en los 66 pacientes con TGCT el 4.5% (3/66) presentó familiares afectados por TGCT, como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Rasgos clínicos presentes en los pacientes incluidos en el estudio

Rasgos Clínicos		Pacientes con CO aislada n = 91 (%)	Pacientes con TGCT n = 79	
			TGCT y CO n = 13 (%)	TGCT n = 66 (%)
Edad al diagnóstico		3.5±0.3	24.3±2.5	26.9±1.0
CO	Bilateral	44 (48.3)	7 (53.8)	NA
	Izquierda	25 (27.5)	3 (23.1)	
	Derecha	22 (24.2)	3 (23.1)	
Orquidopexia	Si	91 (100)	5 (38.5)	NA
	No	0 (0)	8 (61.5)	
Orquiectomía	Si	15 (16.5)	13 (100)	66 (100)
	No	76 (83.5)	0 (0)	0 (0)
Historia familiar de CO	Positiva	12 (13.2)	0 (0)	0 (0)
	Negativa	79 (86.8)	13 (100)	66 (100)
Historia familiar de TGCT	Positiva	2 (2.2)	0 (0)	3 (4.5)
	Negativa	89 (97.8)	13 (100)	63 (95.5)
TGCT	Bilateral	NA	1 (7.7)	0 (0)
	Izquierdo		4 (30.8)	36 (54.5)
	Derecho		8 (61.5)	30 (45.5)
Estadio clínico al diagnóstico	I	NA	4 (30.8)	33 (50)
	II		7 (53.8)	15 (21.7)
	III		1 (7.7)	12 (18.2)
	IV		1 (7.7)	6 (9.1)
Metástasis	Positivo	NA	7 (53.8)	24 (36.4)
	Negativo		6 (46.2)	42 (63.6)
Tipo histológico tumoral	nsTTCG	NA	10 (76.9)	38 (57.6)
	sTTCG		3 (23.1)	28 (42.4)

nsTGCT = Tumor Testicular de Células Germinales no seminomatoso; sTGCT = Tumor Testicular de Células Germinales seminomatoso; NA = No Aplica.

Actualmente, se estima que la CO se presenta aproximadamente en un 3% de los varones nacidos vivos, lo cual lo ubica como la malformación congénita más común a nivel mundial en el varón, a pesar de la alta tasa de descenso espontánea durante el primer año de vida. La CO está establecida como el factor de riesgo primario para el desarrollo de TGCT (Banks *et al.*, 2013), sin embargo, los mecanismos moleculares subyacentes entre ambas enfermedades aun se desconocen. Por tanto, el establecer esta relación molecular podría aportar información relevante sobre la etiología del TGCT, así como el sugerir una base para la atención individualizada del paciente con CO. Aún cuando la incidencia de la CO y del TGCT ha incrementado a nivel mundial, existen pocos datos epidemiológicos de la CO en población mexicana. El TGCT es considerado el tumor sólido más frecuente en varones de entre 15 y 44 años de edad (Trabert *et al.*, 2014), con una tasa ajustada por edad de 11.1 por cada 100,000 varones y representa el quinto tumor sólido más mortal con una tasa de 1.3 por cada 100,000 varones (Gco.iarc.fr, 2019).

Los resultados de este estudio mostraron una incidencia de CO bilateral más elevada a lo reportado para población hispana [19.7% (25/127) vs. 48.3% (44/91)] (Davis-Dao *et al.*, 2012). Por otro lado, un estudio estimó que cerca del 70% de los pacientes con CO fueron sometidos a la orquidopexia después de los 2 años (Williams *et al.*, 2018), similar a lo encontrado en nuestro estudio con el 73.6%, resaltando la importancia de hacer la orquidopexia de manera oportuna. Por otro lado, la historia familiar de CO en nuestros pacientes con CO es similar a lo reportado en población italiana [2.2% (2/91) vs. 2.1% (15/721)] (Foresta *et al.*, 2008).

En los pacientes con TGCT observamos una frecuencia más elevada de casos de nsTGCT, similar a lo descrito en población hispana (Woldu *et al.*, 2017), y una frecuencia de CO ligeramente más elevada a la reportada a nivel mundial con una frecuencia del 5 al 10% (Kratz *et al.*, 2010; Cobellis *et al.*, 2014) sin embargo, encontrando similitudes con lo descrito para población italiana [16.4% (13/79) vs

14.6% (18/123)] (Garolla *et al.*, 2005). Por otro lado, identificamos que el 3.8% (3/79) de los pacientes con TGCT tenía al menos un familiar afectado con la misma neoplasia, similar a lo estimado por otros autores (Mai *et al.*, 2010; Rapley y Nathason, 2010).

Para nosotros fue sumamente importante describir los rasgos clínicos de los 13 pacientes con TGCT que cursaron con CO aislada, ya que los resultados nos dan indicios importantes en la relación entre ambos padecimientos. Interesantemente, identificamos en estos 13 pacientes, por un lado que sólo el 38.5% (5/13) recibieron orquidopexia como tratamiento para la CO a una edad promedio de 8.8 años, mientras que al resto nunca se les corrigió la CO. Notablemente, al contrastar a los pacientes que no recibieron el tratamiento quirúrgico con respecto a los pacientes a los que se les realizó orquidopexia se determinó una mayor frecuencia del fenotipo bilateral de CO [62.5% (5/8) vs 40% (2/5)], el tipo histológico nsTGCT [87.5% (7/8) vs 60% (3/5)], la presencia de metástasis [75% (6/8) vs 20% (1/5)] y la presencia de estadios más avanzados en el tumor (Tabla 3). Por otro lado, al comparar a los 13 pacientes con TGCT y CO aislada contra los 66 pacientes que presentaron únicamente TGCT, se observó una frecuencia diferencial en la presentación de metástasis [53.8% (7/13) vs 36.4% (24/66)] y del tipo histológico nsTGCT [76.9% (10/13) vs 57.6% (38/66)] respectivamente, como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Rasgos clínicos presentes en los 13 pacientes con TGCT y CO aislada

Paciente	Edad al diagnóstico de TGCT (años)	Tipo de CO	Edad de la orquidopexia (años)	TGCT	Tipo histológico	Metástasis	Estadio clínico	SNV
Pacientes con oquidopexia								
1	16	Bilateral	8	Derecha	nsTGCT	No	I	
2	18	Derecha	8	Derecha	sTGCT	No	I	D816H
3	19	Izquierda	12	Izquierda	nsTGCT	Retroperitoneo	II	D816H
4	24	Derecha	10	Derecha	nsTGCT	No	I	
5	27	Bilateral	6	Derecha	sTGCT	No	I	
Pacientes sin oquidopexia								
6	16	Bilateral	NA	Derecha	nsTGCT	Retroperitoneo	II	
7	17	Bilateral	NA	Izquierda	nsTGCT	Pelvis	II	
8	22	Izquierda	NA	Izquierda	sTGCT	Retroperitoneo	II	
9	22	Bilateral	NA	Bilateral	nsTGCT	No	II	
10	23	Derecha	NA	Derecha	nsTGCT	Pulmón	IV	
11	27	Izquierda	NA	Izquierda	nsTGCT	Retroperitoneo	II	
12	36	Bilateral	NA	Derecha	nsTGCT	Pulmón	III	
13	49	Bilateral	NA	Derecha	nsTGCT	No	II	D816V

NA= No Aplica

Resulta necesario resaltar la importancia de realizar la orquidopexia de manera oportuna, ya que esto minimiza los riesgos y complicaciones de los pacientes pediátricos con CO (Tabla 3), lo que evita someter al testículo criptorquídeo a diversas condiciones anormales de estrés (Williams *et al.*, 2018).

8.2 BÚSQUEDA DIRIGIDA DE 6 SNV ASOCIADAS AL DESARROLLO DE TGCT EN NUESTRA POBLACIÓN

Se analizó la presencia de las SNV rs121913507 (D816V), rs121913506 (D816H), y rs121913514 (N822K) en el gen *KIT* y rs201934623 (P392S), rs774171864 (A299T) y rs12014709 (g.67718624T>G) en el gen *AR*, las cuales han sido descritas como variantes de riesgo para el desarrollo de TGCT en población holandesa e italiana (Looijenga *et al.*, 2003; Garolla *et al.*, 2005). Los resultados de la asociación fenotipo-genotipo entre los diferentes grupos de nuestro estudio (CO aislada, TGCT, TGCT con CO aislada y Controles) como se muestra en la Tabla 4. Los resultados mostraron que la variante rs121913507 (D816V) del gen *KIT* se encontró en 1/13 (7.7%) de los pacientes con TGCT y CO aislada en forma heterocigota (A/T), mientras que el resto de los pacientes 12/13 (92.3%) presentaron la forma homocigota (AA). La comparación entre el resto de los pacientes y los controles no mostraron diferencias significativas [TGCT+CO vs TGCT ($P=0.162$), TGCT+CO vs CO ($P=0.125$) y TGCT+CO vs Controles ($P=0.076$)] respectivamente. Para la variante rs121913506 (D816H) del gen *KIT* se encontró en forma heterocigota (GC) en 11/13 (84.6%) de los pacientes con TGCT and CO, mientras que en 2/13 (15.4%) presentaron un genotipo homocigoto (CC). En contraste con la variante rs121913507 (D816V), las comparaciones hechas entre todos los grupos para la variante rs121913506 (D816H) mostraron diferencias significativas [TGCT+CO vs TGCT ($P=0.025$), TGCT+CO vs CO ($P=0.015$) y TGCT+CO vs Controles ($P=0.005$)] respectivamente. Mientras que el análisis de la variante rs121913514 (N822K) del gen *KIT* no mostró diferencias significativas entre los grupos analizados (Tabla 4).

Los resultados obtenidos del análisis para las SNV rs12014709 (g.67718624T>G) intrónica, rs201934623 (P392S) y rs774171864 (A299T) del gen *AR* no mostraron diferencias significativas en la frecuencia alélica entre los grupos de estudio incluidos en este trabajo (Tabla 4).

Tabla 4. Frecuencia alélica de las variantes alélicas analizadas en los genes *KIT* y *AR* en población mexicana

SNV	Pacientes con TGCT y CO n (%)	Pacientes con TGCT n (%)	Valor de <i>P</i> entre TGCT+CO y TGCT	Pacientes con CO n (%)	Valor de <i>P</i> entre TGCT+CO y CO	Controles n (%)	Valor de <i>P</i> entre TGCT+CO y Control
GEN <i>KIT</i>							
D816V (A/T) rs121913507 c.54733155	AA=12 (92.3) AT=1 (7.7) TT=0 (0)	AA=66 (100) AT=0 (0) TT=0 (0)	0.162	AA=91 (100) AT=0 (0) TT=0 (0)	0.125	AA=158 (100) AT=0 (0) TT=0 (0)	0.076
D816H (G/C) rs121913506 c.54733154	GG=0 (0) GC=11 (84.6) CC=2 (15.4)	GG=0 (0) GC=66 (100) CC=0 (0)	0.025	GG=0 (0) GC=91 (100) CC=0 (0)	0.015	GG=0 (0) GC=158 (100) CC=0 (0)	0.005
N822K (A/T) rs121913514 c.54733174	AA=0 (0) AT=13 (100) TT=0 (0)	AA=0 (0) AT=66 (100) TT=0 (0)	NA	AA=0 (0) AT=89 (97.8) TT=2 (2.2)	0.765	AA=0 (0) AT=154 (97.5) TT=4 (2.5)	0.693
GEN <i>AR</i>							
Intrónico (T/G) rs12014709 c.66718624	TT=0 (0) TG=13 (100) GG=0 (0)	TT=2 (3.0) TG=63 (95.5) GG=1 (1.5)	0.736	TT=4 (2.5) TG=80 (87.9) GG=7 (7.7)	0.415	TT=4 (2.5) TG=143 (90.5) GG=11 (7.0)	0.508
P392S (C/T) rs201934623 c.67546320	CC=13 (100) CT=0 (0) TT=0 (0)	CC=66 (100) CT=0 (0) TT=0 (0)	NA	CC=91 (100) CT=0 (0) TT=0 (0)	NA	CC=158 (100) CT=0 (0) TT=0 (0)	NA
A299T (C/T) rs774171864 c.67546042	CC=0 (0) CT=13 (100) TT=0 (0)	CC=0 (0) CT=66 (100) TT=0 (0)	NA	CC=0 (0) CT=91 (100) TT=0 (0)	NA	CC=0 (0) CT=158 (100) TT=0 (0)	NA

NA = No Aplica.

Considerando que el grupo de pacientes con TGCT y CO aislada presentaron diferencias significativas entre los genotipos del gen *KIT*, se buscó la asociación a las características clínicas de los 13 pacientes con TGCT y antecedentes de CO aislada, como se muestra en la Tabla 3. La variante rs121913506 (D816H) se presentó en los pacientes 2 y 3 en forma heterocigota, ambos se trataron de pacientes jóvenes con CO unilateral en diferente localización, sin embargo, no hubo una consistencia entre el tipo histológico tumoral o desarrollo de metástasis. Por otro lado, el paciente 13 presentó la variante rs121913507 (D816V) en forma heterocigota, este paciente mostró además historia familiar de CO bilateral, una clasificación histológica nsTGCT unilateral y no desarrolló metástasis como se muestra en la Tabla 3.

Al contrastar el grupo de TGCT con antecedentes de CO aislada con los otros grupos, encontramos diferencias significativas para el alelo C de la variante rs121913506 (D816H) en el gen *KIT*. Particularmente la frecuencia alélica de esta SNV fue similar a lo encontrado en población japonesa (Sakuma *et al.*, 2003) [2.5% (2/79) vs 2.9% (1/34)]. Interesantemente, en reportes previos en población holandesa, esta variante se consideró como una mutación característica del TGCT (Looijenga *et al.*, 2003), mientras que en nuestro estudio la identificamos de manera heterocigota en la mayoría de los individuos estudiados, incluso en el grupo control. No se identificaron diferencias significativas para el resto de las variantes genéticas. Esta es la primera ocasión en que se describen estos 6 SNV en población mexicana, sin embargo, su asociación con el TGCT no se replicó en nuestra población, quizá por las diferencias genéticas existentes entre diferentes poblaciones (Salazar-Flores *et al.*, 2015) y por la ausencia de corrección por estratificación poblacional en esta primera etapa, la cual es crucial en poblaciones mestizas como la nuestra.

Los resultados obtenidos mediante la genotipificación de 6 SNV asociadas al TGCT en otras poblaciones en esta primera etapa del trabajo, evidenciaron la necesidad de realizar una búsqueda de marcadores genéticos mediante herramientas de análisis masivo, las cuales han demostrado identificar

marcadores de riesgo de manera más eficaz dentro de poblaciones complejas o mixtas para padecimientos multifactoriales (Gu *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2018).

8.3 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DEL GENOMA COMPLETO ENTRE PACIENTES CON CO AISLADA Y PACIENTES CON TGCT

8.3.1 ANÁLISIS DE ANCESTRÍA GLOBAL

De acuerdo con los datos obtenidos del ensayo de microarreglos, se realizó una corrección por estratificación poblacional mediante un análisis de ancestría global 3K, identificando una población mezclada, en donde se observó cómo los pacientes con TGCT, los pacientes con CO aislada y los individuos control incluidos en este estudio se distribuyeron principalmente a lo largo de las poblaciones de referencia nativa y europea como se muestra en la Figura 8.

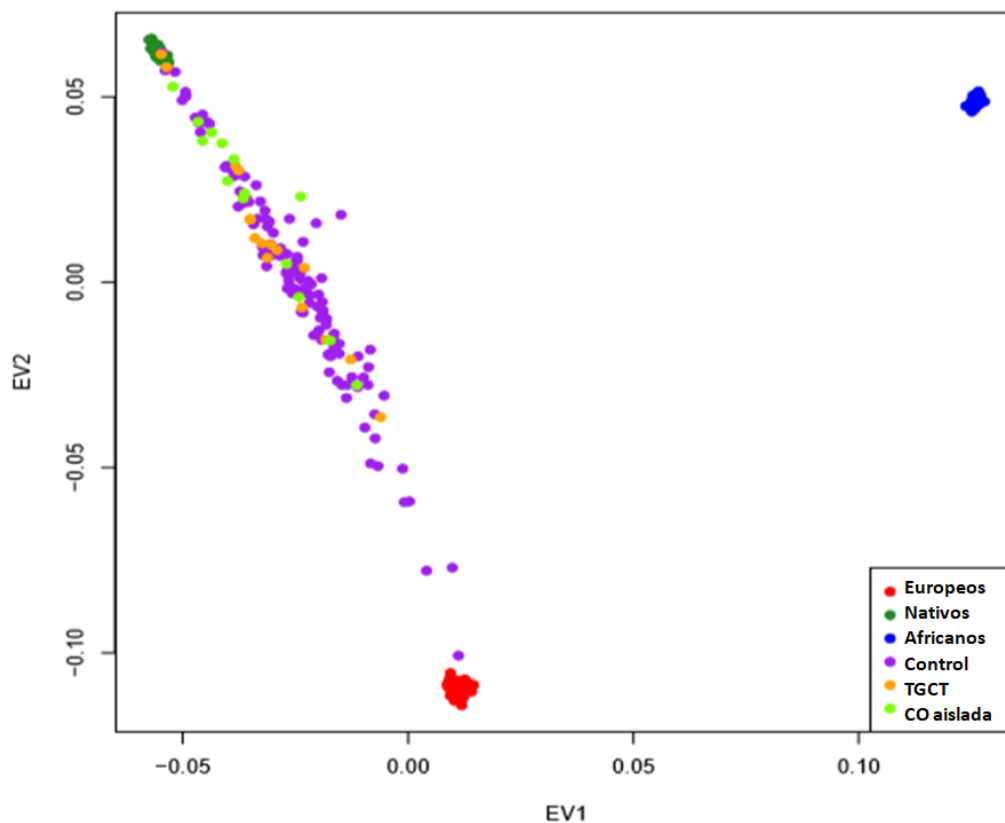


Figura 8. Análisis de ancestría global mediante componentes principales 3K en donde se muestra 3 poblaciones de referencia con 50 individuos cada una. La población africana y europea se obtuvo de los datos publicados del Proyecto de los 1000 Genomas, mientras que la población nativa proviene de la cohorte MAIS (Contreras-Cubas *et al.*, 2016). En verde oscuro se muestra un grupo de individuos nativos de mexicanos, en color rojo un grupo de individuos europeos y en azul un grupo de individuos de ascendencia africana. Entre la población nativa y la europea se muestran en color morado, naranja y verde claro tanto a los individuos control como a los pacientes con CO aislada y TGCT incluidos en nuestro estudio evidenciando una población mezclada.

Posteriormente identificamos las proporciones de ancestría global para nuestra población de estudio mediante *ADMIXTURE 1.3.0* (Alexander *et al.*, 2011), en donde se mostró un 66% de ancestría Nativa, un 30.7% de ancestría Europea y 3.2% de ancestría Africana como se muestra en la Figura 9. Lo que corresponde con lo reportado previamente para la población mexicana, en donde se describió una mezcla étnica de población nativa con el 65%, europea con el 30% y africana con el 5% (Salazar-Flores *et al.*, 2015). La corrección por ancestría que se hizo en el análisis de *GWAS* previo a la selección del perfil de SNV, permitió identificar posibles artefactos propios de las muestras, además de dar validez a la selección certera de las SNV asociadas a TGCT y a la CO aislada en poblaciones genéticamente heterogéneas como la nuestra (mestizos-mexicanos).

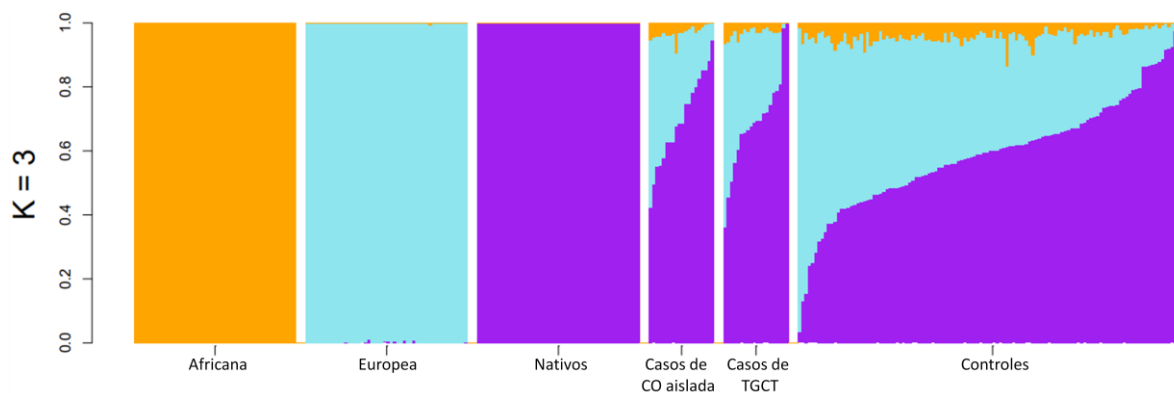


Figura 9. Análisis de ancestría global 3K mediante *ADMIXTURE*. En el eje de la Y se observa la proporción de ancestría que va de 0 a 1, mientras que en el eje de la X se muestran 3 poblaciones de referencia (en color naranja la población africana, en color azul la población europea y en color morado la población nativa) y las proporciones de ancestría con base en las poblaciones de referencia en el grupo de pacientes con CO aislada, de los pacientes con TGCT y de los individuos control.

8.3.2 PERFIL GENÉTICO DE SNV

Inicialmente, se obtuvieron dos perfiles de SNV, para los cuales, cada una de las SNV incluidas en estos perfiles presentaron valores significativos de $P < 0.05$ y su respectivo valor de *OR*. El primero de estos se obtuvo a partir de la comparación entre pacientes con CO aislada vs individuos control (Anexo Tabla 1), sumando un total de 32 SNV, dentro de las cuales se destacaron SNV ubicadas en secuencias genéticas de RNA no codificantes (ncRNA) como LOC340094/LINC01020 (rs4702153), LOC101929563 (rs10965946), SNV en genes que resultan interesantes debido a su relación con la biología del testículo como *VCAM1* (rs3181088), *LDB2* (rs13110156), *NEK6* (rs3780201) y *FLT1* (rs12584067) así como SNV que por su cercanía posiblemente podrían formar haplotipos en el cromosoma X (rs7889467, rs5954598, rs7056592, rs4825113, rs4824897, rs16993874 y rs12393405). El segundo perfil se obtuvo de la comparación entre pacientes con TGCT vs individuos controles (Anexo Tabla 2) con un total de 107 SNV dentro de las que destacan SNV ubicadas en ncRNA como LINC00472 (rs7349905), LOC340515/LINC01501 (rs11999338), LOC339166 (rs2309452) y LINC00670 (rs1519252), SNV en genes que resultan interesantes debido a su participación en procesos oncológicos como *KIAA1045* (rs1061677), *ABI1* (rs1998633 y rs10829066), *ZNF45* (rs425221), así como SNV que por su cercanía posiblemente podrían formar haplotipos en los genes *PTGFRN* (rs10923182, rs10923183, rs12090536 y rs7552382), *ATG16L1* (rs6752107, rs6431654 y rs13009506), *PHEX/PTCHD1-AS* (rs5904512, rs5904513, rs5951727, rs2301325, rs2285075, rs12841218 y rs12216932) y en regiones del cromosoma 3 (rs1656986, rs1726525, rs2717382, rs2118000 y rs1009621), del cromosoma 7 (rs2098191, rs2098192, rs2109769 y rs2215579) y del cromosoma 12 (rs7952875, rs6581231, rs6581232, rs1500034, rs1500033, rs6581235 y rs2036299). Posteriormente, se compararon los resultados obtenidos con lo anotado en diferentes bases de datos y se estableció la función de la variante, su asociación clínica y la comparación de las frecuencias identificadas en nuestro estudio con lo reportado en otras poblaciones a nivel mundial (Anexo Tablas 1 y 2).

Los resultados de los perfiles genéticos individuales de CO aislada y de TGCT permitieron identificar las SNV y sus respectivas vías ontológicas implicadas en estos padecimientos, destacando en el perfil de CO aislada la presencia de 7 SNV que se presentaron de manera muy cercana entre ellas mismas en el cromosoma X, el cual ha sido ampliamente estudiado en el no descenso testicular (Garolla *et al.*, 2005), mientras que para el perfil de pacientes con TGCT se destacan 2 SNV ubicadas en regiones codificantes de los genes *LINC00472* y *ZNF45*, cabe señalar que en la actualidad ha ido en aumento el estudio de algunos RNA no codificantes y factores transcripcionales en el desarrollo de cáncer (Debruyne *et al.*, 2019). Interesantemente, ambos perfiles muestran vías ontológicas relacionadas a la regulación de la apoptosis y de la adhesión celular, como se muestra en la Figura 10.

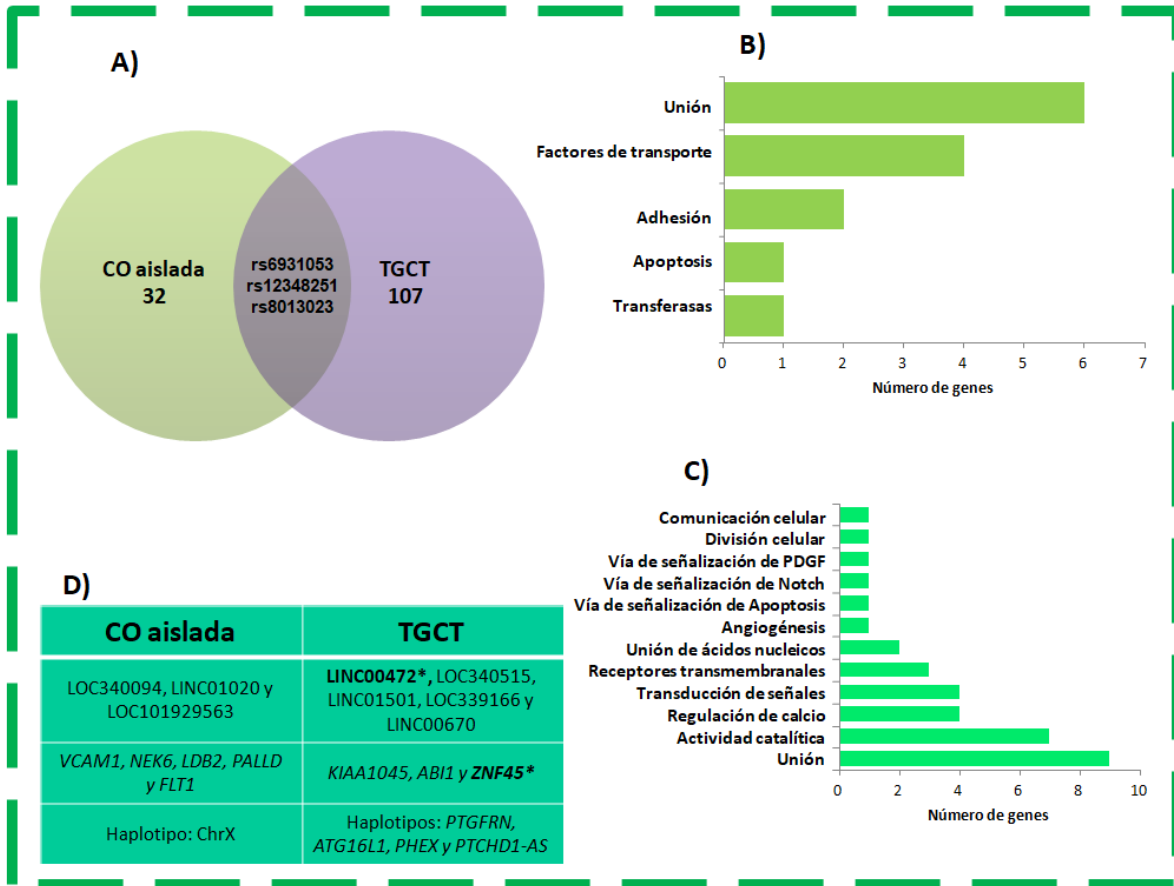


Figura 10. Priorización y selección de los genes candidatos provenientes del perfil de SNV mediante la identificación *in silico* de diferentes rutas ontológicas y funciones genéticas asociadas al testículo. **A)** Identificación de un perfil de 3 SNV en común entre ambos padecimientos, el cual se obtuvo a partir de la comparación de dos perfiles de SNV individuales. El primero contempló a 32 SNV identificadas en pacientes con CO aislada, mientras que el segundo presentó 107 SNV en pacientes con TGCT. **B)** Principales vías ontológicas de los genes identificados en los pacientes con CO aislada, relacionadas a testículo en las que destacan la unión y la adhesión celular y la regulación de la apoptosis. **C)** Principales vías ontológicas de los genes identificados en los pacientes con TGCT, relacionadas a testículo en las que destacan vías de señalización del cáncer como PDGF, Notch y de la regulación de la apoptosis. **D)** Genes o regiones génicas de interés biológico para el testículo en donde se encuentran las SNV identificadas de los perfiles individuales de pacientes con CO aislada o con TGCT.

A partir de estos resultados nos enfocamos en el estudio de las SNV en común entre ambos perfiles que presentaron una mayor frecuencia en los casos de TGCT y CO aislada respecto a los individuos control (Tabla 5).

Tabla 5. SNV en común entre CO aislada y TGCT

SNV	Posición	Gene	MAF	Anotación funcional	Asociación	MAF TGCT/CO/Control
rs6931053	Chr6:134734547		A/G	Regulador de CTCF y la familia HOX	Benigno	0.32/0.23/0.02
rs12348251	Chr9:137490048		G/T	Regulador de CTCF y la familia FOX	Benigno	0.35/0.22/0.02
rs8013023	Chr14:75906382	JDP2	T/C	Intrónico	Benigno	0.40/0.33/0.03

Actualmente, no existen reportes que vinculen la presencia de las variantes rs6931053, rs12348251 y rs8013023 (*JDP2*) y su asociación con pacientes con ambos padecimientos (TGCT y CO aislada), ni de manera individual para cada una de las patologías estudiadas.

La variante intergénica rs6931053 se encuentra en el *locus* Chr6:134734547, esta variante consiste en una transición de A por G. Actualmente, esta SNV no se encuentra descrita en ninguna patología. Esta es una variante intergénica; que interesantemente, se identificó mediante estudios *in silico* en una región consenso para la unión de CTCF y para la familia génica HOX. Ambos de gran importancia a nivel testicular, el primero está implicado en el proceso carcinogénico (Debruyne *et al.*, 2019; Kawakami *et al.*, 2006; Aitken *et al.*, 2018) y la segunda familia en el desarrollo embrionario y en la carcinogénesis de varias estirpes tumorales (Cheng *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2018). Particularmente el gen *HOXA10* se ha asociado de manera importante al desarrollo de la CO al participar en la fase transabdominal del descenso testicular, así como también se ha descrito en el TGCT, ya que se encontró que alteraciones en los niveles de expresión de este gen pueden promover el desarrollo de tumores testiculares al generar una proliferación desmedida en de células testiculares (Chávez *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018).

Por otro lado, la variante intergénica rs12348251 localizada en el *locus* Chr9:137490048, consiste en una transversión de G por T. De igual manera a la variante anterior, esta SNV no se encuentra descrita en alguna patología y se encontró mediante estudios *in silico* que esta variante se encuentra en una región consenso para la unión de CTCF y para la familia génica FOX. Ambos genes de gran importancia a nivel testicular, particularmente en el desarrollo tumoral y

reproductivo (Moritoki *et al.*, 2014; Debruyne *et al.*, 2019; Kawakami *et al.*, 2006; Aitken *et al.*, 2018; Goertz *et al.*, 2011). Particularmente, se demostró que la alteración en los niveles de expresión del gen *FOXO1* se encuentran asociados con la falta de mantenimiento en las espermatogonias, lo que genera un fenotipo de riesgo potencial en pacientes con CO para originar tumores testiculares (Moritoki *et al.*, 2014).

Por último, se identificó la variante intrónica rs8013023 del gen *JDP2*, la cual se localiza en Chr14:75906382, esta variante consiste en una transición de T por C. Esta SNV tampoco se encuentra descrita en alguna patología y aparentemente no tiene un efecto en la regulación génica, sin embargo, no se descarta que esta pudiera generar isoformas del RNA y de proteínas. El gen *JDP2* codifica para una proteína del mismo nombre, la cual es un factor de transcripción básico de cremallera de leucina, presente en gónadas y glándulas suprarrenales, involucrado en múltiples procesos biológicos y celulares como el desarrollo y la regulación del cáncer mediando la proliferación y diferenciación celular, interviniendo en el proceso del ciclo celular, músculo esquelético, diferenciación de osteoclastos, señalización de progesterona e inmunidad antibacteriana (Wang *et al.*, 2017). Adicionalmente, se describió la participación del gen *JDP2* en el mantenimiento de la pluripotencialidad en líneas celulares de tumor testicular F9 y P19, inhibiendo la diferenciación de las células mediada por el ácido retinoico, mediante el reclutamiento del complejo 3 de la histona deacetilasa (HDAC3), sugiriendo que el gen *JDP2* puede ser un factor clave que controla el compromiso de células progenitoras con la diferenciación (Jin *et al.*, 2002; Pan *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2012). Participando de manera importante en vías de regulación génica de *TP53*, *NANOG* y *SALL4* (Wang *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2014).

Es importante mencionar, que el identificar una SNV en regiones no codificantes resulta importante, debido al impacto que estas pueden tener principalmente en la regulación génica, se ha descrito que este tipo de variantes pueden generar productos alternativos de empalme, además de regular múltiples blancos génicos en *cis* o *trans* mediante diversos mecanismos (Litchfield *et al.*, 2017).

8.3.3 PERFIL GENÉTICO DE CNV Y ROH

Se obtuvieron dos perfiles que comprendieron CNV (ganancias y pérdidas en el número de copias) y ROH, cada una de éstas con sus regiones consenso, frecuencias y valores de *P* significativos correspondiente. El primero de estos perfiles surgió al comparar pacientes con CO aislada e individuos control (Anexo Tabla 3), identificando un total de 104, mientras que el segundo perfil se originó a partir de la comparación entre pacientes con TGCT e individuos control (Anexo Tabla 4), identificando un total de 87 CNV. Posteriormente, de manera individual para ambos perfiles se verificaron los resultados obtenidos en diferentes bases de datos, constatando si estas regiones estaban asociadas con alguna condición clínica o padecimiento, además se verificaron los genes anotados en esas regiones y finalmente se buscó si alguno de esos genes contenidos en estas regiones, habían sido descritos previamente con un efecto de dosis génica. (Anexos Tablas 3 y 4).

Los resultados de los perfiles genéticos individuales de CO aislada y de TGCT permitieron identificar las CNV y ROH con sus respectivas vías ontológicas implicadas en estos padecimientos, destacando en el perfil de CO aislada la presencia de genes relacionados con la carcinogénesis testicular o en otros tumores (Peer *et al.*, 2018) como son *RXRA*, *JAK2*, *KIT*, *MET* entre otros, mientras que para el perfil de pacientes con TGCT se destacaron genes relacionados a la carcinogénesis y con el mantenimiento de la espermatogénesis (Litchfield *et al.*, 2015) como son *TP63*, *KANS-AS1*, *STAT3*, *SPATA31* entre otros, como se muestra en la Figura 11.

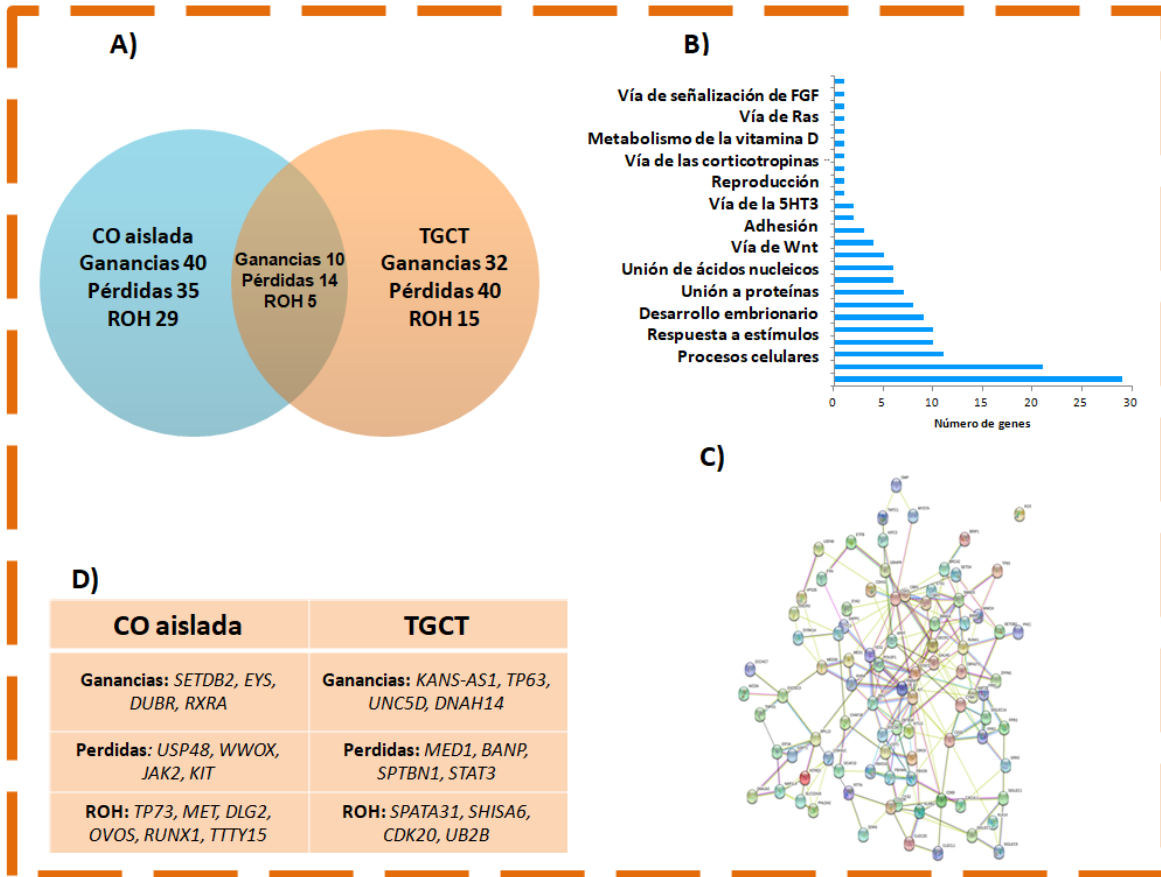


Figura 11. Priorización y selección de los genes candidatos provenientes del perfil de CNV mediante la identificación *in silico* de diferentes rutas ontológicas y funciones genéticas asociadas al testículo. **A)** Identificación de un perfil de 29 CNV en común entre ambos padecimientos, el cual se obtuvo a partir de la comparación de dos perfiles de CNV individuales. El primero contempló a 104 CNV identificadas en pacientes con CO aislada, mientras que el segundo presentó 87 CNV en pacientes con TGCT. **B)** Principales vías ontológicas en común identificadas entre los pacientes con CO aislada y pacientes con TGCT relacionadas a testículo en las que destacan vías de señalización características del cáncer como FGF, Ras y Wnt. **C)** Ensayo *in silico* de interacción proteína-proteína de genes en común entre pacientes con CO aislada y pacientes con TGCT. **D)** Genes incluidos dentro de algunas regiones de interés biológico en la regulación del testículo, obtenidos a partir de los perfiles individuales de CNV de pacientes con CO aislada o con TGCT.

Se obtuvieron 24 CNV y 5 ROH comunes entre ambos perfiles que presentaron una mayor frecuencia en los casos de TGCT y CO aislada respecto a los individuos control, como se muestra en el Anexo Tabla 5, y posteriormente de estas regiones se seleccionaron 6 CNV y 1 ROH prioritarios para su discusión, debido a que estas regiones mostraron asociación clínica con el desarrollo tumoral o problemas reproductivo o en todo caso por que los genes incluidas en estas regiones son sensibles a dosis, como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Perfil de 6 CNV y 1 ROH en común entre CO aislada y TGCT

CNV	Locus	Genes	Clasificación	Regiones	TGCT	CO	CTRL
Ganancia	11q23.2		Patogénico	112,565,533-112,686,856	12/22 (54.5%)	7/19 (36.8%)	11/125 (8.8%)
Ganancia	Yp11.2		Patogénico	9,897,528-10,076,230	12/22 (54.5%)	7/19 (36.8%)	16/125 (12.8%)
Pérdida	13 q13.1	<i>BRCA2</i>	Patogénico	32,894,943-32,895,466	4/22 (18.18%)	3/19 (15.78%)	4/125 (3.2%)
Pérdida	17 q21.2	<i>RARA</i>	Patogénico	38,477,258-38,486,009	4/22 (18.18%)	1/19 (5.26%)	0/125 (%)
Pérdida	17 q21.2	<i>TOP2A</i>	Patogénico	38,543,383-38,570,452	4/22 (18.18%)	3/19 (15.7%)	3/125 (2.4%)
Pérdida	18 q21.2	<i>SMAD4</i>	Patogénico	48,579,560-48,582,047	5/22 (22.72%)	2/19 (10.52%)	0/125 (%)
ROH	16 q11.2	<i>ORC6</i> <i>PHKB</i>	Incierto	46,534,976-48,202,503	8/22 (36.36%)	9/19 (47.36%)	11/125 (8.8%)

De las 6 CNV seleccionadas, 2 regiones corresponden a ganancias en el número de copias en los *loci* 11q23.2 y Yp11.2, 4 regiones de pérdidas en el número de copias en los *loci* 13q13.1, 17q21.2 y 18q21.2, mientras que la ROH se identificó en el *locus* 16q11.2 como se muestra en la Tabla 6.

Puntualmente, dentro de las ganancias en el número de copias seleccionadas en este estudio, tenemos a la región Chr11: 112,565,533-112,686,856 y a la región ChrY: 9,897,528-10,076,230, las ganancias de ambas regiones, están clasificadas como patogénicas, el primero se ha asociado retraso en el desarrollo global en varones, es decir; que presentan retraso en 2 o más áreas del desarrollo, dentro de las que se encuentran el desarrollo motor fino y grueso, del lenguaje y habla, de las funciones cognitivas o desarrollo personal social en actividades diarias. Mientras que el segundo se ha asociado al autismo, aunque, al no contener genes dentro de estas regiones no hay un efecto de dosis génica, sin embargo; no se descarta el posible efecto en la regulación de la expresión génica debido a la ganancia de esta región cromosómica. Es importante mencionar, además, que este es el primer reporte que identifica la ganancia en ambos *loci* en pacientes con CO aislada y en pacientes con TGCT.

Concretamente, para las pérdidas en el número de copias identificadas en este trabajo, las 2 primeras de estas se localizan en las regiones Chr17: 38,477,258-38,486,009 y Chr17: 38,543,383-38,570,452 la primera región contiene al intrón 1 del gen *RARA*, mientras que la segunda región contiene el intrón 8 del gen *RARA* y gran parte del gen *TOP2A* (del exón 5 hasta el exón 35). Ambas regiones han sido reportadas como patogénicas en otras condiciones clínicas, sin embargo, es importante mencionar que la pérdida en el número de copias en estas regiones no había sido descrita en pacientes con CO aislada o pacientes con TGCT previamente. Cabe resaltar que en ninguno de los casos existen datos que demuestren una relación dependiente de dosis con alguno de los genes previamente descritos.

El gen *RARA* codifica para la isoforma del receptor nuclear de ácido retinoico alfa, el cual se expresa a nivel somático y en células germinales testiculares (Gely-Pernot *et al.*, 2012). Particularmente para la isoforma α , se ha visto que animales macho a los que se les ha inactivado este gen presentan infertilidad, degeneración y presencia de apoptosis en células germinales tempranas en meiosis, anormalidades en la espermatogénesis y pérdida de la organización de las células germinales en los tubos seminíferos. Este gen se expresa en células de Sertoli y en células germinales, particularmente en gonocitos, células troncales, progenitoras de espermatogonia y en espermatoцитos (Peer *et al.*, 2018). Además, se ha descrito que el funcionamiento correcto de los receptores de ácido retinoico promueve la expresión de los receptores KIT que pertenecen a una de las vías principales en el desarrollo del TGCT, lo cual desencadena un paso crítico en la diferenciación de la espermatogonia (Gely-Pernot *et al.*, 2015), por lo que este gen claramente tiene una amplia participación en el testículo. Para el caso del gen *TOP2A*, este codifica para la topoisomerasa II, el cual se requiere para la replicación del material genético en el proceso de proliferación celular, siendo una diana terapéutica de diversos tratamientos quimioterapéuticos como la doxorubicina, etopósido entre otros en diversos tumores (Liu *et al.*, 2019). Se sabe que este gen se expresa en las células germinales, detectándolo en la fase paquiteno de los espermatoцитos. Además, la expresión de *TOP2A* aumenta

cuando se elevan las concentraciones de testosterona en testículos prepuberales e de manera interesante estos niveles se restablecen cuando se administran anti andrógenos como la flutamida (Barkish *et al.*, 2001). Además, la variación en los niveles de expresión de TOP2A ha sido propuestos como potenciales marcadores en algunos tumores urológicos (Zeng *et al.*, 2019) y particularmente se ha encontrado esto en tumor testicular de células germinales (Dimov *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2019).

Para la pérdida en el número de copias identificada en la región Chr18:48,579,560-48,582,047 en nuestro estudio, la cual contiene al gen *SMAD4*, ha sido reportada previamente como una alteración patogénica, existen reportes previos que asocian a esta región con pacientes con síndrome de poliposis juvenil (JPS), el cual es una enfermedad con un patrón de herencia autosómico dominante que incrementa notoriamente el riesgo de desarrollo de cáncer colorectal y de estómago. Además, se describió a esta alteración como una CNV sensible a dosis génica. Es decir, cuando ésta se presenta, el fenotipo clásico de este síndrome se observa en edades más tempranas en los pacientes (Aretz *et al.*, 2007; Van Hattem *et al.*, 2008; Calva-Cerqueira *et al.*, 2009). Este es el primer reporte que identifica la pérdida de esta región en pacientes con CO aislada y en pacientes con TGCT.

El gen *SMAD4* pertenece a una familia proteínica denominada SMAD (Hernández *et al.*, 2019), el cual es un regulador crítico de la homeostasis durante el desarrollo embrionario, la respuesta inmune, el proceso de fibrosis y cicatrización, además de ser un regulador de la estabilidad genómica y el desarrollo tumoral, entre muchos otros procesos (Archambeault y Yao, 2014; Hernández *et al.*, 2019). Este gen es un potente supresor tumoral y un mediador central de la vía de señalización TGF β (Pangas *et al.*, 2008; (Hernández *et al.*, 2019), la expresión de este gen se ha identificado a nivel testicular durante el periodo fetal, el cual junto con TGF β participan en el proceso anti proliferativo del gonocito (Devouassoux-Shisheboran *et al.*, 2003), además se sabe que se requiere la expresión de *SMAD4* para la expansión de los cordones seminíferos en los testículos mediante el linaje de las células de Sertoli. Se ha confirmado que en ratones knockout para

SMAD4 se generan alteraciones en células de Sertoli y Leydig simultáneamente, lo que genera subdesarrollo de los cordones testiculares y conlleva al desarrollo de disgenesia testicular leve en edad adulta, además de una baja producción espermática (Archambeault *et al.*, 2014). Asimismo, se ha descrito la presencia de ciertas alteraciones en este gen y su asociación con diferentes tumores, como el tumor testicular de células germinales, el cáncer pancreático y carcinoma de células escamosas (Bouras *et al.*, 2000; Archambeault y Yao, 2014; Liang *et al.*, 2019; Hernández *et al.*, 2019).

Por otro lado, en cuanto a la pérdida en el número de copias identificada en la región Chr13:32,894,943-32,895,466 en nuestro estudio, la cual contiene al gen *BRCA2*, existen reportes previos que asocian la pérdida en el número de copias en esta región en pacientes con cáncer familiar de mama y de ovario y esta variante se describió como una CNV sensible a dosis génica. Este es el primer reporte que identifica la pérdida de esta región en pacientes con CO aislada y en pacientes con TGCT.

El gen *BRCA2* es un componente de la maquinaria de la reparación del DNA encargada de mediar la recombinación homóloga en células somáticas y la recombinación en la meiosis de células germinales (Shive *et al.*, 2010). Existen diversos estudios que asociaron la presencia alteraciones en este gen con el riesgo para el desarrollo de cáncer de mama y de ovario (Wang *et al.*, 2010). Particularmente, se sabe muy poco sobre las alteraciones en este gen y su influencia directa en las células germinales en el varón, se ha demostrado que cuando se genera la alteración *Brca2Q658X* de forma homocigota en el pez cebra, ésta, genera machos infértiles, los cuales presentan arresto meiótico en espermatoцитos, además, se observó que el pez cebra adulto con esta misma alteración presentan predisposición a desarrollar tumores testiculares (Shive *et al.*, 2010). Contrariamente, otros autores han mostrado en diversos tipos histológicos de TGCT y en *GCNIS* la ausencia de mutaciones en los genes *BRCA1/2* o alteraciones en su reordenamiento, sin embargo, se han identificado alteraciones en la metilación del promotor de este gen, sobre todo en el tumor testicular no seminomatoso (Dorssers *et al.*, 2019).

Por último, identificamos de manera muy frecuente una ROH en los pacientes con CO aislada y en pacientes con TGCT respecto a los individuos control, siendo este el primer reporte que identifica esta región en ambos padecimientos. Esta región corresponde a Chr16: 46,534,976-48,202,503 y dentro de esta región se encuentran un gran número de genes, sin embargo, de manera interesante resaltan dos de ellos, los genes *ORC6* y *PHKB*. Se ha reportado que la haploinsuficiencia del primer gen está asociada con el síndrome de Meier-Grolin (Zimmerman *et al.*, 2015), mientras que la haploinsuficiencia en el segundo gen, se ha asociado con la enfermedad relacionada al almacenamiento de glucógeno, ambas enfermedades muestran un patrón de herencia autosómico recesivo (Kishnani *et al.*, 2019).

Particularmente, el gen *ORC6* codifica para uno de los seis componentes proteínicos del complejo de reconocimiento del origen de la replicación en el DNA de las células eucariontes, sin embargo, también se ha reportado que juega un rol importante en el silenciamiento transcripcional y la formación de la heterocromatina (Gavin *et al.*, 2008). Se ha propuesto que, en el proceso carcinogénico, la mayoría de las células tumorales presentan un alto estrés de replicación debido a la proliferación e inestabilidad genómica, por lo que se considera al complejo ORC como dianas de sensibilización de células tumorales (Zimmerman *et al.*, 2015). Aún cuando en la actualidad no existen reportes de este gen en CO aislada o TGCT, existen antecedentes de este que lo relacionan a otros tumores. Se ha demostrado que los niveles de expresión de este gen se encuentran elevados en pacientes con cáncer colorectal, además se ha asociado la modificación de los niveles de expresión cuando se administra 5-fluorouracilo, describiéndolo como un gen indicador de quimio sensibilidad (Gavin *et al.*, 2008).

Mientras que el gen *PHKB* codifica para la subunidad- β reguladora de la cinasa fosforiladora de glucógeno (Yang *et al.*, 2019), este gen se expresa en el humano en todos los tejidos, sin embargo, se sabe que la mayoría de las alteraciones en este gen tiene repercusiones más evidentes en musculo e hígado (Wullrich *et al.*, 1996). Concretamente su función principal es participar en el metabolismo del glucógeno en las células eucariotas (Kishnani *et al.*, 2019). Hasta el momento no

existe evidencia de alteraciones en el gen o en la expresión de este en problemas reproductivos ni en el tumor testicular, sin embargo, el gen *PHKB* ha sido asociado no sólo en la enfermedad de almacenamiento de glucógeno, también se ha propuesto a este gen como un marcador pronóstico del cáncer colorrectal y de hígado (Yang *et al.*, 2019). Incluso se ha demostrado que la interacción de este gen con KIAA1199 promueve la degradación del glicógeno entre otras sustancias que permiten la sobrevivencia de las células cancerosas (Terashima *et al.*, 2014).

Actualmente, la asociación a nivel clínico entre la CO aislada y el TGCT está establecida, sin embargo, no hay estudios que permitan apoyar esta relación clínica a nivel molecular en población mexicana. En este trabajo se identificó un perfil genético asociado al tumor testicular de células germinales en pacientes con criptorquidia aislada. Este es el primer acercamiento para encontrar una asociación molecular entre ambos padecimientos en población mexicana. Los resultados deben ser validados para corroborar la frecuencia de las variantes en una cohorte poblacional de pacientes mexicanos más grande, así como el demostrar a nivel funcional cual es el efecto biológico que tienen estas variantes. Ahora se sabe que el estudio de enfermedades multifactoriales y complejas se ha beneficiado del uso de las herramientas genómicas, lo que le permite dar más validez a las variantes genéticas para determinar un riesgo, basados en la robustez de múltiples estadios. En este sentido, el efecto acumulativo de variantes alélicas puede no explicar una parte sustancial de la heredabilidad, pero puede determinar un riesgo clínicamente significativo en individuos con un genoma enriquecido con alelos de riesgo, sumado al riesgo clínico establecido para padecimientos multifactoriales (Torkamani *et al.*, 2018) como la CO y el TGCT. Esto permite dar un mejor asesoramiento en enfermedades complejas. Por lo que no es raro pensar que enfermedades frecuentes se pueden explicar mejor mediante perfiles genéticos que incluyen un conjunto de variantes comunes en una misma población, como se propone en los puntajes de riesgo poligénicos (Chatterjee *et al.*, 2016).

9. CONCLUSIONES

- En este trabajo se identificó un perfil genético en común entre pacientes con TGCT y pacientes con CO aislada, el cual apoya la relación entre ambos padecimiento a nivel molecular.
- Se corroboró la importancia a nivel clínico de realizar la orquidopexia en pacientes CO de manera oportuna en edad pediátrica.
- Se identificó a las variantes rs121913507 (D816V) y rs121913506 (D816H) del gen *KIT* por primera vez en pacientes con TGCT y antecedentes de CO aislada.
- El perfil genético identificado en este estudio comprendió 3 SNV, 6 CNV y 1 ROH las cuales incluyeron genes involucrados en rutas biológicas asociadas a la regulación del desarrollo embrionario, proliferación celular y del mantenimiento y diferenciación de las células germinales, procesos biológicos ampliamente relacionados con la carcinogénesis.
- Resulta importante mencionar que los resultados identificados aun deben ser validados para corroborar la frecuencia de las variantes en una cohorte poblacional de pacientes mexicanos más grande, así como el demostrar a nivel funcional cual es el efecto biológico que tienen estas variantes para poder considerarlas como biomarcadores predictivos en un futuro.

10. REFERENCIAS

1. Aitken S, Ibarra-Soria X, Kentepozidou E, Flicek P, Feig C, Marioni J et al. (2018). CTCF maintains regulatory homeostasis of cancer pathways. *Genome Biology*, 19(1).
2. Alexander, D. H., & Lange, K. (2011). Enhancements to the ADMIXTURE algorithm for individual ancestry estimation. *BMC bioinformatics*, 12, 246.
3. Antonarakis S, Cooper D. (2006). Mutations in Human Genetic Disease. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-27.
4. Archambeault, D. and Yao, H. (2014). Loss of Smad4 in Sertoli and Leydig Cells Leads to Testicular Dysgenesis and Hemorrhagic Tumor Formation in Mice¹. *Biology of Reproduction*, 90(3).
5. Aretz S, Stienen D, Uhlhaas S, Stolte M, Entius M, Loff S et al. (2007). High proportion of large genomic deletions and a genotype phenotype update in 80 unrelated families with juvenile polyposis syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 44(11):702-709.
6. Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M., & Sherlock, G. (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature genetics*, 25(1), 25–29.
7. Bakshi R, Galande S, Bali P, Dighe R, Muniyappa K. (2001). Developmental and hormonal regulation of type II DNA topoisomerase in rat testis. *Journal of Molecular Endocrinology*, 26(3):193-206.
8. Banks K, Tuazon E, Berhane K, Koh C, De Filippo R, Chang A et al. (2013). Cryptorchidism and testicular germ cell tumors: comprehensive meta-analysis reveals that association between these conditions diminished over time and is modified by clinical characteristics. *Frontiers in Endocrinology*, 3.
9. Batool A, Karimi N, Wu X, Chen S, Liu Y. (2019). Testicular germ cell tumor: a comprehensive review. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(9):1713-1727.
10. Barthold J, Wang Y, Kolon T, Kollin C, Nordenskjöld A, Olivant Fisher A et al. (2015). Pathway analysis supports association of nonsyndromic cryptorchidism with genetic loci linked to cytoskeleton-dependent functions. *Human Reproduction*, 30(10):2439-2451.
11. Barthold J, Ivell R. (2018). Perspective: A Neuro-Hormonal Systems Approach to Understanding the Complexity of Cryptorchidism Susceptibility. *Frontiers in Endocrinology*, 9.
12. Bener A, El Ayoubi HR, Chouchane L, Ali AI, Al-Kubaisi A, Al-Sulaiti H & Teebi AS. (2009) Impact of consanguinity on cancer in a highly endogamous population. *Asian Pac J Cancer Prev* 10, 35–40.
13. Bouras, M., Tabone, E., Bertholon, J., Sommer, P., Bouvier, R., Droz, J. and Benahmed, M. (2000) A Novel SMAD4 Gene Mutation in Seminoma Germ Cell Tumors. *Cancer Research*, 60(4), pp.922-928.

14. Bray, F., Ferlay, J., Devesa, S., McGlynn, K. and Møller, H. (2006). Interpreting the international trends in testicular seminoma and nonseminoma incidence. *Nature Clinical Practice Urology*, 3(10), pp.532-543.
15. Calva-Cerqueira D, Chinnathambi S, Pechman B, Bair J, Larsen-Haidle J, Howe J. (2009). The rate of germline mutations and large deletions of SMAD4 and BMPR1A in juvenile polyposis. *Clinical Genetics*, 75(1):79-85.
16. Cannistraci C, Ogorevc J, Zorc M, Ravasi T, Dovc P, Kunej T. (2013). Pivotal role of the muscle-contraction pathway in cryptorchidism and evidence for genomic connections with cardiomyopathy pathways in RASopathies. *BMC Medical Genomics*, 6(1).
17. Chatterjee N, Shi J, García-Closas M. (2016). Developing and evaluating polygenic risk prediction models for stratified disease prevention. *Nature Reviews Genetics*, 17(7):392-406.
18. Chávez-Saldaña M, Viguera-Villaseñor R, Yokoyama-Rebollar E, Landero-Huerta D, Rojas-Castañeda J, Taja-Chayeb L et al. (2017). Single nucleotide polymorphisms associated with nonsyndromic cryptorchidism in Mexican patients. *Andrologia*, 50(1):e12788.
19. Chen R, Li H, Li Y, Fazli L, Gleave M, Nappi L et al. (2018). Loss of Nuclear Functions of HOXA10 Is Associated with Testicular Cancer Proliferation. *Frontiers in Oncology*, 8.
20. Chen Y, Qi C, Xia L, Li G. (2017). Identification of novel genetic etiology and key molecular pathways for seminoma via network-based studies. *International Journal of Oncology*, 51(4):1280-1290.
21. Cheng Z, Wang M, Xu C, Pei Y, Liu J, Huang H et al. (2016). Mutational analysis of HOXA10 gene in Chinese patients with cryptorchidism. *Andrologia*, 49(1):e12592.
22. Choi S, Choi J, Park C, Ahn C, Hong S, Lim D. (2012). Nanog regulates molecules involved in stemness and cell cycle-signalling pathway for maintenance of pluripotency of P19 embryonal carcinoma stem cells. *Journal of Cellular Physiology*, 227(11):3678-3692.
23. Chung, C., Kanetsky, P., Wang, Z., Hildebrandt, M., Koster, R., Skotheim, R., Kratz, C., Turnbull, C., Cortessis, V., Bakken, A., Bishop, D., Cook, M., Erickson, R., Fosså, S., Jacobs, K., Korde, L., Kraggerud, S., Lothe, R., Loud, J., Rahman, N., Skinner, E., Thomas, D., Wu, X., Yeager, M., Schumacher, F., Greene, M., Schwartz, S., McGlynn, K., Chanock, S. and Nathanson, K. (2013). Meta-analysis identifies four new loci associated with testicular germ cell tumor. *Nature Genetics*, 45(6), pp.680-685.
24. Cobellis G, Noviello C, Nino F, Romano M, Mariscoli F, Martino A et al. (2014). Spermatogenesis and Cryptorchidism. *Frontiers in Endocrinology*, 5.
25. Contreras-Cubas C, Sánchez-Hernández B, García-Ortiz H, Martínez-Hernández A, Barajas-Olmos F, Cid M et al. (2016). Heterogenous Distribution of MTHFR Gene Variants among Mestizos and Diverse Amerindian Groups from Mexico. *PLOS ONE*; 11(9):e0163248.

26. Crockford, G., Linger, R., Hockley, S., Dudakia, D., Johnson, L., Huddart, R., Tucker, K., Friedlander, M., Phillips, K., Hogg, D., Jewett, M., Lohynska, R., Daugaard, G., Richard, S., Chompret, A., Bonaïti-Pellié, C., Heidenreich, A., Albers, P., Olah, E., Geczi, L., Bodrogi, I., Ormiston, W., Daly, P., Guilford, P., Fosså, S., Heimdal, K., Tjulandin, S., Liubchenko, L., Stoll, H., Weber, W., Forman, D., Oliver, T., Einhorn, L., McMaster, M., Kramer, J., Greene, M., Weber, B., Nathanson, K., Cortessis, V., Easton, D., Bishop, D., Stratton, M. and Rapley, E. (2006). Genome-wide linkage screen for testicular germ cell tumour susceptibility loci. *Human Molecular Genetics*, 15(3), pp.443-451.
27. Dalgaard, M., Weinhold, N., Edsgård, D., Silver, J., Pers, T., Nielsen, J., Jørgensen, N., Juul, A., Gerds, T., Giwercman, A., Giwercman, Y., Cohn-Cedermark, G., Virtanen, H., Toppari, J., Daugaard, G., Jensen, T., Brunak, S., Rajpert-De Meyts, E., Skakkebæk, N., Leffers, H. and Gupta, R. (2011). A genome-wide association study of men with symptoms of testicular dysgenesis syndrome and its network biology interpretation. *Journal of Medical Genetics*, 49(1), pp.58-65.
28. Davis-Dao C, Koh C, Hardy B, Chang A, Kim S, De Filippo R et al. (2012). Shorter Androgen Receptor CAG Repeat Lengths Associated with Cryptorchidism Risk among Hispanic White Boys. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 97(3):E393-E399.
29. Debruyne D, Dries R, Sengupta S, Seruggia D, Gao Y, Sharma B et al. (2019). BORIS promotes chromatin regulatory interactions in treatment-resistant cancer cells. *Nature*, 572(7771):676-680.
30. Demant P. (2003) Cancer susceptibility in the mouse: genetics, biology and implications for human cancer. *Nat Rev Genet* 4, 721–734
31. Devouassoux-Shisheboran, M., Mauduit, C., Tabone, E., Droz, J. and Benahmed, M. (2003). Growth regulatory factors and signalling proteins in testicular germ cell tumours. *APMIS*, 111(1), pp.212-224.
32. Dias, V., Meachem, S., Rajpert-De Meyts, E., McLachlan, R., Manuelpillai, U. and Loveland, K. (2007). Activin receptor subunits in normal and dysfunctional adult human testis. *Human Reproduction*, 23(2), pp.412-420.
33. Dieckmann, K. and Pichlmeier, U. (2004). Clinical epidemiology of testicular germ cell tumors. *World Journal of Urology*, 22(1), pp.2-14.
34. Dimov N, Zynger D, Luan C, Kozłowski J, Yang X. (2007). Topoisomerase II Alpha Expression in Testicular Germ Cell Tumors. *Urology*, 69(5):955-961.
35. Dorssers L, Gillis A, Stoop H, van Marion R, Nieboer M, van Riet J et al. (2019). Molecular heterogeneity and early metastatic clone selection in testicular germ cell cancer development. *British Journal of Cancer*, 120(4):444-452.
36. Elder, J. (2016). Surgical Management of the Undescended Testis: Recent Advances and Controversies. *European Journal of Pediatric Surgery*, 26(05), pp.418-426.

37. Ferguson, L. and Agoulnik, A. (2013). Testicular Cancer and Cryptorchidism. *Frontiers in Endocrinology*, 4.
38. Feuk L, Carson A, Scherer S. (2006). Structural variation in the human genome. *Nature Reviews Genetics*, 7(2):85-97.
39. Foresta, C., Zuccarello, D., Garolla, A. and Ferlin, A. (2008). Role of Hormones, Genes, and Environment in Human Cryptorchidism. *Endocrine Reviews*, 29(5), pp.560-580.
40. Garner, M., Turner, M., Ghadirian, P. and Krewski, D. (2005). Epidemiology of testicular cancer: An overview. *International Journal of Cancer*, 116(3), pp.331-339.
41. Garolla A, Ferlin A, Vinanzi C, Roverato A, Sotti G, Artibani W et al. (2005). Molecular analysis of the androgen receptor gene in testicular cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 12(3):645-655.
42. Gavin E, Song B, Wang Y, Xi Y, Ju J. (2008). Reduction of Orc6 Expression Sensitizes Human Colon Cancer Cells to 5-Fluorouracil and Cisplatin. *PLoS ONE*, 3(12):e4054.
43. Gely-Pernot A, Raverdeau M, Célébi C, Dennefeld C, Feret B, Klopfenstein M et al. (2012). Spermatogonia Differentiation Requires Retinoic Acid Receptor γ . *Endocrinology*, 153(1):438-449.
44. Gely-Pernot A, Raverdeau M, Teletin M, Vernet N, Féret B, Klopfenstein M et al. (2015). Retinoic Acid Receptors Control Spermatogonia Cell-Fate and Induce Expression of the SALL4A Transcription Factor. *PLOS Genetics*, 11(10):e1005501.
45. Global Cancer Observatory [Internet]. Gco.iarc.fr. 2020 [cited 4 October 2020]. Available from: <https://gco.iarc.fr/>
46. Goertz M, Wu Z, Gallardo T, Hamra F, Castrillon D. (2011; 2011). Foxo1 is required in mouse spermatogonial stem cells for their maintenance and the initiation of spermatogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 121(9):3456-3466.
47. Greene, M., Mai, P., Loud, J., Pathak, A., Peters, J., Mirabello, L., McMaster, M., Rosenberg, P. and Stewart, D. (2014). Familial testicular germ cell tumors (FTGCT) - overview of a multidisciplinary etiologic study. *Andrology*, 3(1), pp.47-58.
48. Gu W, Zhang F, Lupski J. (2008). Mechanisms for human genomic rearrangements. *PathoGenetics*, 1(1):4.
49. Gurney, J., McGlynn, K., Stanley, J., Merriman, T., Signal, V., Shaw, C., Edwards, R., Richiardi, L., Hutson, J. and Sarfati, D. (2017). Risk factors for cryptorchidism. *Nature Reviews Urology*, 14(9), pp.534-548.
50. Hernandez, A., Young, C., Wang, J. and Wang, X. (2019). Lessons learned from SMAD4 loss in squamous cell carcinomas. *Molecular Carcinogenesis*, 58(9), pp.1648-1655.
51. Hu L, Yao X, Huang H, Guo Z, Cheng X, Xu Y et al. (2018). Clinical significance of germline copy number variation in susceptibility of human diseases. *Journal of Genetics and Genomics*, 45(1):3-12.

52. Huang, d., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols*, 4(1), 44–57.
53. Jin C, Li H, Murata T, Sun K, Horikoshi M, Chiu R et al. (2002). JDP2, a Repressor of AP-1, Recruits a Histone Deacetylase 3 Complex to Inhibit the Retinoic Acid-Induced Differentiation of F9 Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 22(13):4815-4826.
54. Kanetsky, P., Mitra, N., Vardhanabhuti, S., Li, M., Vaughn, D., Letrero, R., Ciosek, S., Doody, D., Smith, L., Weaver, J., Albano, A., Chen, C., Starr, J., Rader, D., Godwin, A., Reilly, M., Hakonarson, H., Schwartz, S. and Nathanson, K. (2009). Common variation in KITLG and at 5q31.3 predisposes to testicular germ cell cancer. *Nature Genetics*, 41(7), pp.811-815.
55. Kanetsky, P., Mitra, N., Vardhanabhuti, S., Vaughn, D., Li, M., Ciosek, S., Letrero, R., D'Andrea, K., Vaddi, M., Doody, D., Weaver, J., Chen, C., Starr, J., Håkonarson, H., Rader, D., Godwin, A., Reilly, M., Schwartz, S. and Nathanson, K. (2011). A second independent locus within DMRT1 is associated with testicular germ cell tumor susceptibility. *Human Molecular Genetics*, 20(15), pp.3109-3117.
56. Kawakami T, Zhang C, Okada Y, Okamoto K. (2006). Erasure of methylation imprint at the promoter and CTCF-binding site upstream of H19 in human testicular germ cell tumors of adolescents indicate their fetal germ cell origin. *Oncogene*, 25(23):3225-3236.
57. Kishnani P, Goldstein J, Austin S, Arn P, Bachrach B, Bali D et al. (2019). Diagnosis and management of glycogen storage diseases type VI and IX: a clinical practice resource of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genetics in Medicine*, 21(4):772-789.
58. Komarowska M, Hermanowicz A, Debek W. (2015). Putting the pieces together: cryptorchidism – do we know everything? *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 28(11-12).
59. Kratz, C., Mai, P. and Greene, M. (2010). Familial testicular germ cell tumours. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 24(3), pp.503-513.
60. Liang, C., Xu, J., Meng, Q., Zhang, B., Liu, J., Hua, J., Zhang, Y., Shi, S. and Yu, X. (2019). TGFβ1-induced autophagy affects the pattern of pancreatic cancer progression in distinct ways depending on SMAD4 status. *Autophagy*, pp.1-15.
61. Litchfield K, Shipley J, Turnbull C. (2015). Common variants identified in genome-wide association studies of testicular germ cell tumour: an update, biological insights and clinical application. *Andrology*, 3(1):34-46.
62. Litchfield, K., Levy, M., Orlando, G., Loveday, C., Law, P., Migliorini, G., Holroyd, A., Broderick, P., Karlsson, R., Haugen, T., Kristiansen, W., Nsengimana, J., Fenwick, K., Assiotis, I., Kote-Jarai, Z., Dunning, A., Muir, K., Peto, J., Eeles, R., Easton, D., Dudakia, D., Orr, N., Pashayan, N., Bishop, D., Reid, A., Huddart, R., Shipley, J., Grotmol, T., Wiklund, F., Houlston, R. and Turnbull, C. (2017). Identification of 19 new risk loci and potential regulatory mechanisms influencing susceptibility to testicular germ cell tumor. *Nature Genetics*, 49(7), pp.1133-1140.

63. Liu T, Zhang H, Yi S, Gu L, Zhou M. (2019). Mutual regulation of MDM 4 and TOP 2A in cancer cell proliferation. *Molecular Oncology*, 13(5):1047-1058.
64. Looijenga, L., Leeuw, H., Oorschot, M., Gulp, R., Stoop, H., Gillis, A., et al. (2003). Stem cell factor receptor (c-KIT) codon 816 mutations predict development of bilateral testicular germ-cell tumors. *Cancer Res* 63, 7674–7678.23.
65. Loveday C, Sud A, Litchfield K, Levy M, Holroyd A, Broderick P et al. (2019). Runs of homozygosity and testicular cancer risk. *Andrology*, 7(4):555-564.
66. Loveland, K., Rajpert-De Meyts, E., Veeramachaneni, D.N.R., Testicular Cancer, *Comprehensive Toxicology*, Second Edition, 2018, Volume 11, Pages 247-263, ISBN 978-0-08-046884-6, 10.1016/B978-0-08-046884-6.01136-2.
67. Mai, P., Friedlander, M., Tucker, K., Phillips, K., Hogg, D., Jewett, M., Lohynska, R., Daugaard, G., Richard, S., Bonaïti-Pellié, C., Heidenreich, A., Albers, P., Bodrogi, I., Geczi, L., Olah, E., Daly, P., Guilford, P., Fosså, S., Heimdal, K., Liubchenko, L., Tjulandin, S., Stoll, H., Weber, W., Easton, D., Dudakia, D., Huddart, R., Stratton, M., Einhorn, L., Korde, L., Nathanson, K., Bishop, D., Rapley, E. and Greene, M. (2010). The International Testicular Cancer Linkage Consortium: A clinicopathologic descriptive analysis of 461 familial malignant testicular germ cell tumor kindred. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 28(5), pp.492-499.
68. Mi, H., Ebert, D., Muruganujan, A., Mills, C., Albou, L. P., Mushayamaha, T., & Thomas, P. D. (2020). PANTHER version 16: a revised family classification, tree-based classification tool, enhancer regions and extensive API. *Nucleic acids research*, gkaa1106.
69. Moritoki Y, Hayashi Y, Mizuno K, Kamisawa H, Nishio H, Kurokawa S et al. (2014). Expression Profiling of microRNA in Cryptorchid Testes: miR-135a Contributes to the Maintenance of Spermatogonial Stem Cells by Regulating FoxO1. *Journal of Urology*, 191(4):1174-1180.
70. Nathanson, K., Kanetsky, P., Hawes, R., Vaughn, D., Letrero, R., Tucker, K., Friedlander, M., Phillips, K., Hogg, D., Jewett, M., Lohynska, R., Daugaard, G., Richard, S., Chompret, A., Bonaïti-Pellié, C., Heidenreich, A., Olah, E., Geczi, L., Bodrogi, I., Ormiston, W., Daly, P., Oosterhuis, J., Gillis, A., Looijenga, L., Guilford, P., Fosså, S., Heimdal, K., Tjulandin, S., Liubchenko, L., Stoll, H., Weber, W., Rudd, M., Huddart, R., Crockford, G., Forman, D., Oliver, D., Einhorn, L., Weber, B., Kramer, J., McMaster, M., Greene, M., Pike, M., Cortessis, V., Chen, C., Schwartz, S., Bishop, D., Easton, D., Stratton, M. and Rapley, E. (2005). The Y Deletion gr/gr and Susceptibility to Testicular Germ Cell Tumor. *The American Journal of Human Genetics*, 77(6), pp.1034-1043.
71. Pan J. (2004). Histone modification activities of JDP2 associated with retinoic acid-induced differentiation of F9 cells. *Nucleic Acids Symposium Series*, 48(1):189-190.
72. Pangas, S., Li, X., Umans, L., Zwijsen, A., Huylebroeck, D., Gutierrez, C., Wang, D., Martin, J., Jamin, S., Behringer, R., Robertson, E. and Matzuk, M. (2008). Conditional Deletion of Smad1 and Smad5 in

- Somatic Cells of Male and Female Gonads Leads to Metastatic Tumor Development in Mice. *Molecular and Cellular Biology*, 28(1), pp.248-257.
73. Peer N, Law S, Murdoch B, Goulding E, Eddy E, Kim K. (2018). Germ Cell–Specific Retinoic Acid Receptor α Functions in Germ Cell Organization, Meiotic Integrity, and Spermatogonia. *Endocrinology*, 159(9):3403-3420.
74. Price, A. L., Patterson, N. J., Plenge, R. M., Weinblatt, M. E., Shadick, N. A., & Reich, D. (2006). Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nature genetics*, 38(8), 904–909.
75. Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P. I., Daly, M. J., & Sham, P. C. (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American journal of human genetics*, 81(3), 559–575.
76. Rapley, E., Crockford, G., Teare, D., Biggs, P., Seal, S., Barfoot, R., Edwards, S., Hamoudi, R., Heimdal, K., Fosså, S., Tucker, K., Donald, J., Collins, F., Friedlander, M., Hogg, D., Goss, P., Heidenreich, A., Ormiston, W., Daly, P., Forman, D., Oliver, T., Leahy, M., Huddart, R., Cooper, C., Bodmer, J., Easton, D., Stratton, M. and Bishop, D. (2000). Localization to Xq27 of a susceptibility gene for testicular germ-cell tumours. *Nature Genetics*, 24(2), pp.197-200.
77. Rapley E, Turnbull C, Al Olama A, Dermitzakis E, Linger R, Huddart R et al. (2009). A genome-wide association study of testicular germ cell tumor. *Nature Genetics*, 41(7):807-810.
78. Rapley E, Nathanson K. (2010). Predisposition alleles for testicular germ cell tumour. *Current Opinion in Genetics & Development*, 20(3):225-230.
79. Rocca M, Di Nisio A, Marchiori A, Ghezzi M, Opocher G, Foresta C et al. (2017). Copy number variations of E2F1: a new genetic risk factor for testicular cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 24(3):119-125.
80. Rodríguez F, Vallejos C, Giraudo F, Unanue N, Hernández M, Godoy P et al. (2017). Copy number variants of Ras/MAPK pathway genes in patients with isolated cryptorchidism. *Andrology*, 5(5):923-930.
81. Rodríguez F, Vallejos C, Ponce D, Unanue N, Hernández M, Célis S et al. (2018). Study of Ras/MAPK pathway gene variants in Chilean patients with Cryptorchidism. *Andrology*, 6(4):579-584.
82. Ruark, E., Seal, S., McDonald, H., Zhang, F., Elliot, A., Lau, K., Perdeaux, E., Rapley, E., Eeles, R., Peto, J., Kote-Jarai, Z., Muir, K., Nsengimana, J., Shipley, J., Bishop, D., Stratton, M., Easton, D., Huddart, R., Rahman, N. and Turnbull, C. (2013). Identification of nine new susceptibility loci for testicular cancer, including variants near DAZL and PRDM14. *Nature Genetics*, 45(6), pp.686-689.
83. Sakuma, Y., Sakurai, S., Oguni, S., Hironaka, M., and Salto, K. (2003). Alterations of the c-kit gene in testicular germ cell tumors. *Cancer Sci.* 94, 486–491. doi: 10.1111/j.1349-7006.2003.tb01470.x

84. Salazar-Flores J, Zuñiga-Chiquette F, Rubi-Castellanos R, Álvarez-Miranda J, Zetina-Hernández A, Martínez-Sevilla V et al. (2015). Admixture and genetic relationships of Mexican Mestizos regarding Latin American and Caribbean populations based on 13 CODIS-STRs. *HOMO*, 66(1):44-59.
85. Schumacher, F., Wang, Z., Skotheim, R., Koster, R., Chung, C., Hildebrandt, M., Kratz, C., Bakken, A., Timothy Bishop, D., Cook, M., Erickson, R., Fossa, S., Greene, M., Jacobs, K., Kanetsky, P., Kolonel, L., Loud, J., Korde, L., Le Marchand, L., Pablo Lewinger, J., Lothe, R., Pike, M., Rahman, N., Rubertone, M., Schwartz, S., Siegmund, K., Skinner, E., Turnbull, C., Van Den Berg, D., Wu, X., Yeager, M., Nathanson, K., Chanock, S., Cortessis, V. and McGlynn, K. (2013). Testicular germ cell tumor susceptibility associated with the UCK2 locus on chromosome 1q23. *Human Molecular Genetics*, 22(13), pp.2748-2753.
86. Shive H, West R, Embree L, Azuma M, Sood R, Liu P et al. (2010). *brca2* in zebrafish ovarian development, spermatogenesis, and tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(45):19350-19355.
87. Sinopidis, X., Mourelatou, R., Kostopoulou, E., Karvela, A., Rojas-Gil, A., Tsekoura, E., Georgiou, G. and Spiliotis, B. (2019). Novel combined insulin-like 3 variations of a single nucleotide in cryptorchidism. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 32(9), pp.987-994.
88. Skakkebaek, N., Meyts, E. and Main, K. (2001). Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *APMIS*, 109(S103), pp.S22-S30.
89. Sud A, Cooke R, Swerdlow A, Houlston R. (2015). Genome-wide homozygosity signature and risk of Hodgkin lymphoma. *Scientific Reports*, 5(1).
90. Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., Bork, P., Jensen, L. J., & Mering, C. V. (2019). STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic acids research*, 47(D1), D607–D613.
91. Tabas-Madrid D, Nogales-Cadenas R, Pascual-Montano A. GeneCodis3: a non-redundant and modular enrichment analysis tool for functional genomics. *Nucleic Acids Res.* 2012 Jul;40(Web Server issue):W478-83.
92. Terashima M, Fujita Y, Togashi Y, Sakai K, De Velasco M, Tomida S et al. (2014). KIAA1199 interacts with glycogen phosphorylase kinase β -subunit (PHKB) to promote glycogen breakdown and cancer cell survival. *Oncotarget*, 5(16):7040-7050.
93. Torkamani A, Wineinger N, Topol E. (2018). The personal and clinical utility of polygenic risk scores. *Nature Reviews Genetics*, 19(9):581-590.
94. Trabert, B., Chen, J., Devesa, S., Bray, F. and McGlynn, K. (2014). International patterns and trends in testicular cancer incidence, overall and by histologic subtype, 1973-2007. *Andrology*, 3(1), pp.4-12.

95. Turnbull, C., Rapley, E., Seal, S., Pernet, D., Renwick, A., Hughes, D., Ricketts, M., Linger, R., Nsengimana, J., Deloukas, P., Huddart, R., Bishop, D., Easton, D., Stratton, M. and Rahman, N. (2010). Variants near DMRT1, TERT and ATF7IP are associated with testicular germ cell cancer. *Nature Genetics*, 42(7), pp.604-607.
96. Turnbull, C. and Rahman, N. (2011). Genome-wide association studies provide new insights into the genetic basis of testicular germ-cell tumour. *International Journal of Andrology*, 34(4pt2), pp.e86-e97.
97. Vanhattem W, Brosens L, Deleng W, Morsink F, Lens S, Carvalho R et al. (2008). Large Genomic Deletions of SMAD4, Bmpr1a and PTEN in Juvenile Polyposis. *Gastroenterology*, 134(4):A-604-A-604.
98. Vignal A, Milan D, SanCristobal M, Eggen A. (2002). A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution*, 34(3).
99. Viguera-Villaseñor, R., Cortés-Trujillo, L., Chávez-Saldaña, M., Vázquez, F., Carrasco-Daza, D., Cuevas-Alpuche, O. and Rojas-Castañeda, J. (2015). Analysis of POU5F1, c-Kit, PLAP, AP2γ and SALL4 in gonocytes of patients with cryptorchidism. *Acta Histochemica*, 117(8), pp.752-761.
100. Virtanen, H., Bjerknes, R., Cortes, D., Jørgensen, N., Rajpert-De Meyts, E., Thorsson, A., Thorup, J. and Main, K. (2007). Cryptorchidism: classification, prevalence and long-term consequences. *Acta Paediatrica*, 96(5), pp.611-616.
101. Wang B, Wu L, Li D, Liu Y, Guo J, Li C et al. (2019). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic Fibroblasts by Jdp2-Jhdm1b-Mkk6-Glis1-Nanog-Essrb-Sall4. *Cell Reports*, 27(12):3473-3485.e5.
102. Wang C, Wang R, Liu R, Yang W. (2017). Jun Dimerization Protein 2 Activates Mc2r Transcriptional Activity: Role of Phosphorylation and SUMOylation. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2):304.
103. Wang K, Chen Y, Zhao Z, Feng M, Zhang S. (2019). Identification of potential core genes and miRNAs in testicular seminoma via bioinformatics analysis. *Molecular Medicine Reports*, 20:4013-4022.
104. Wang, X., Pankratz, V. S., Fredericksen, Z., Tarrell, R., Karaus, M., McGuffog, L., Pharaoh, P. D. P., Ponder, B. A. J., Dunning, A. M., Peock, S., Cook, M., Oliver, C., et al. (2010). Common variants associated with breast cancer in genome-wide association studies are modifiers of breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Hum. Molec. Genet*, 19: 2886-2897.
105. Wang Y, Gray D, Robbins A, Crowgey E, Chanock S, Greene M et al. (2018). Subphenotype meta-analysis of testicular cancer genome-wide association study data suggests a role for RBFOX family genes in cryptorchidism susceptibility. *Human Reproduction*, 33(5):967-977.
106. Williams K, Baumann L, Shah A, Abdullah F, Johnson E, Oyetunji T. (2018). Age at orchiopexy for undescended testis in the United States. *Journal of Pediatric Surgery*, 53(1):86-89.

107. Woldu S, Aydin A, Rao A, Hutchinson R, Singla N, Clinton T et al. (2018). Differences at Presentation and Treatment of Testicular Cancer in Hispanic Men: Institutional and National Hospital-based Analyses. *Urology*, 112:103-111.
108. Wullrich-Schmoll A, Kilimann M. (1996). Structure of the Human Gene Encoding the Phosphorylase Kinase beta Subunit (PHKB). *European Journal of Biochemistry*, 238(2):374-380.
109. Xu Y, Jin C, Liu Z, Pan J, Li H, Zhang Z et al. (2014). Cloning and characterization of the mouse JDP2 gene promoter reveal negative regulation by p53. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 450(4):1531-1536.
110. Yang W, Zhang C, Li Y, Jin A, Sun Y, Yang X et al. (2019). Phosphorylase Kinase β Represents a Novel Prognostic Biomarker and Inhibits Malignant Phenotypes of Liver Cancer Cell. *International Journal of Biological Sciences*, 15(12):2596-2606.
111. Zeng S, Liu A, Dai L, Yu X, Zhang Z, Xiong Q et al. (2019). Prognostic value of TOP2A in bladder urothelial carcinoma and potential molecular mechanisms. *BMC Cancer*, 19(1).
112. Zimmerman K, Jones R, Petermann E, Jeggo P. (2013). Diminished Origin-Licensing Capacity Specifically Sensitizes Tumor Cells to Replication Stress. *Molecular Cancer Research*, 11(4):370-380.

11. ANEXOS

11.1 TABLA 1

Tabla 1. Perfil total de SNV de pacientes con CO aislada

SNV	Posición	Genes	Alelo 1	Función	MAF CO/Control	OR	Valor de P
rs1725260	Chr1:7562339	CAMTA1	G/A/T	Intrónica /Reguladora	0.1471/0.4178	0.06575	0.0002029
rs3181088	Chr1:101198708	VCAM1	C/T	Intrónica	0.1579/0.0274	36.47	0.0004035
rs12062592	Chr1:157377578		A/G	Intrónica	0.1579/0.4932	0.09464	0.000344
rs7579290	Chr2:106925595		G/A	Intergénica	0.1842/0.5069	0.1105	0.0004895
rs13110156	Chr4:16656578	LDB2	C/G/T	Intrónica	0.2632/0.0274	16.95	0.000454
rs4692945	Chr4:169536725	PALLD	T/C	Intrónica /Reguladora	0.3684/0.1164	8.179	0.0004819
rs4702153	Chr5:5057009	LOC340094 LINC01020	G/C	Intrónica	0.2632/0.08219	9.96	0.0002981
rs6931053	Chr6:134734547		A/G	Intrónica	0.2368/0.0274	75.98	8.832e-05
rs10965946	Chr9:23587699	CR627240 LOC101929563	T/C	Intrónica	0.4474/0.1164	6.634	0.0004109
rs3780201	Chr9:127104775	NEK6	T/C	Intrónica	0.1842/0.5	0.02007	1.099e-05
rs12348251	Chr9:137490048		G/T	Variante en región reguladora	0.2222/0.02055	66.34	0.0002056
rs10827718	Chr10:37059856		G/A/C/T	Intergénica	0.2632/0.04795	13.81	0.0004935
rs10827721	Chr10:37060221		A/C	Intergénica	0.2632/0.04795	13.81	0.0004935
rs2384165	Chr10:54967637		G/T	Intergénica	0.6053/0.3288	8.071	0.0004022
rs12416804	Chr11:72048526	CLPB	T/G	Intrónica	0.3684/0.1027	11.54	0.0001889
rs17112524	Chr11:111133088	C11orf53	C/G	Intrónica	0.2895/0.06164	17.59	0.0001964
rs11060348	Chr12:129925840	TMEM132D	A/G/T	Intrónica	0.1842/0.02113	26.78	0.0002692
rs12584067	Chr13:28892257	FLT1	C/G	Intrónica	0.1944/0.0411	19.72	0.0003953
rs17177739	Chr14:37369858	SLC25A21	A/G	Intrónica	0.2632/0.0411	12.86	0.0003241
rs8013023	Chr14:75906382	JDP2	T/C	Intrónica	0.3333/0.03425	39.21	0.0001697
rs10521244	Chr17:13737852		G/C/T	Intrónica	0.3158/0.1233	11.04	0.0004187
rs482679	Chr19:39557880		G/C	Intergénica	0.1053/0.3889	0.03862	8.259e-05
rs2836884	Chr21:40467643		T/C	Intergénica	0.7105/0.2917	7.939	0.0004201
rs3761555	ChrX:122316437		T/C	Intergénica	0.5789/0.1781	19.64	0.0004258
rs5975747	ChrX:135636920	VGLL1	T/C	Intrónica	0.4737/0.1096	17.09	0.0004859
rs7889467	ChrX:141360548		G/A/C	Intrónica	0.2105/0.05479	107	0.0003356
rs5954598	ChrX:141360982		G/A	Intrónica	0.2105/0.05479	107	0.0003356
rs7056592	ChrX:141363670		T/G	Intrónica	0.2105/0.05479	107	0.0003356
rs4825113	ChrX:141365746		A/T	Intrónica	0.3158/0.05479	84.44	0.0004756
rs4824897	ChrX:141368164		C/T	Intrónica	0.2105/0.05479	107	0.0003356
rs16993874	ChrX:141369326		A/G	Intrónica	0.2105/0.05479	107	0.0003356
rs12393405	ChrX:141370112		G/A	Intrónica	0.3158/0.05479	84.44	0.0004756

Las SNV marcadas en rojo son a aquellas que se presentaron de manera común entre los perfiles individuales de ambos padecimientos.

11.2 TABLA 2

Tabla 2. Perfil total de SNV de pacientes con TGCT

SNV	Posición	Genes	Alelo 1	Función	MAF TGCT/ Control	OR	Valor de P
rs515649	Chr1:28452889		G/A/T	Sitio de unión a FT	0.5526/0.2192	5.985	0.000345
rs10923182	Chr1:117505312	<i>PTGFRN</i>	C/T	Intrónica	0.475/0.137	9.17	7.367e-05
rs10923183	Chr1:117506732	<i>PTGFRN</i>	C/G/T	Intrónica	0.3421/0.1027	7.46	0.000321
rs12090536	Chr1:117515115	<i>PTGFRN</i>	A/G	Intrónica	0.45/0.1575	7.697	0.0002294
rs7552382	Chr1:117523001	<i>PTGFRN</i>	A/G	Intrónica	0.45/0.1575	7.697	0.0002294
rs11808024	Chr1:162945443		C/T	Intergénica	0.4167/0.1233	12.2	0.0001582
rs2349106	Chr1:165903962		G/A	Intergénica	0.75/0.3836	7.386	0.000198
rs10911555	Chr1:184282979		A/G	Intergénica	0.7/0.3643	8.536	0.0003952
rs4669613	Chr2:10874512	<i>ATP6V1C2</i>	G/A	Intrónica	0.825/0.411	7.471	0.0001132
rs11678309	Chr2:10876422	<i>ATP6V1C2</i>	G/A	Intrónica	0.8/0.3973	7.53	0.0001051
rs669195	Chr2: 31478692	<i>EHD3</i>	G/A	Intrónica	0.05/0.3403	0.05319	0.0002995
rs3768904	Chr2:121992208	<i>TFCP2L1</i>	C/T	Intrónica	0.5/0.2123	6.924	0.0004337
rs934037	Chr2:218869128		G/C	Intrónica	0.225/0.03425	15.64	0.0004751
rs4015934	Chr2:218869542		T/C	Intrónica	0.225/0.0274	18.32	0.0003233
rs6745675	Chr2: 220653161		T/C/G	Intergénica	0.55/0.2329	6.97	0.0002017
rs10210302	Chr2:234158839		C/A/T	Intrónica hebra sentido	0.325/0.137	8.312	0.000412
rs6752107	Chr2:234161448	<i>ATG16L1</i>	G/A	Intrónica hebra sentido	0.325/0.125	11.65	0.0001801
rs6431654	Chr2:234161769	<i>ATG16L1</i>	C/T	Intrónica hebra sentido	0.3611/0.137	10.3	0.0002515
rs13009506	Chr2:234175706	<i>ATG16L1</i>	G/A/T	Intrónica hebra sentido	0.325/0.1301	8.344	0.0003629
rs7429763	Chr3:22614642		C/A	Intergénica	0.275/0.08219	11.54	0.0002569
rs12494066	Chr3:74444271	<i>CNTN3</i>	C/T	Intrónica	0.275/0.5342	0.1035	0.0002272
rs1870916	Chr3:117166593		G/A	Intergénica	0.125/0.3904	0.08836	0.000426
rs1656986	Chr3:144248716		T/C	Variante en región reguladora	0.275/0.4658	0.09197	0.0004045
rs1726525	Chr3:144252216		C/T	Intergénica	0.275/0.4658	0.09197	0.0004045
rs2717382	Chr3:144259421		A/T	Intergénica	0.275/0.4863	0.09314	0.0003804
rs2118000	Chr3:144265313		G/A	Variante en región reguladora	0.275/0.4863	0.09314	0.0003804
rs1009621	Chr3:148190748		A/G	Intrónica	0.65/0.2877	6.381	0.0002195
rs10513394	Chr3:151084478	<i>MED12L</i>	G/A	Intrónica	0.55/0.2055	7.265	0.0003369
rs4894710	Chr3:175014122	<i>NAALADL2</i>	G/A	Intrónica	0.05/0.3562	0.04686	0.0001484
rs10009657	Chr4:9833734	<i>SLC2A9</i>	G/A	Intrónica	0.025/0.3472	0.02251	0.0004879
rs4697350	Chr4:22915626		T/C	Intergénica	0.625/0.3819	8.768	0.0003365
rs10434448	Chr4:52750410	<i>DCUN1D4</i>	C/A/G/T	Intrónica	0.125/0.4236	0.07799	3.843e-05
rs10006267	Chr4:54493964	<i>PDGFRA</i> <i>LNK1</i>	C/T	Intrónica	0.175/0.5205	0.02838	6.7e-06
rs7671488	Chr4:122399338		T/A/C	Intergénica	0.65/0.2431	6.516	3.999e-05
rs4333164	Chr4:148396927		C/T	Intergénica	0.2368/0.0411	13.88	0.0002879
rs10061064	Chr5:164177109		T/G	Intrónica	0.15/0.4521	0.1195	0.0003167
rs1883259	Chr6:25683280	<i>SCGN</i>	A/C	Intrónica	0.1316/0.4041	0.1122	0.0003003
rs943084	Chr6:43770150		C/T	Intergénica	0.2105/0.0411	12.11	0.0004778

rs763354	Chr6:72115621		C/T	Intrónica	0.675/0.2603	5.616	0.000151
rs7349905	Chr6:72118716	LINC00472	G/C	Variante en un exon de un transcrito no codificante	0.65/0.2534	5.701	0.0001876
rs239577	Chr6:80731014	TTK	A/G	Intrónica	0.425/0.1479	12.39	8.426e-05
rs783397	Chr6:106987161	AIM1 CRYBG1	A/G/T	Intrónica	0.175/0.4792	0.06445	1.483e-05
rs6931053	Chr6:134734547		A/G	Intrónica	0.325/0.0274	59.49	3.346e-06
rs9397064	Chr6:151914951	CCDC170	T/C	Intrónica	0.275/0.5	0.04221	8.577e-05
rs434558	Chr6:159914754		G/C	Intrónica	0.225/0.03472	21.7	0.0002092
rs2048327	Chr6:160863532	SLC22A3	T/C	Intrónica	0.675/0.3493	4.857	0.0004747
rs3798953	Chr6:161689816	AGPAT4	A/G	Intrónica	0.225/0.05479	14.16	0.0002066
rs4723552	Chr7:36695340	AOAH	G/A	Intrónica	0.25/0.4589	0.07344	0.0002033
rs10953173	Chr7:96026753		C/T	Intergénica	0.375/0.07534	22.43	6.8e-06
rs17498088	Chr7:113008273		G/A	Intergénica	0.3684/0.1438	8.505	0.0004525
rs2098191	Chr7:122936601		T/G/C	Intergénica	0.3/0.1164	12.74	0.0003245
rs2098192	Chr7:122936656		C/T	Intergénica	0.3/0.1197	12.14	0.0004232
rs2109769	Chr7:122938075		G/C	Intergénica	0.3/0.1164	12.74	0.0003245
rs2215579	Chr7:122970804		C/T	Intergénica	0.3/0.1164	12.74	0.0003245
rs2366559	Chr7:157237427		A/G	Intergénica	0.2/0.4315	0.1187	0.0002441
rs16938761	Chr8:74920598	LY96	A/G	Intrónica	0.2/0.4658	0.1132	0.0001693
rs1061677	Chr9:34982014	KIAA1045 PHF24	T/A	Variante en región 3'UTR	0.325/0.08219	8.114	0.0002378
rs11999338	Chr9:93240854	LOC340515 LINC01501	T/C	Intrónica	0.225/0.4863	0.1175	0.0002361
rs4837760	Chr9:123113646		G/T/A	Variante en región reguladora	0.7/0.3288	5.38	0.000439
rs11243759	Chr9:133427524		A/C	Variante en región reguladora	0.25/0.5068	0.1244	0.0003048
rs10901355	Chr9:134063923	NUP214	A/G	Intrónica	0.4/0.1301	5.193	0.0003948
rs12348251	Chr9:137490048		G/T	Variante en región reguladora	0.35/0.02055	74.45	5.896e-06
rs1998633	Chr10:27047640	ABI1	C/A/G/T	Intrónica	0.325/0.07534	9.232	0.0002638
rs10829066	Chr10:27087849	ABI1	A/C	Intrónica	0.3421/0.08219	8.959	0.0003167
rs1545844	Chr10:44679763		C/A/T	Variante en región reguladora	0.275/0.08219	9.193	0.0004847
rs11594522	Chr10:44696352		G/A	Intergénica	0.3/0.08219	12.28	0.0001737
rs17155733	Chr10:44737433		A/G	Intergénica	0.275/0.06164	10.07	0.0002706
rs4980076	Chr10:81172704	ZCCHC24	C/A	Intrónica	0.625/0.3219	8.751	0.0004015
rs2255909	Chr10:117449550	ATRNL1	C/G/T	Intrónica	0.25/0.07534	9.422	0.0004866
rs4881737	Chr11:1390135		C/T	Intergénica	0.55/0.2153	17.31	0.000335
rs2124447	Chr11:4995989		A/G	Intrónica	0.15/0.4384	0.05461	1.1e-05
rs7937807	Chr11:36890100		G/A	Intergénica	0.275/0.07534	15.39	9.986e-05
rs17628272	Chr12:59483101		A/G	Intergénica	0.5/0.1918	6.058	0.0001944
rs7952875	Chr12:59507893		A/G	Variante en región reguladora	0.7/0.3699	7.075	0.0002293
rs6581231	Chr12:59511653		C/G/T	Intergénica	0.7/0.3699	7.075	0.0002293
rs6581232	Chr12:59511889		C/A	Intergénica	0.7/0.375	7.04	0.0002453

rs1500034	Chr12:59520309		T/C	Intergénica	0.725/0.3699	8.111	0.0001273
rs1500033	Chr12:59520330		G/T	Intergénica	0.7/0.3699	7.075	0.0002293
rs6581235	Chr12:59531067		G/A/C	Intergénica	0.625/0.3472	6.683	0.0004433
rs2036299	Chr12:59544503		A/G	Variante en región reguladora	0.275/0.09722	9.105	0.0004727
rs17019519	Chr12:92085045		C/T	Intergénica	0.6/0.2397	6.419	0.0001199
rs7965616	Chr12:106688149		G/A	Intrónica	0.6053/0.2222	5.413	0.0004607
rs2018070	Chr13:88993957		G/A	Intergénica	0.2/0.4315	0.1235	0.0004073
rs2163090	Chr14:21012674		G/A	Intergénica	0.7/0.3014	4.84	0.0002991
rs8013023	Chr14:75906382	JDP2	T/C	Intrónica	0.4/0.03425	35.03	2.536e-05
rs2172609	Chr15:57874494		C/T	Intergénica	0.7/0.363	5.729	0.0003081
rs12932881	Chr16:51740595		C/T	Intergénica	0.625/0.3151	5.06	0.0004751
rs2309452	Chr17:5746224	LOC339166	A/G	Intrónica	0.5263/0.1597	11.72	5.372e-05
rs1519252	Chr17:12531685	LINC00670	A/G/T	Intrónica	0.225/0.06164	13.07	0.000357
rs12604058	Chr17:55281177		T/G	Intrónica	0.45/0.1575	12.16	0.0001729
rs4789132	Chr17:73078501		G/C	Intergénica	0.025/0.363	0.01921	0.0003281
rs12104038	Chr18:54746218		C/A	Variante en región reguladora	0.125/0.4247	0.08479	0.0004083
rs4801081	Chr18:54763870		C/T	Intergénica	0.075/0.3562	0.01504	0.0002975
rs9947341	Chr18:57445592		G/A	Intergénica	0.5833/0.2466	5.125	0.0004641
rs425221	Chr19:44418544	ZNF45	A/G	Variante sinónima	0.1842/0.4589	0.1161	0.0004233
rs4815671	Chr20:4220340	ADRA1D	G/A	Intrónica	0.4/0.137	9.504	0.000142
rs16998735	Chr20:17079009		A/G	Intergénica	0.225/0.05479	13.48	0.0003869
rs6068048	Chr20:50654576		T/C	Intergénica	0.225/0.0411	14.84	0.0003389
rs2256452	Chr20:51632942	TSHZ2	C/T	Intrónica	0.5263/0.1986	5.112	0.0002343
rs2256551	Chr20:51633501	TSHZ2	A/G/T	Intrónica	0.5/0.1986	4.231	0.0004717
rs5904512	ChrX:22230756	PHEX PTCHD1-AS	A/G/T	Intrónica	0.4/0.05479	17.34	0.0002351
rs5904513	ChrX:22230794	PHEX PTCHD1-AS	A/G	Intrónica	0.4/0.05479	17.34	0.0002351
rs5951727	ChrX:22231458	PHEX PTCHD1-AS	G/C	Intrónica	0.4/0.06849	13.95	0.0003439
rs2301325	ChrX:22233245	PHEX PTCHD1-AS	T/C	Intrónica	0.4/0.05479	17.84	0.0002246
rs2285075	ChrX:22241468	PHEX PTCHD1-AS	G/A	Intrónica	0.40.04167	23.62	0.0001919
rs12841218	ChrX:22241971	PHEX PTCHD1-AS	T/A	Intrónica	0.4/0.05479	17.84	0.0002246
rs12216932	ChrX:22262846	PHEX PTCHD1-AS	A/G	Intrónica	0.3684/0.0411	23.11	0.0003177

Las SNV marcadas en rojo son a aquellas que se presentaron de manera común entre los perfiles individuales de ambos padecimientos.

11.3 TABLA 3

TABLA 3. Perfil total de CNV y ROH en pacientes con CO aislada

CNV	Locus	Región	Clasificación	Genes	CO	CTRL	Valor de P
Ganancia	1 p36.21	14,659,762-14,773,656	Incierto	<i>KASN-AS1</i>	10/19 (52.6%)	27/125 (21.6%)	0.006532
Ganancia	1 q12	40,307,597-40,307,789	Inicerto	<i>TRIT1</i>	1/19 (5.21%)	2/125 (1.6%)	0.01898
Ganancia	1 q21.1	75,295,646-75,310,947	Incierto		7/19 (36.84%)	21/125 (16.8%)	0.04648
Ganancia	2 p16.1	55,627,638-55,627,913	Inicerto	<i>CCDC88A</i>	17/19 (89.47%)	56/125 (44.8%)	0.0001980
Ganancia	2 q12.2	106,883,333-106,885,345	Inicerto		12/19 (63.15%)	27/125 (21.6%)	0.0004278
Ganancia	2 q36.1	223,021,855-223,034,146	Incierto		4/19 (21.05%)	7/125 (12%)	0.03963
Ganancia	3 p26.2	3,555,783-3,558,933	Incierto		8/19 (42.1%)	12/125 (9.6%)	0.001004
Ganancia	3 q11.2	96,754,312-96,780,633	Incierto	<i>EPHA6</i>	4/19 (21.05%)	7/125 (8%)	0.03963
Ganancia	3 q13.12	107,039,448-107,040,139	Incierto	<i>DUBR</i>	15/19 (78.94%)	36/125 (28.8%)	0.00004253
Ganancia	3 q28	189,372,362-189,376,655	Incierto	<i>TP63</i>	6/19 (31.5%)	5/125 (4%)	0.0007355
Ganancia	5 p14.3	20,520,248-20,545,637	Inicerto	<i>CDH18</i>	11/19 (47.36%)	37/125 (29.6%)	0.01667
Ganancia	6 q12	65,347,531-65,348,980	Inicerto	<i>EYS</i>	17/19 (89.47%)	51/125 (40.8%)	0.00005699
Ganancia	6 q21	107,446,539-107,446,845	Incierto		10/19 (52.6%)	35/125 (28%)	0.03212
Ganancia	7 q32.1	127,956,257-127,968,439	Incierto	<i>RMB28</i>	3/19 (15.78%)	4/125 (3.2%)	0.04878
Ganancia	8 p12	35,283,030-35,396,135	Patogénico	<i>UNC5D</i>	7/19 (36.8%)	20/125 (16%)	0.03808
Ganancia	9 q34.2	137,159,595-137,375,773	Patogénico	<i>RXRA</i>	12/19 (63.1%)	41/125 (32.8%)	0.01176
Ganancia	11 p14.3	24,812,583-24,815,906	Incierto	<i>LUZP2</i>	6/19 (31.57%)	15/125 (16%)	0.03590
Ganancia	11 p15.3	11,378,654-11,380,281	Inicerto	<i>GALNT18</i>	5/19 (26.31%)	5/125 (4%)	0.003918
Ganancia	11 p15.4	2,849,529-2,969,258	Patogénico	<i>KCNQ1</i>	9/19 (47.3%)	32/125 (25.6%)	0.01054
Ganancia	11 q13.5	75,451,410-75,475,650	Incierto	<i>LOC283214</i>	9/19 (47.3%)	24/125 (19.2%)	0.04958
Ganancia	11 q14.3	89,089,094-89,096,757	Inicerto	<i>NOX4</i>	10/19 (52.6%)	27/125 (21.6%)	0.006532
Ganancia	11 q23.2	112,565,533-112,686,856	Patogénico		7/19 (36.8%)	11/125 (8.8%)	0.002965
Ganancia	12 p12.1	26,140,636-26,153,881	Inicerto	<i>RASSF8</i>	11/19 (57.89%)	26/125 (20.8%)	0.001379
Ganancia	12 p13.31	9,734,956-9,740,334	Inicerto		10/19 (52.6%)	29/125 (23.3%)	0.01024
Ganancia	13 q14.2	50,022,049-50,048,580	Incierto	<i>SETDB2</i>	10/19 (52.6%)	8/125 (6.4%)	0.000003145

Ganancia	13 q31.31	85,124,594-85,127,305	Incierto	<i>LINC00333</i>	17/19 (89.47%)	59/125 (47.2%)	0.0003960
Ganancia	18 q12.3	38,260,407-38,265,377	Incierto		15/19 (78.94%)	52/125 (41.6%)	0.002314
Ganancia	19 q13.2	39,249,058-39,258,110	Incierto		12/19 (63.15%)	38/125 (30.4%)	0.006563
Ganancia	21 q11.2	14,882,490-15,088,037	Incierto	<i>POTED</i>	11/19 (57.8%)	39/125 (31.2%)	0.02372
Ganancia	21 q21.1	22,066,074-22,078,587	Incierto		10/19 (52.6%)	31/125 (24.8%)	0.01547
Ganancia	22 q11.21	18,046,540-18,047,058	Incierto	<i>SLC25A18</i>	10/19 (42.1%)	33/125 (26.4%)	0.02263
Ganancia	22 q11.22	22,382,095-22,386,434	Incierto	<i>PRAMENP</i>	16/19 (84.21%)	62/125 (49.6%)	0.003863
Ganancia	X p22.32	4,515,814-4,518,734	Incierto		9/19 (47.36%)	9/125 (7.2%)	0.00004180
Ganancia	X q12	65,247,408-65,249,646	Incierto	<i>VSIG4</i>	5/19 (15.78%)	8/125 (6.4%)	0.01530
Ganancia	X q21.2	85,614,601-85,614,817	Incierto	<i>DACH2</i>	3/19 (15.78%)	4/125 (3.2%)	0.04878
Ganancia	X q27.3	144,005,084-144,005,140	Incierto		5/19 (26.31%)	11/125 (12.8%)	0.03960
Ganancia	X q28	154,963,438-154,964,077	Incierto	<i>SPRY3</i>	12/19 (63.15%)	39/125 (31.2%)	
Ganancia	Y p11.2	9,897,528-10,076,230	Patogénico		7/19 (36.8%)	16/125 (12.8%)	0.01491
Ganancia	Y q11.221	15,227,839-15,230,545	Incierto		6/19 (31.57%)	15/125 (16.8%)	0.03590
Ganancia	Y q11.23	28,289,805-28,289,806	Incierto		5/19 (10.52%)	8/125 (6.4%)	0.01530
Pérdida	1 p36.12	22,038,986-22,068,259	Incierto	<i>USP48</i>	13/19 (52.63%)	17/125 (9.6%)	0.000001410
Pérdida	1 q24.2	167,804,080-167,825,769	Incierto	<i>ADCY10</i>	1/19 (5.26%)	0/125 (0%)	NA
Pérdida	2p13.1	73,990,193-74,080,901	Incierto	<i>DUSP11</i>	10/19 (52.63%)	17/125 (13.6%)	0.0003280
Pérdida	2q14.3	124,054,876-124,065,235	Incierto		10/19 (52.63%)	26/125 (20.8%)	0.005139
Pérdida	2q23.3	151,447,062-151,465,458	Incierto		7/19 (36.84%)	20/125 (16%)	<0.0000001
Pérdida	4 q12	55,548,545-55,549,785	Incierto	<i>KIT</i>	1/19 (5.26%)	0/125 (0%)	NA
Pérdida	4 q23	100,735,147-100,746,076	Incierto	<i>DAPP1</i>	1/19 (5.26%)	0/125 (0%)	NA
Pérdida	5 p13.3	29,911,594-29,912,034	Incierto		18/19 (94.73%)	73/125 (58.4%)	0.001108
Pérdida	5 p15.31	7,509,854-7,512,421	Incierto	<i>ADCY2</i>	6/19 (21.05%)	12/125 (9.6%)	0.01604
Pérdida	5 q33.1	150,790,565-150,793,379	Incierto		8/19 (42.1%)	26/125 (20.8%)	0.04517
Pérdida	6 p21.1	45,275,580-45,315,206	Incierto	<i>SUPT3H</i>	8/19 (42.1%)	15/125 (12%)	0.003068
Pérdida	6 q23.1	130,533,903-130,543,141	Patogénico	<i>SMAD3</i>	1/19 (5.26%)	0/125 (0%)	NA
Pérdida	7 p12.1	51,909,933-51,918,346	Incierto		6/19 (26.31%)	14/125 (11.2%)	0.02804
Pérdida	7 p14.1	40,593,099-40,593,100	Incierto	<i>SUGCT</i>	9/19 (47.36%)	32/125 (27.2%)	0.04958
Pérdida	7 p21.3	9,791,391-9,796,133	Incierto		14/19 (73.68%)	49/125 (39.2%)	0.004934

Pérdida	7 q34	142,476,751-142,486,033	Incierto	<i>TCRVB</i>	10/19 (52.6%)	30/125 (24%)	0.01264
Pérdida	8 p23.3	1,561,755-1,561,943	Incierto	<i>DLGAP2</i>	12/19 (63.15%)	41/125 (32.8%)	0.01176
Pérdida	8 q21.3	91,020,412-91,029,146	Incierto	<i>DECR1</i>	1/19 (5.26%)	0/125 (0%)	NA
Pérdida	9 p24.1	5,037,440-5,037,450	Incierto	<i>JAK2</i>	10/19 (52.6%)	24/125 (19.2%)	0.003077
Pérdida	11 q24.3	128,354,262-128,354,701	Incierto	<i>ETS1</i>	3/19 (15.7%)	2/125 (4%)	0.01664
Pérdida	13 q13.1	32,894,943-32,895,466	Patogénico	<i>BRCA2*</i>	3/19 (15.78%)	4/125 (3.2%)	0.04878
Pérdida	15 q22.31	65,735,850-65,742,255	Incierto	<i>DPP8</i>	6/19 (31.57%)	7/125 (5.6%)	0.002299
Pérdida	15 q24.1	74,865,408-74,865,454	Incierto	<i>ARID3B</i>	3/19 (15.78%)	4/125 (3.2%)	0.04878
Pérdida	16 q21	57,850,805-57,907,095	Incierto	<i>KIFC3</i>	3/19 (15.78%)	0/125 (0%)	NA
Pérdida	16 q23.1	78,768,495-78,768,496	Incierto	<i>WWOX</i>	10/19 (52.6%)	29/125 (23.2%)	0.01024
Pérdida	16 q24.2	88,100,320-88,115,379	Incierto	<i>BANP</i>	4/19 (21.0%)	1/125 (0.8%)	0.001031
Pérdida	17 q12	37,516,990-37,625,611	Incierto	<i>MED1</i>	10/19 (52.6%)	6/125 (4.8%)	0.000000656
Pérdida	17 q21.2	38,477,258-38,486,009	Patogénico	<i>RARA*</i>	1/19 (5.26%)	0/125 (%)	NA
Pérdida	17 q21.2	38,543,383-38,570,452	Patogénico	<i>RARA*</i> <i>TOP2A*</i>	3/19 (15.7%)	3/125 (2.4%)	0.03046
Pérdida	17 q23.2	59,904,467-59,931,223	Incierto	<i>BRIP1</i>	3/19 (15.78%)	1/125 (0.8%)	0.007276
Pérdida	18 p11.32	766,118-800,102	Incierto	<i>YES1</i>	7/19 (36.84%)	18/125 (14.4%)	0.02457
Pérdida	18 q21.2	48,579,560-48,582,047	Patogénico	<i>SMAD4*</i>	2/19 (10.52%)	0/125 (%)	NA
Pérdida	19 p13.11	19,611,549-19,639,345	Incierto	<i>TSSK6</i>	8/19 (42.1%)	25/125 (27.2%)	0.03765
Pérdida	20 q13.12	45,785,020-45,785,021	Incierto	<i>EYA2</i>	6/19 (31.57%)	4/125 (3.2%)	0.0003643
Pérdida	X p21.2	30,922,976-30,926,353	Incierto	<i>TAB3</i>	6/19 (21.05%)	14/125 (11.2%)	0.02804
ROH	1p32.2	56,881,762-57,243,086	Incierto	<i>PLPP3</i>	2/19 (10.52%)	0/125 (%)	NA
ROH	1p36.32	3,545,611-4,552,059	Incierto	<i>TP73</i>	1/19 (5.26%)	0/125 (%)	NA
ROH	1q32.2	210,990,536-211,830,735	Incierto	<i>KCNH1</i>	3/19 (15.78%)	1/125 (0.8%)	0.007276
ROH	3p12.2	83,451,854-83,704,320	Incierto		11/19 (57.89%)	11/125 (8.8%)	0.000002990
ROH	3q25.2	153,677,862-154,648,728	Incierto	<i>ARHGFE26</i> <i>DHX36</i>	7/19 (36.84%)	21/125 (16.8%)	0.04648
ROH	4q25	114,022,991-115,109,365	Patogénico	<i>ANK2*</i>	4/19 (21.05%)	2/125 (1.6%)	0.002829
ROH	4q28.1	128,002,347-128,165,499	Incierto		8/19 (42.1%)	10/125 (8%)	0.0004086
ROH	4q31.3	151,775,258-152,727,299	Patogénico	<i>LRBA*</i>	9/19 (47.36%)	8/125 (6.4%)	0.00002247
ROH	4q32.3	169,835,323-170,688,979	Patogénico	<i>NEK1*</i>	9/19 (47.36%)	14/125 (11.2%)	0.0004854

ROH	5p14.2	24,572,260-25,027,618	Incierto	<i>CDH10</i>	4/19 (21.05%)	4/125 (3.2%)	0.01102
ROH	7q31.2	115,952,824-116,631,013	Incierto	<i>MET U7</i>	4/19 (21.05%)	3/125 (2.4%)	0.006032
ROH	8 q24.11	119,068,090-119,179,689	Patogénico	<i>EXT1*</i>	1/19 (5.26%)	0/125 (%)	NA
ROH	9 p13.2	37,982,915-38,121,338	Incierto	<i>SHB</i>	2/19 (10.52%)	1/125 (0.8%)	0.04585
ROH	10 q26.11	120,959,449-120,976,553	Incierto	<i>GRK5</i>	2/19 (10.52%)	0/125 (%)	NA
ROH	11q14.1	83,388,140-84,029,748	Patogénico	<i>DLG2*</i>	6/19 (31.57%)	7/125 (5.6%)	0.002299
ROH	11q14.3	90,677,890-91,169,922	Incierto	<i>OSBPL9P2</i>	7/19 (36.84%)	10/125 (8%)	0.001971
ROH	11p14.3	25,160,035-26,045,454	Incierto	LOC100130747	4/19 (21.05%)	3/125 (2.4%)	0.006032
ROH	12p13.31	8,896,713-9,937,037	Patogénico	<i>PHC1*</i>	1/19 (5.26%)	0/125 (%)	NA
ROH	12q14.1	62,611,259-63,063,296	Incierto	<i>USP15 miR6125 LINC01465</i>	3/19 (15.78%)	2/125 (1.6%)	0.01664
ROH	14q31.3	87,140,301-87,488,261	Incierto	<i>LINC01148</i>	7/19 (36.84%)	5/125 (4%)	0.0001722
ROH	15q15.3	43,637,984-44,193,673	Patogénico	<i>PPIP5K1* STRC* CATSPER2*</i>	5/19 (26.31%)	0/125 (%)	NA
ROH	15q14	39,823,057-40,387,971	Incierto	<i>THSB1</i>	5/19 (26.31%)	8/125 (6.4%)	0.01530
ROH	16 q11.2	46,534,976-47,897,047	Patogénico	<i>ORC6* PHKB*</i>	9/19 (47.36%)	11/125 (8.8%)	0.0001247
ROH	17q11.1	25,313,689-27,047,489	Incierto	<i>NOS2 LYRM9 TMEM97</i>	1/19 (5.26%)	0/125 (%)	NA
ROH	18p11.22	10,833,649-12,016,989	Incierto	<i>miR7153 LINC01928</i>	1/19 (5.26%)	0/125 (%)	NA
ROH	18q21.33	61,448,702-62,552,860	Patogénico	<i>SERPINB7*</i>	3/19 (15.78%)	3/125 (2.4%)	0.03046
ROH	19p12	23,246,399-24,521,623	Incierto	<i>ZNF681 LINC01224</i>	8/19 (42.1%)	23/125 (18.4%)	0.02539
ROH	21 q22.12	36,351,904-37,929,312	Patogénico	<i>CLDN14*</i>	2/19 (10.52%)	1/125 (0.8%)	0.04585
ROH	Yq11.21	13,887,940-19,563,894	Incierto	<i>TTY15 USP9Y</i>	2/19 (10.52%)	62/125 (49.6%)	0.0009428

*Genes que presentaron sensibilidad a dosis, NA= No aplica, Las CNV marcadas en rojo son a aquellas que se presentaron de manera común entre los perfiles individuales de ambos padecimientos.

11.4 TABLA 4

TABLA 4. Perfil total de CNV y ROH en pacientes con TGCT

CNV	Locus	Región	Clasificación	Genes	TGCT	CTRL	Valor de P
Ganancia	1 p36.21	14,659,762-14,773,656	Incierto	<i>KASN-AS1</i>	16/22 (72.7%)	27/125 (21.6%)	0.000005440
Ganancia	1 p31.1	72,756,100-72,763,358	Incierto		18/22 (81.8%)	43/125 (34.4%)	0.00003816
Ganancia	1 p34.3	36,415,501-36,469,132	Incierto	<i>AGO3</i>	9/22 (41%)	19/125 (15.2%)	0.008456
Ganancia	1 p35.2	31,623,654-31,625,334	Incierto		7/22 (31.8%)	13/125 (10.4%)	0.01392
Ganancia	1 p36.31	6,203,501-6,207,217	Incierto	<i>CHD5</i>	6/22 (27.2%)	4/125 (3.2%)	0.0008213
Ganancia	1 q42.12	225,259,023-225,275,824	Incierto	<i>DNAH14</i>	10/22 (45.4%)	10/125 (8%)	0.00005359
Ganancia	3 p13	72,501,993-72,514,222	Incierto		6/22 (27.2%)	13/125 (10.4%)	0.04107
Ganancia	3 p14.3	56,087,634-56,087,635	Incierto	<i>ERC2</i>	8/22 (36.36%)	18/125 (14.4%)	0.01914
Ganancia	3 p21.1	53,028,374-53,032,013	Incierto	<i>SFMBT1</i>	12/22 (54.5%)	23/125 (18.4%)	0.0006930
Ganancia	3 p22.1	42,376,105-42,388,026	Incierto		6/22 (27.2%)	4/125 (3.2%)	0.0008213
Ganancia	3 q28	189,372,362-189,376,655	Incierto	<i>TP63</i>	4/22 (18.2%)	5/125 (4%)	0.02901
Ganancia	5 p12	44,007,016-44,007,017	Incierto		10/22 (45.4%)	3/125 (2.4%)	0.000000152
Ganancia	5 p13.1	42,022,512-42,030,952	Incierto		9/22 (41%)	10/125 (8%)	0.0007085
Ganancia	5 p13.2	34,701,064-34,701,177	Incierto	<i>RAI14</i>	6/22 (27.2%)	8/125 (6.4%)	0.007730
Ganancia	8 p12	35,283,030-35,396,135	Patogénico	<i>UNC5D</i>	15/22 (68.1%)	20/125 (16%)	0.000001568
Ganancia	9 q34.2	137,159,595-137,375,773	Patogénico	<i>RXRA</i>	14/22 (63.6%)	41/125 (32.8%)	0.006548
Ganancia	11 p15.4	2,849,529-2,969,258	Patogénico	<i>KCNQ1</i>	15/22 (68.1%)	32/125 (25.6%)	0.0009565
Ganancia	11 q13.5	75,451,410-75,475,650	Incierto	<i>LOC283214</i>	12/22 (54.5%)	24/125 (19.2%)	0.0001721
Ganancia	11 q23.2	112,565,533-112,686,856	Patogénico		12/22 (54.5%)	11/125 (8.8%)	0.000002913
Ganancia	12 p13.2	11,222,367-11,241,520	Incierto	<i>PRB4</i>	12/22 (54.5%)	38/125 (30.4%)	0.02700
Ganancia	12 q11	37,959,631-37,966,421	Incierto		2/22 (9.09%)	1/125 (0.8%)	0.05864
Ganancia	12 q24.32	127,373,662-127,373,727	Incierto		12/22 (54.5%)	38/125 (30.4%)	0.02700
Ganancia	13 q13.2	34,346,394-34,351,352	Incierto		12/22 (54.5%)	17/125 (13.6%)	0.00007014
Ganancia	13 q14.2	50,022,049-50,048,580	Incierto	<i>SETDB2</i>	18/22 (81.8%)	8/125 (6.4%)	0.0000001
Ganancia	16 q13	57,008,507-57,017,319	Incierto	<i>CETP</i>	4/22 (18.2%)	5/125 (4%)	0.02901
Ganancia	16 q23.3	82,303,211-82,303,777	Incierto		9/22 (41%)	20/125 (16%)	0.01111

Ganancia	18 p11.31	4,979,611-4,980,165	Incierto		18/22 (81.8%)	48/125 (38.4%)	0.0001594
Ganancia	18 q11.2	21,136,062-21,165,080	Incierto	<i>NPC1</i>	15/22 (68.2%)	19/125 (15.2%)	0.000000951
Ganancia	20 q11.21	29,969,172-30,016,443	Inicerto	<i>DEFB121</i>	2/22 (9.09%)	1/125 (1.6%)	0.04900
Ganancia	20 q13.2	51,178,571-51,180,497	Incierto		11/22 (50%)	18/125 (14.4%)	0.0004757
Ganancia	21 q11.2	14,882,490-15,088,037	Incierto	<i>POTED</i>	14/22 (63.6%)	39/125 (31.2%)	0.004235
Ganancia	Y p11.2	9,897,528-10,076,230	Patogénico		12/22 (54.5%)	16/125 (12.8%)	0.00004450
Pérdida	1 p21.3	98,774,882-98,783,869	Incierto		6/22 (27.2%)	8/125 (6.4%)	0.007730
Pérdida	1 q24.2	167,804,080-167,825,769	Incierto	<i>ADCY10</i>	1/22 (4.54%)	0/125 (0%)	NA
Pérdida	2 p11.2	90,242,075-90,248,512	Incierto		10/22 (45.4%)	19/125 (15.2%)	0.002569
Pérdida	2 p16.2	54,711,524-54,726,485	Incierto	<i>SPTBN1</i>	7/22 (31.8%)	7/125 (5.6%)	0.001143
Pérdida	2 p16.3	49,660,620-49,660,861	Incierto	<i>SPTBN1</i>	20/22 (90.1%)	58/125	0.00006171
Pérdida	2 q12.3	109,740,385-109,749,172	Incierto	<i>SH3RF3</i>	6/22 (27.2%)	4/125 (3.2%)	0.0008213
Pérdida	4 q12	55,548,545-55,549,785	Incierto	<i>KIT</i>	1/22 (4.54%)	0/125 (0%)	NA
Pérdida	6 p12.1	53,931,217-53,931,843	Incierto	<i>MLIP</i>	12/22 (54.5%)	25/125 (20%)	0.001302
Pérdida	6 p21.2	39,804,150-39,810,514	Incierto	<i>DAAM2</i>	9/22 (41%)	23/125 (18.4%)	0.02303
Pérdida	6 p24.1	11,768,931-11,774,626	Incierto	<i>ADTRP</i>	10/22 (45.4%)	12/125 (9.6%)	0.0001571
Pérdida	6 q13	75,358,609-75,367,182	Incierto	LOC101928516	12/22 (54.5%)	32/125 (25.6%)	0.008091
Pérdida	6 q23.1	130,533,903-130,543,141	Patogénico	<i>SMAD3</i>	2/22 (9.09%)	0/125 (0%)	NA
Pérdida	7 p21.2	16,172,246-16,172,247	Incierto	<i>ISPD</i>	11/22 (50%)	18/125 (14.4%)	0.0004757
Pérdida	7 q11.23	75,438,762-75,438,768	Incierto		7/22 (31.8%)	7/125 (5.6%)	0.001143
Pérdida	8 p21.2	25,743,391-25,752,497	Incierto	<i>EBF2</i>	11/22 (50%)	27/125 (21.6%)	0.007405
Pérdida	8 q21.3	91,020,412-91,029,146	Incierto	<i>DECR1</i>	1/22 (4.54%)	0/125 (0%)	NA
Pérdida	8 q23.1	108,935,801-108,940,648	Incierto	<i>RSPO2</i>	9/22 (41%)	23/125 (18.4%)	0.02303
Pérdida	10 p11.21	36,666,412-36,680,486	Incierto		2/22 (9.09%)	1/125 (0.8%)	0.05864
Pérdida	10 q21.2	61,238,486-61,238,487	Incierto		5/22 (22.72%)	8/125 (6.4%)	0.02716
Pérdida	10 q26.3	132,304,194-132,306,849	Inicerto		13/22 (59.1%)	26/125 (20.8%)	0.0004638
Pérdida	11 p12	41,123,586-41,123,587	Inicerto	<i>LRRC4C</i>	10/22 (45.4%)	23/125 (18.4%)	0.008136
Pérdida	11 q23.2	112,599,719-112,601,928	Incierto		2/22 (9.09%)	1/125 (0.8%)	0.05864
Pérdida	13 q13.1	32,894,943-32,895,466	Patogénico	BRCA2*	4/22 (18.18%)	4/125 (3.2%)	0.01793
Pérdida	16 p12.1	24,495,196-24,495,315	Inicerto		8/22 (36.36%)	16/125 (12.8%)	0.01106

Pérdida	16 q22.1	68,759,220-68,778,176	Incierto	<i>CDH1</i>	8/22 (36.36%)	0/125 (0%)	NA
Pérdida	16 q23.1	78,768,495-78,768,496	Incierto	<i>WWOX</i>	10/22 (45.4%)	29/125 (23.2%)	0.03112
Pérdida	16 q24.2	88,100,320-88,115,379	Incierto	<i>BANP</i>	6/22 (27.2%)	1/125 (0.8%)	0.00003731
Pérdida	17 q12	37,516,990-37,625,611	Incierto	<i>MED1</i>	14/22 (63.6%)	6/125 (4.8%)	0.0000001
Pérdida	17 q21.2	38,477,258-38,486,009	Patogénico	<i>RARA*</i>	4/22 (18.18%)	0/125 (%)	NA
Pérdida	17 q21.2	38,543,383-38,570,452	Patogénico	<i>RARA*</i> <i>TOP2A*</i>	4/22 (18.18%)	3/125 (2.4%)	0.009969
Pérdida	17 q21.2	40,529,157-40,539,248	Incierto	<i>STAT3</i>	4/22 (18.18%)	1/125 (0.8%)	0.001762
Pérdida	17 q23.2	59,904,467-59,931,223	Incierto	<i>BRIP1</i>	2/22 (9.09%)	1/125 (0.8%)	0.05864
Pérdida	18 p11.32	766,118-800,102	Incierto	<i>YES1</i>	17/22 (77.2%)	18/125 (14.4%)	0.0000001
Pérdida	18 q21.2	48,579,560-48,582,047	Patogénico	<i>SMAD4*</i>	5/22 (22.72%)	0/125 (%)	NA
Pérdida	18 p11.21	10,924,183-10,928,707	Inicerto	<i>PIEZO2</i>	14/22 (63.6%)	43/125 (34.4%)	0.009854
Pérdida	20 q11.21	29,969,172-30,016,443	Inicerto	<i>DEFB121</i>	4/22 (18.18%)	3/125 (2.4%)	0.009969
Pérdida	20 q13.12	45,785,020-45,785,021	Incierto	<i>EYA2</i>	7/22 (31.81%)	4/125 (3.2%)	0.0001487
Pérdida	20 q13.13	46,979,250-46,979,251	Inicerto		8/22 (36.36%)	10/125 (8%)	0.001201
Pérdida	20 q13.2	51,178,571-51,180,497	Inicerto		11/22 (50%)	18/125 (14.4%)	0.0004757
Pérdida	22 q13.32	49,128,793-49,130,806	Inicerto	<i>FAM19A5</i>	10/22 (45.4%)	10/125 (8%)	0.00005359
ROH	1p32.3	51,885,147-52,263,882	Incierto	<i>U6</i>	11/22 (50%)	15/125 (12%)	0.0001374
ROH	1p13.3	109,521,316-110,304,777	Patogénico	<i>TAF13*</i>	5/22 (22.72%)	9/125 (7.2%)	0.03796
ROH	5p13.2	36,653,454-37,585,849	Patogénico	<i>NIPBL*</i> <i>C5orf42*</i>	8/22 (36.36%)	19/125 (15.2%)	0.02454
ROH	5q21.3	109,185,775-109,364,250	Incierto	<i>MAN2A1</i> <i>LINC01848</i>	5/22 (22.72%)	7/125 (5.6%)	0.01860
ROH	5q31.1	133,420,642-134,445,495	Incierto	<i>UBE2B</i> <i>mir4461</i> <i>CATSPER3</i> <i>LOC100996485</i> <i>LOC102546229</i>	4/22 (18.18%)	3/125 (2.4%)	0.009969
ROH	6q15	88,922,784-89,950,913	Incierto	<i>LOC101928936</i>	3/22 (13.63%)	2/125 (1.6%)	0.02411
ROH	8 q24.11	119,068,090-119,179,689	Patogénico	<i>EXT1*</i>	1/22 (4.54%)	0/125 (%)	NA
ROH	9 p13.2	37,982,915-38,121,338	Incierto	<i>SHB</i>	2/22 (9.09%)	1/125 (0.8%)	0.05864
ROH	9q21.33	89,450,375-91,530,248	Incierto	<i>SPATA31E1</i> <i>SPATA31C1</i> <i>CDK20</i> <i>SPATA31C2</i>	1/22 (4.54%)	0/125 (%)	NA
ROH	9q33.1	120,992,875-121,301,720	Incierto		2/22 (9.09%)	0/125 (%)	NA
ROH	10 q26.11	120,959,449-120,976,553	Incierto	<i>GRK5</i>	2/22 (9.09%)	0/125 (%)	NA

ROH	12 p13.31	8,896,713-9,937,037	Patogénico	<i>PHC1*</i>	2/22 (9.09%)	0/125 (%)	NA
ROH	12q13.11	46,798,899-47,523,982	Incierto	<i>AMIGO2</i> <i>LOC100288798</i>	6/22 (27.27%)	5/125 (4%)	0.001628
ROH	16 q11.2	46,534,976-47,897,047	Patogénico	<i>ORC6*</i> <i>PHKB*</i>	8/22 (36.36%)	11/125 (8.8%)	0.001879
ROH	17p13.1	10,241,564-11,242,328	Incierto	<i>MYH1</i> <i>SCO1</i> <i>SHISA6</i>	2/22 (9.09%)	0/125 (3.2%)	NA

*Genes que presentaron sensibilidad a dosis, NA= No aplica, Las CNV marcadas en rojo son a aquellas que se presentaron de manera común entre los perfiles individuales de ambos padecimientos.

11.5 TABLA 5

Tabla 5. Perfil de todas las CNV y ROH en común entre CO aislada y TGCT

CNV	Locus	Región	Clasificación	Genes	CO	TGCT	CTRL
Ganancia	1 p36.21	14,659,762-14,773,656	Incierto	<i>KASN-AS1</i>	10/19 (52.6%)	16/22 (72.7%)	27/125 (21.6%)
Ganancia	3 q28	189,372,362-189,376,655	Incierto	<i>TP63</i>	6/19 (31.5%)	4/22 (18.2%)	5/125 (4%)
Ganancia	8 p12	35,283,030-35,396,135	Patogénico	<i>UNC5D</i>	7/19 (36.8%)	15/22 (68.1%)	20/125 (16%)
Ganancia	9 q34.2	137,159,595-137,375,773	Patogénico	<i>RXRA</i>	12/19 (63.1%)	14/22 (63.6%)	41/125 (32.8%)
Ganancia	11 p15.4	2,849,529-2,969,258	Patogénico	<i>KCNQ1</i>	9/19 (47.3%)	15/22 (68.1%)	32/125 (25.6%)
Ganancia	11 q13.5	75,451,410-75,475,650	Incierto	<i>LOC283214</i>	9/19 (47.3%)	12/22 (54.5%)	24/125 (19.2%)
Ganancia	11 q23.2	112,565,533-112,686,856	Patogénico		7/19 (36.8%)	12/22 (54.5%)	11/125 (8.8%)
Ganancia	13 q14.2	50,022,049-50,048,580	Incierto	<i>SETDB2</i>	10/19 (52.6%)	18/22 (81.8%)	8/125 (6.4%)
Ganancia	21 q11.2	14,882,490-15,088,037	Incierto	<i>POTED</i>	11/19 (57.8%)	14/22 (63.6%)	39/125 (31.2%)
Ganancia	Y p11.2	9,897,528-10,076,230	Patogénico		7/19 (36.8%)	12/22 (54.5%)	16/125 (12.8%)
Pérdida	1 q24.2	167,804,080-167,825,769	Incierto	<i>ADCY10</i>	1/19 (5.26%)	1/22 (4.54%)	0/125 (0%)
Pérdida	4 q12	55,548,545-55,549,785	Incierto	<i>KIT</i>	1/19 (5.26%)	1/22 (4.54%)	0/125 (0%)
Pérdida	6 q23.1	130,533,903-130,543,141	Patogénico	<i>SMAD3</i>	1/19 (5.26%)	2/22 (9.09%)	0/125 (0%)
Pérdida	8 q21.3	91,020,412-91,029,146	Incierto	<i>DECR1</i>	1/19 (5.26%)	1/22 (4.54%)	0/125 (0%)
Pérdida	13 q13.1	32,894,943-32,895,466	Patogénico	<i>BRCA2*</i>	3/19 (15.78%)	4/22 (18.18%)	4/125 (3.2%)
Pérdida	16 q23.1	78,768,495-78,768,496	Incierto	<i>WWOX</i>	10/19 (52.6%)	10/22 (45.4%)	29/125 (23.2%)
Pérdida	16 q24.2	88,100,320-88,115,379	Incierto	<i>BANP</i>	4/19 (21.0%)	6/22 (27.2%)	1/125 (0.8%)
Pérdida	17 q12	37,516,990-37,625,611	Incierto	<i>MED1</i>	10/19 (52.6%)	14/22 (63.6%)	6/125 (4.8%)
Pérdida	17 q21.2	38,477,258-38,486,009	Patogénico	<i>RARA*</i>	1/19 (5.26%)	4/22 (18.18%)	0/125 (%)
Pérdida	17 q21.2	38,543,383-38,570,452	Patogénico	<i>RARA*</i> <i>TOP2A*</i>	3/19 (15.7%)	4/22 (18.18%)	3/125 (2.4%)
Pérdida	17 q23.2	59,904,467-59,931,223	Incierto	<i>BRIP1</i>	3/19 (15.78%)	2/22 (9.09%)	1/125 (0.8%)
Pérdida	18 p11.32	766,118-800,102	Incierto	<i>YES1</i>	7/19 (36.84%)	17/22 (77.2%)	18/125 (14.4%)
Pérdida	18 q21.2	48,579,560-48,582,047	Patogénico	<i>SMAD4*</i>	2/19 (10.52%)	5/22 (22.72%)	0/125 (%)
Pérdida	20 q13.12	45,785,020-45,785,021	Incierto	<i>EYA2</i>	6/19 (31.57%)	7/22 (31.81%)	4/125 (3.2%)
ROH	8 q24.11	119,068,090-119,179,689	Patogénico	<i>EXT1*</i>	1/19 (5.26%)	1/22 (4.54%)	0/125 (%)

ROH	9 p13.2	37,982,915-38,121,338	Incierto	<i>SHB</i>	2/19 (10.52%)	2/22 (9.09%)	1/125 (0.8%)
ROH	10 q26.11	120,959,449-120,976,553	Incierto	<i>GRK5</i>	2/19 (10.52%)	2/22 (9.09%)	0/125 (%)
ROH	12p13.31	8,896,713-9,937,037	Patogénico	<i>PHC1*</i>	1/19 (5.26%)	2/22 (9.09%)	0/125 (%)
ROH	16 q11.2	46,534,976-47,897,047	Patogénico	<i>ORC6*</i> <i>PHKB*</i>	9/19 (47.36%)	8/22 (36.36%)	11/125 (8.8%)

*Genes que presentaron sensibilidad a dosis, Las CNV marcadas en rojo son a aquellas que se seleccionaron para discutir en este trabajo de tesis.



Cryptorchidism and Testicular Tumor: Comprehensive Analysis of Common Clinical Features and Search of SNVs in the *KIT* and *AR* Genes

Daniel Adrian Landero-Huerta^{1,2}, Rosa María Viguera-Villaseñor^{1*}, Emiy Yokoyama-Rebollar³, Fabiola García-Andrade¹, Julio César Rojas-Castañeda¹, Luis Alonso Herrera-Montalvo^{4,5}, José Díaz-Chávez⁶, Isidro Xavier Pérez-Añorve², Elena Aréchaga-Ocampo⁷ and Margarita Dolores Chávez-Saldaña^{1*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Isabel R. Schlaepfer,
School of Medicine, University
of Colorado, United States

Reviewed by:

Erika Di Zazzo,
University of Molise, Italy
Caterina Squillacioti,
University of Naples Federico II, Italy

*Correspondence:

Rosa María Viguera-Villaseñor
mviguera@yahoo.com.mx
Margarita Dolores Chávez-Saldaña
mdoloreschs@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Molecular and Cellular Oncology,
a section of the journal
Frontiers in Cell and Developmental
Biology

Received: 28 April 2020

Accepted: 21 July 2020

Published: 07 August 2020

Citation:

Landero-Huerta DA,
Viguera-Villaseñor RM,
Yokoyama-Rebollar E,
García-Andrade F,
Rojas-Castañeda JC,
Herrera-Montalvo LA, Díaz-Chávez J,
Pérez-Añorve IX,
Aréchaga-Ocampo E and
Chávez-Saldaña MD (2020)

Cryptorchidism and Testicular Tumor:
Comprehensive Analysis of Common
Clinical Features and Search of SNVs
in the *KIT* and *AR* Genes.
Front. Cell Dev. Biol. 8:762.
doi: 10.3389/fcell.2020.00762

¹Laboratorio de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Pediatría, Mexico City, Mexico, ²Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería, Unidad Cuajimalpa, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico City, Mexico, ³Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Pediatría, Mexico City, Mexico, ⁴Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología-Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, ⁵Instituto Nacional de Medicina Genómica, Mexico City, Mexico, ⁶Instituto Nacional de Cancerología, Mexico City, Mexico, ⁷Departamento de Ciencias Naturales, Unidad Cuajimalpa, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico City, Mexico

Allelic variants in genes implicated in the development of testicular germ cell tumor (TGCT) could be present in patients with cryptorchidism (CO). Currently; the mechanisms explaining this relationship are still unknown. In this study the common clinical features in patients with CO and TGCT and 6 variants of *KIT* and *AR* genes associated to TGCT were analyzed. Population analyzed included 328 individuals: 91 patients with CO; 79 with TGCT, 13 of them with previous CO diagnosis, and 158 healthy males. Of the 13 patients with TGCT and history of CO, one patient (7.7%) presented the heterozygous form of the variant rs121913507 and two patients (15.4%) presented homozygote genotype for the variant rs121913506 in *KIT* gene. Interestingly, the heterozygous form for the variant rs121913506 of *KIT* gene was identifying in all of 13 patients. The rs201934623, rs774171864, and rs12014709 variants of the *AR* gene did not show any clinical association. Our results strongly support that genetic component in CO could be conditioning for the development of TGCT. Notably, *KIT* gene variants might be determinants in the pathological association between TGCT and CO.

Keywords: SNVs, *KIT*, *AR*, isolated cryptorchidism, testicular germ cell tumor

INTRODUCTION

Cryptorchidism (CO) or undescended testis (OMIM#219050), is the most common genitourinary malformation in newborn males. Many reports indicate that boys with CO have an overall relative risk (RR) of 4.8 (95% confidence interval 4.0–5.7) of develop testicular germ cell tumors (TGCT, OMIM#273300; Dieckmann and Pichlmeier, 2004; Kratz et al., 2010), which is the most frequent solid tumor in men between 15 and 44 years of age. TGCT is classified generally as seminoma

(sTGCT) and non-seminoma (nsTGCT; Kratz et al., 2010). Although the association of CO and TGCT has been clinically established, the mechanisms leading to carcinogenesis are still unknown (Ferguson and Agoulnik, 2013). Due to the presence of common genetic factors in the etiology of both pathologies, it is possible to infer the existence of a molecular genetic relationship between CO and the development of TGCT (Viguera-Villaseñor et al., 2015).

Studies that have been focused on searching diagnostic markers for TGCT proposed several single nucleotide variants (SNVs) in genes such as *POU5F1*, *DND1*, *KIT*, *KITLG*, *AR*, *DMTR1*, *SPRY4*, *BCL2*, *NANOG*, *TGFBR2*, *PTEN*, *AKT1*, *PDE11A*, *GATA4*, and *THOC1* (Dalgaard et al., 2011; Turnbull and Rahman, 2011; Landero-Huerta et al., 2017; Litchfield et al., 2017). Proto-oncogene tyrosine kinase receptor (*KIT*) and the androgen receptor (*AR*) are relevant in the development of TGCT. Although it has not been shown that genetic variants in these genes are responsible for causing CO or Germ cell neoplasia *in situ* (*GCNIS*) a precursor lesion to TGCT, both genes have a role in testicle development and testicular carcinogenic process, influencing directly as in the case of *AR*, through non-genomic pathways (Walker, 2003). The *KIT* gene codifies a class III homodimeric receptor with tyrosine kinase activity in humans. *KIT* is activated by its ligand *KITLG* codified by the *KITLG* gene (Agarwal et al., 2014). Both, receptor and ligand are essential for survival, migration and differentiation of the early germ cells (gonocytes; Sheikine et al., 2012). Currently, gonocytes have been proposed as responsible for the development of *GCNIS* (Viguera-Villaseñor et al., 2015; Berney et al., 2016). On the other hand, the *AR* gene produces a homodimeric cytosolic nuclear receptor, which binds to androgens and induces gene transcription (Li and Al-Azzawi, 2009; Davis-Dao et al., 2011). *AR* is essential in the inguinal-scrotal phase of testicular descent during the male fetal stage by controlling the normal gonocyte proliferation in the testis (Merlet et al., 2007; Hutson et al., 2015). Interestingly, *AR* is overexpressed in *GCNIS* and it has been found in gonocytes unable to differentiate properly (Merlet et al., 2007).

Although several studies clearly show a high risk of developing testicular neoplasia in patients with CO, there are no studies that correlate SNVs in patients with TGCT and CO. Therefore, the aims of this study were to analyze the relevant common clinical features in Mexican patients with isolated CO and TGCT, and to identify SNVs in the *KIT* and *AR* genes by allelic discrimination in patients with TGCT and history of CO. This study reports clinical features and genetic variant that may support the early diagnosis of TGCT in pediatric patients with isolated CO.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

The study included 328 individuals referred to the Urology Service of the National Institute of Pediatrics and National Institute of Cancerology in Mexico, from 2006 to 2017. The patients were divided in two groups as follows: the first group consisted in 91 patients with confirmed diagnosis of isolated or

non-syndromic CO; the second group included 79 patients with confirmed diagnosis of TGCT, 66 of them without history of CO, and 13 patients with confirmed history of isolated CO. In all patients the diagnosis was validated by clinical history, physical examination and imaging studies in all cases. Subsequently, clinical data was obtained and patients were classified according to clinical features. In addition, 158 healthy men without history of CO or TGCT were included as a control group.

All patients and healthy men were Mexican descent, at least two generations, with 46, XY normal karyotype. This study is part of the project with registration number INP-01/2016, approved by the Research and Ethic Committee of INP and all patients included in the study had previously signed the informed consent.

Genotyping of Allelic Variants

DNA was obtained from peripheral blood sample from patients with CO, patients with TGCT without history of CO and healthy individuals according to standard protocols QIA-AMP DNA blood mini kit, [Qiagen, Vienna, Austria]. DNA from patients with both conditions (TGCT and history of CO) was obtained from the testicular tumor samples embedded in paraffin according to the manufacturer's protocol FFPE RNA/DNA Purification Plus Kit, [Norgen Biotec Corp, Ontario, Canada]. Subsequently, DNA samples were used for genotyping analysis of rs121913507 (D816V), rs121913506 (D816H), and rs121913514 (N822K) SNVs in the *KIT* gene and rs201934623 (P392S), rs774171864 (A299T), and rs12014709 (g.67718624T > G) SNVs in the *AR* gene. The genotyping was performed through allelic discrimination according to established protocol of TaqMan [BMG chemistry Applied Biosystems, Foster City, CA, United States]. The genotyping rate was 99.9% and 30% of the randomized samples, which showed 100% reproducibility in duplicate trials for the 6 SNVs.

Statistical Analysis

The comparison between the genotypes obtained and the clinical data was performed using SPSS v21 statistical package. Chi-square test or Fisher's exact test were used for the SNVs analysis in different groups; in all cases, the *P* value < 0.05 was considered significant. The statistical power was calculated from the frequency of the minor allele of the variants with a significant *P* value due to the small number of individuals included in this study. Finally, the allelic frequencies of the SNVs in the population were compared with the frequencies reported in other populations in the HapMap and in the project of the 1000 genomes of European Ancestry (EUR), African Ancestry (AFR), East Asian Ancestry (EAS), South Asian Ancestry (SAS), Latino Ancestry (AMR), and Mexican Ancestry in Los Angeles (MXL).

Analysis of Linkage Disequilibrium and Haplotypes

Haplotype association analysis was performed with the variants located in the same gene. Those variants with a *D'* value equal or greater than 0.8 were considered in linkage disequilibrium (LD) and haplotypes formed by our cases and controls were

compared using Haploview 4.2 software (Barrett et al., 2004), and then correlating only the patients with bilateral and unilateral CO phenotypes. The epistasis between variants located in different loci were assayed by a Multifactor Dimensionality Reduction (MDR) method in the MDR 3.0.2 software (Moore et al., 2006), since all *P* values were greater than 0.05 and Cross Validation (CV) values equal to 10/10, were considered.

Analysis of Population Structure

The analysis of rs121913506 (D816H), rs121913514, rs774171864, and rs12014709 SNVs in 328 individuals were performed. The software STRUCTURE 2.3.4. (Pritchard Lab, Stanford University) was used to test the stratification within the samples. A mixing model consisting of a burning period of 1,000,000 and 1,000,000 repetitions with a *k* = 2 was used. It should be noted that, although the ancestry informative markers (AIMS) analysis was not performed, the SNVs allowed us to evidence the structural phenomenon of our population. The value of $\delta > 1$ indicated that majority of the analyzed individuals were mixed (Rosenberg, 2002).

RESULTS

Clinical Features Associated to CO and TGCT

At the time of diagnosis, the patients with CO (*n* = 91) had an average age of 3.5 ± 0.3 years, and those with TGCT had 26.5 ± 0.9 years [TGCT with CO (*n* = 13) = 24.3 ± 2.5 years, and TGCT without CO (*n* = 66) = 26.9 ± 1.0 years].

In patients with CO, the frequency of bilateral CO was 48.3% (44/91); all patients with CO underwent orchidopexy, but 73.6% (68/91) underwent orchidopexy after 18 months of age (2–16 years; data not shown), and only 16.5% (15/91) required orchiectomy due to the presence of testicular atrophy (Table 1). In addition, 13.2% (12/91) of the patients reported family history of CO and only 2.2% (2/91) reported family history of TGCT (Table 1).

In the group of TGCT patients, 16.5% (13/79) had CO, of them, 38.5% (5/13) underwent orchidopexy in an average of 8.8 years of age. All patients of the TGCT group (79/79) underwent orchiectomy at TGCT diagnosis. The most frequent histological type of TGCT patients was nsTGCT [61% (48/79)]. The subgroup of 13 patients with TGCT and CO did not report family history of CO or TGCT, while in the subgroup of TGCT without CO, only 4.5% (3/66) patients had family history of TGCT (Table 1).

Genotyping

In order to identify a genetic marker associated to CO condition or to genetic susceptibility to develop TGCT in patients with CO, 6 SNVs were analyzed in this study. Three SNVs in the *KIT* gene, including rs121913507 (D816V), rs121913506 (D816H), and rs121913514 (N822K) were evaluated. While the 3 SNVs analyzed in the *AR* gene were rs201934623 (P392S), rs774171864 (A299T), and rs12014709 (c.66718624 T/G). Initially the subgroups of

patients with TGCT and history of CO (*n* = 13) were compared with those patients with TGCT without CO (*n* = 66). Posteriorly, we compared the subgroup of TGCT and CO patients with isolated CO patients (*n* = 91), and finally, with healthy controls (*n* = 158; Table 2). Results showed that the variant rs121913507 (D816V) of the *KIT* gene was found in 1/13 (7.7%) of patients with TGCT and CO in a heterozygous form, while the rest of patients [12/13 (92.3%)] presented a homozygote genotype (AA). The comparison among the rest of the patients and healthy controls did not show significant differences [TGCT + CO vs TGCT (*P* = 0.162), TGCT + CO vs CO (*P* = 0.125), and TGCT + CO vs Controls (*P* = 0.076), respectively]. The variant rs121913506 (D816H) of the *KIT* gene was found in heterozygous form in 11/13 (84.6%) patients with TGCT and CO, while 2/13 (15.4%) patients with TGCT and CO had a homozygote genotype (CC). In contrast to the variant rs121913507 (D816V), the comparison between the variant rs121913506 (D816H) of patients with TGCT and CO with the rest of the patients and healthy controls showed statistically significant differences [TGCT + CO vs TGCT (*P* = 0.025), TGCT + CO vs CO (*P* = 0.015), and TGCT + CO vs Controls

TABLE 1 | Clinical features of the patients.

Clinical features	Patients with isolated CO <i>n</i> = 91 (%)	Patients with TGCT <i>n</i> = 79	
		TGCT with CO <i>n</i> = 13 (%)	TGCT without CO <i>n</i> = 66 (%)
Age at diagnosis	3.5 ± 0.3	24.3 ± 2.5	26.9 ± 1.0
CO	Bilateral	44 (48.3)	7 (53.8)
	Left	25 (27.5)	3 (23.1)
	Right	22 (24.2)	3 (23.1)
Orchidopexy	Yes	91 (100)	5 (38.5)
	No	0 (0)	8 (61.5)
Orchiectomy	Yes	15 (16.5)	13 (100)
	No	76 (83.5)	0 (0)
Family history of CO	Positive	12 (13.2)	0 (0)
	Negative	79 (86.8)	13 (100)
Family history of TGCT	Positive	2 (2.2)	0 (0)
	Negative	89 (97.8)	13 (100)
TGCT	Bilateral	NA	1 (7.7)
	Left		4 (30.8)
	Right		8 (61.5)
Clinical stage at diagnosis	I	NA	4 (30.8)
	II		7 (53.8)
	III		1 (7.7)
	IV		1 (7.7)
	Metastasis	Positive	NA
	Negative		6 (46.2)
Tumor histological type	nsTGCT	NA	10 (76.9)
	sTGCT		3 (23.1)

nsTGCT, Non-Seminomatous Testicular Germ Cells Tumor; sTGCT, Seminomatous Testicular Germ Cells Tumor; and NA, Not Apply.

($P = 0.005$), respectively]. The analysis of the rs121913514 (N822K) variant of the *KIT* gene between all groups did not show any differences (Table 2).

The results of the analysis of the SNVs in the *AR* gene showed that the rs12014709 (g.67718624T > G) variant located in the intronic region of gene presented different genotypes, however, no statistically significant differences resulted between the groups (Table 2). The variants rs201934623 (P392S) and rs774171864 (A299T) of the *AR* gene did not show any differences.

TGCT With History of CO Patients and the *KIT* Gene

Considering that the group of patients with TGCT and CO showed significant differences in the genotypes of the *KIT* gene, we analyzed their association with significant clinical features (Table 3). In the first analysis, the patients 2 and 3 that presented the variant rs121913506 (D816H) in homozygous form, were young and suffered unilateral CO (although in opposite side), however, both presented different tumor histological type and only one of them developed metastasis. By the other hand, the patient 13 presented the variant rs121913507 (D816V) in heterozygous form, he had history of bilateral CO and TGCT was unilateral, the tumor type was nsTGCT and he did not develop metastasis.

Interestingly, higher frequency of metastasis was observed in patients with TGCT and previous CO ($n = 13$) compared to those who presented only TGCT without history of CO ($n = 66$) [53.8% (7/13) vs 36.4% (24/66)] and histological type of nsTGCT [76.9% (10/13) vs 57.6% (38/66)] (Table 1). Furthermore, only 38.5% (5/13) of patients with TGCT and previous CO underwent orchidopexy in an age average of 8.8 years, while the rest [8/13

(61.5%)] of these patients did not have orchidopexy. The nsTGCT histological type [87.5% (7/8) vs 60% (3/5)], metastasis [75% (6/8) vs 20% (1/5)], and more advanced tumor stage were most frequently presented in these 8 patients that did not underwent orchidopexy (Table 3).

Allelic Frequencies

The allelic frequencies for the 3 variants of the *KIT* gene and 3 variants of the *AR* gene analyzed in this study were search in the literature and in different worldwide databases for general population, to compare these information to the allelic frequencies observed in our results. Only the variants rs121913507, rs201934623, rs774171864, and rs12014709 coincided with the reported frequencies (Table 4).

Haplotype blocks conformed by variants located in the same gene were not identify. In the same way, MDR analysis did not show any significant statistical gene-gene interaction. However, the analysis of the population structure of the 4 of the 6 SNVs, a value of $\delta = 2.27$ was identified.

DISCUSSION

Despite the high rate of spontaneous descent during the first year of life, CO is still one of the most common congenital malformations among males worldwide, with a frequency of 1–3%; and is one of the risk factors for development TGCT (Banks et al., 2013). Besides, TGCT is the most common cancer in young men between 15 to 44 years (Trabert et al., 2014), with an age-adjusted rate of 11.1 per 100,000 men (world standard). Among the solid tumors with higher mortality, TGCT are found in the

TABLE 2 | Genotypic frequency of the allelic variants in *KIT* and *AR* genes in Mexican population.

SNV	Patients with TGCT and CO n (%)	Patients with TGCT n (%)	P value TGCT + CO vs TGCT	Patients with CO n (%)	P value TGCT + CO vs CO	Healthy Controls n (%)	P value TGCT + CO vs Control
<i>KIT</i> GENE							
D816V (A/T) rs121913507 c.54733155	AA = 12 (92.3) AT = 1 (7.7) TT = 0 (0)	AA = 66 (100) AT = 0 (0) TT = 0 (0)	0.162	AA = 91 (100) AT = 0 (0) TT = 0 (0)	0.125	AA = 158 (100) AT = 0 (0) TT = 0 (0)	0.076
D816H (G/C) rs121913506 c.54733154	GG = 0 (0) GC = 11 (84.6) CC = 2 (15.4)	GG = 0 (0) GC = 66 (100) CC = 0 (0)	0.025	GG = 0 (0) GC = 91 (100) CC = 0 (0)	0.015	GG = 0 (0) GC = 158 (100) CC = 0 (0)	0.005
N822K (A/T) rs121913514 c.54733174	AA = 0 (0) AT = 13 (100) TT = 0 (0)	AA = 0 (0) AT = 66 (100) TT = 0 (0)	NA	AA = 0 (0) AT = 89 (97.8) TT = 2 (2.2)	0.765	AA = 0 (0) AT = 154 (97.5) TT = 4 (2.5)	0.693
<i>AR</i> GENE							
Intronic (T/G) rs12014709 c.66718624	TT = 0 (0) TG = 13 (100) GG = 0 (0)	TT = 2 (3.0) TG = 63 (95.5) GG = 1 (1.5)	0.736	TT = 4 (2.5) TG = 80 (87.9) GG = 7 (7.7)	0.415	TT = 4 (2.5) TG = 143 (90.5) GG = 11 (7.0)	0.508
P392S (C/T) rs201934623 c.67546320	CC = 13 (100) CT = 0 (0) TT = 0 (0)	CC = 66 (100) CT = 0 (0) TT = 0 (0)	NA	CC = 91 (100) CT = 0 (0) TT = 0 (0)	NA	CC = 158 (100) CT = 0 (0) TT = 0 (0)	NA
A299T (C/T) rs774171864 c.67546042	CC = 0 (0) CT = 13 (100) TT = 0 (0)	CC = 0 (0) CT = 66 (100) TT = 0 (0)	NA	CC = 0 (0) CT = 91 (100) TT = 0 (0)	NA	CC = 0 (0) CT = 158 (100) TT = 0 (0)	NA

NA = Not Apply.

TABLE 3 | Clinical features of the patients with TGCT and isolated CO.

Patient	Age at diagnosis of TGCT	CO side	Age of orchidopexy	Tumor side	Tumor histological type	Metastasis	Clinical stage at diagnosis	Genotype
Patients with orchidopexy								
1	16 years	Bilateral	8 years	Right	nsTGCT	No	I	
2	18 years	Right	8 years	Right	sTGCT	No	I	D816H/D816H
3	19 years	Left	12 years	Left	nsTGCT	Retroperitoneum	II	D816H/D816H
4	24 years	Right	10 years	Right	nsTGCT	No	I	
5	27 years	Bilateral	6 years	Right	sTGCT	No	I	
Patients without orchidopexy								
6	16 years	Bilateral	NA	Right	nsTGCT	Retroperitoneum	II	
7	17 years	Bilateral	NA	Left	nsTGCT	Pelvis	II	
8	22 years	Left	NA	Left	sTGCT	Retroperitoneum	II	
9	22 years	Bilateral	NA	Bilateral	nsTGCT	No	II	
10	23 years	Right	NA	Right	nsTGCT	Lung	IV	
11	27 years	Left	NA	Left	nsTGCT	Retroperitoneum	II	
12	36 years	Bilateral	NA	Right	nsTGCT	Lung	III	
13	49 years	Bilateral	NA	Right	nsTGCT	No	II	Wild type/D816V

NA = Not Apply.

TABLE 4 | Allelic frequencies of the variables analyzed in the population studied.

Gene	SNV	Allele	ALL	EUR	AFR	EAS	SAS	AMR	MXL	Mexican	
KIT	rs121913507 D816V	A	1	1	1	1	1	1	1	1	
		T	0	0	0	0	0	0	0	0	
	rs121913506 D816H	G	—	—	—	—	—	—	—	—	0.50
		C	—	—	—	—	—	—	—	—	0.50
rs121913514 N822K	A	—	—	—	—	—	—	—	—	0.49	
		T	—	—	—	—	—	—	—	—	0.51
AR	rs201934623 P392S	C	0.99	1	1	1	0.96	1	0.99	1	
		T	0.01	0	0	0	0.04	0	0.01	0	
	rs774171864 A299T	C	1	1	1	1	1	1	1	1	0.50
		T	0	0	0	0	0	0	0	0	0.50
rs12014709 Intronic	T	0.85	0.91	0.58	1	0.96	0.91	0.96	0.96	0.49	
	G	0.15	0.09	0.42	0	0.04	0.09	0.04	0.04	0.51	

There are no data available on the frequencies of the variant (—), ALL, All genomeAD, EUR, European Ancestry, AFR, African Ancestry, EAS, East Asian Ancestry, SAS, South Asian Ancestry, AMR, Latino Ancestry, and MXL, Mexican Ancestry in Los Angeles.

fifth place with a mortality rate of 1.3 per 100,000 men (Global Cancer Observatory, 2020). In spite of clinical relationship between CO and TGCT the molecular mechanisms underlying both diseases are still unknown. Significantly, although the incidence of CO and TGCT has increased worldwide, in Mexico there are few epidemiological data about both diseases.

In this study, we analyzed the clinical manifestations of patients with CO, patients with TGCT and patients with TCGT and history of CO. In the group of patients with CO we found that the incidence of bilateral disease was higher than those reported for Hispanic population [48.3% (44/91) vs 19.7% (25/127)] (Davis-Dao et al., 2012). However, other findings were similar to other studies. Surgical intervention in 70% of the patients with CO done after 2 years (Williams et al., 2018) compared with 73.6% in our study, and the family history of TGCT in our patients with CO and in

Italian population [2.2% (2/91) vs 2.1% (15/721; Foresta et al., 2008)] (Table 1).

In addition, in the group of TGCT patients we did not find CO history, compared to other reports who found CO history in 5–10% (Kratz et al., 2010) and 14.6% (18/123) of TGCT patients (Garolla et al., 2005). On the other hand, we identify 4.5% patients with TGCT without CO (3/66) with at least one family member affected by the same neoplasm, and a global frequency of 3.8% (3/79 patients with TGCT), these were according to other authors for familial TGCT (Mai et al., 2009; Rapley and Nathanson, 2010); we also observed higher frequency of nsTGCT in our patients with TGCT, similar to Hispanic population (Woldu et al., 2018; Table 1).

CO is an important risk factor for the development of TGCT, and this relationship has been clinically established, however, the molecular mechanism between failure in

testicular descent and the development of malignancy, is still unknown (Ferguson and Agoulnik, 2013). Several genes have been associated to the development of TGCT (Rapley and Nathanson, 2010; Landeró-Huerta et al., 2017), but only a few of them, such as *KIT* gene expression (Viguera-Villaseñor et al., 2015), or polyQ inserts in exon 1 of the *AR* gene (Ferlin et al., 2005; Davis-Dao et al., 2011; Hutson et al., 2015; Fukawa and Kanayama, 2018) have been analyzed in patients with CO, without establish a relationship between CO and TGCT.

Therefore, we focused on determine the relationship between 6 SNVs in both *KIT* and *AR* genes and TGCT and CO in Mexican population. The contrast of the patients with TGCT and history of CO with TGCT without CO, or those with CO as well as control group showed statistical differences in the presence of the homozygous form (CC) of the rs121913506 (D816H) variant of the *KIT* gene in two patients with TGCT and history of CO, these results suggested that CO patients with C allele in homozygous form might have a higher risk of development TGCT. The frequency of C allele in homozygous form in our group of TGCT Mexican patients was similar to the reported in Japanese population (Sakuma et al., 2003) [2.5% (2/79) vs 2.9% (1/34)]. Although the other SNVs did not show statistical differences, we consider pertinent not to discard them as important SNVs in Mexican population, therefore, these results must be explored in higher number of samples. In previous reports, the rs121913506 (D816H) variant has been considered as mutation related to TGCT (Looijenga et al., 2003), however, we identified the same variant in heterozygous form in the majority of patients and even in the control group, therefore our population could have a different genotype.

In the group of patients with TGCT, we considered the simultaneous presence of TGCT and CO as the most important factor, so we analyzed individually this subgroup of 13 patients, and we found that the variants rs121913507 (D816V) and rs121913506 (D816H) of the *KIT* gene were identified in 3 patients (2, 3, and 13 patients; Table 3); however, there were not association between these genetic variants and any particular phenotype or clinical feature. However, the results obtained from the clinical characteristics indicated that the patients with TGCT with previous CO could express a more aggressive phenotype of the TGCT, which itself is already severe (Table 3). These results suggest that the relationship between CO and severe TGCT phenotypes could be due to the participation of the function of multiple genes and not exclusively by *KIT* and *AR*. In particular, we observed that patients who did not undergo orchidopexy at right time had a more severe TGCT phenotype (Table 3). We could highlight the importance of performing orchidopexy in a timely manner, minimizing the risk and complications in the pediatric patient with CO (Table 3), and avoiding undescended testes to be subject to different abnormal stress conditions (Williams et al., 2018).

Additionally, the comparison of the allelic frequencies for the rs121913506 (D816H) and rs121913514 (N822K) variants in other populations was not possible due to lack of available

information in the HapMap and in the project of the 1000 genomes. However, the frequencies for the allele A of the variant rs121913507 (D816V) in the *KIT* gene, and for the allele C of the variant rs201934623 (P392S) in the *AR* gene, were similar to that found in all populations. In the case of the both alleles of the variant rs774171864 (A299T), the frequencies were different to all databases, and the allelic frequencies of the variant rs12014709 were similar only with the AFR. Finally, we identified a mixed population in population structure analysis, according to previously reports for Mexican population with predominantly Amerindian and EUR (Salazar-Flores et al., 2015).

In conclusion, the results of this study support the fact that CO is a risk factor for the development of TGCT at molecular level. *KIT* gene variants rs121913507 and rs121913506 might be common among TGCT and CO. However, more studies must perform to clarify these results and to find predictive biomarkers for TGCT and CO patients.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation, to any qualified researcher.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by the project with registration number INP-01/2016, approved by the Research and Ethics Committee of INP. Written informed consent to participate in this study was provided by the participants' legal guardian/next of kin.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MC-S contributed to conception and design. DL-H, MC-S, FG-A, and JR-C contributed to the development of the methodology. MC-S, RV-V, EY-R, IP-A, and EA-O performed the analysis and interpreted the data. DL-H, MC-S, and RV-V contributed to writing, review, and revision of the manuscript. LH-M, JD-C, and JR-C provided administrative, technical, or material support. RV-V, MC-S, and DL-H contributed to study supervision. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

The authors thank CONACyT for financial support CONACyT FOSISS (Project 272641/2017) and Instituto Nacional de Pediatría INP: 01/2016. CONACyT for the scholarship granted to DL-H (No. 429258), DL-H submitted this article to fulfill the graduate requirement for a Ph.D. degree at Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería de Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa.

REFERENCES

- Agarwal, S., Kazi, J., Mohlin, S., Pählman, S., and Rönstrand, L. (2014). The activation loop tyrosine 823 is essential for the transforming capacity of the c-Kit oncogenic mutant D816V. *Oncogene* 34, 4581–4590. doi: 10.1038/onc.2014.383
- Banks, K., Tuazon, E., Berhane, K., Koh, C., De Filippo, R., Chang, A., et al. (2013). Cryptorchidism and testicular germ cell tumors: comprehensive meta-analysis reveals that association between these conditions diminished over time and is modified by clinical characteristics. *Front. Endocrinol.* 3:182. doi: 10.3389/fendo.2012.00182
- Barrett, J., Fry, B., Maller, J., and Daly, M. (2004). Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21, 263–265. doi: 10.1093/bioinformatics/bth457
- Berney, D., Looijenga, L., Idrees, M., Oosterhuis, J., Rajpert-De Meys, E., Ulbright, T., et al. (2016). Germ cell neoplasia in situ (GCNIS): evolution of the current nomenclature for testicular pre-invasive germ cell malignancy. *Histopathology* 69, 7–10. doi: 10.1111/his.12958
- Dalgaard, M., Weinhold, N., Edsgård, D., Silver, J., Pers, T., Nielsen, J., et al. (2011). A genome-wide association study of men with symptoms of testicular dysgenesis syndrome and its network biology interpretation. *J. Med. Genet.* 49, 58–65. doi: 10.1136/jmedgenet-2011-100174
- Davis-Dao, C., Koh, C., Hardy, B., Chang, A., Kim, S., De Filippo, R., et al. (2012). Shorter androgen receptor CAG Repeat lengths associated with cryptorchidism risk among hispanic white boys. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, E393–E399. doi: 10.1210/jc.2011-2439
- Davis-Dao, C., Siegmund, K., Vandenberg, D., Skinner, E., Coetzee, G., Thomas, D., et al. (2011). Heterogenous effect of androgen receptor CAG tract length on testicular germ cell tumor risk: shorter repeats associated with seminoma but not other histologic types. *Carcinogenesis* 32, 1238–1243. doi: 10.1093/carcin/bgr104
- Dieckmann, K., and Pichlmeier, U. (2004). Clinical epidemiology of testicular germ cell tumors. *World J. Urol.* 22, 2–14. doi: 10.1007/s00345-004-0398-8
- Ferguson, L., and Agoulnik, A. (2013). Testicular cancer and cryptorchidism. *Front. Endocrinol.* 4:32. doi: 10.3389/fendo.2013.00032
- Ferlin, A., Garolla, A., Bettella, A., Bartoloni, L., Vinanzi, C., Roverato, A., et al. (2005). Androgen receptor gene CAG and GGC repeat lengths in cryptorchidism. *Eur. J. Endocrinol.* 152, 419–425. doi: 10.1530/eje.1.01860
- Foresta, C., Zuccarello, D., Garolla, A., and Ferlin, A. (2008). Role of hormones, genes, and environment in human cryptorchidism. *Endoc. Rev.* 29, 560–580. doi: 10.1210/er.2007-0042
- Fukawa, T., and Kanayama, H. (2018). Current knowledge of risk factors for testicular germ cell tumors. *Int. J. Urol.* 25, 337–344. doi: 10.1111/iju.13519
- Garolla, A., Ferlin, A., Vinanzi, C., Roverato, A., Sotti, G., Artibani, W., et al. (2005). Molecular analysis of the androgen receptor gene in testicular cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 12, 645–655. doi: 10.1677/erc.1.00954
- Global Cancer Observatory (2020). *Globocan.iarc.fr*. 2020. Available from: <http://globocan.iarc.fr/> (accessed April, 22 2020).
- Hutson, J., Li, R., Southwell, B., Newgreen, D., and Cousinier, M. (2015). Regulation of testicular descent. *Pediatr. Surg. Intl.* 31, 317–325. doi: 10.1007/s00383-015-3673-4
- Kratz, C., Mai, P., and Greene, M. (2010). Familial testicular germ cell tumours. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 24, 503–513. doi: 10.1016/j.beem.2010.01.005
- Landroero-Huerta, D. A., Viguera-Villaseñor, R. M., Yokoyama-Rebollar, E., Aréchaga-Ocampo, E., Rojas-Castañeda, J. C., et al. (2017). Epigenetic and risk factors of testicular germ cell tumors: a brief review. *Front. Biosci.* 22:1073–1098. doi: 10.2741/4534
- Li, J., and Al-Azzawi, F. (2009). Mechanism of androgen receptor action. *Maturitas* 63, 142–148. doi: 10.1016/j.maturitas.2009.03.008
- Litchfield, K., Levy, M., Orlando, G., Loveday, C., Law, P., Migliorini, G., et al. (2017). Identification of 19 new risk loci and potential regulatory mechanisms influencing susceptibility to testicular germ cell tumor. *Nat. Genet.* 49, 1133–1140. doi: 10.1038/ng.3896
- Looijenga, L., Leeuw, H., Oorschot, M., Gulp, R., Stoop, H., Gillis, A., et al. (2003). Stem cell factor receptor (c-KIT) codon 816 mutations predict development of bilateral testicular germ-cell tumors. *Cancer Res* 63, 7674–7678.23.
- Mai, P., Chen, B., Tucker, K., Friedlander, M., Phillips, K., Hogg, D., et al. (2009). Younger age-at-diagnosis for familial malignant testicular germ cell tumor. *Fam. Cancer* 8, 451–456. doi: 10.1111/andr.293
- Merlet, J., Racine, C., Moreau, E., Moreno, S., and Habert, R. (2007). Male fetal germ cells are targets for androgens that physiologically inhibit their proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 3615–3620. doi: 10.1073/pnas.0611421104
- Moore, J., Gilbert, J., Tsai, C., Chiang, F., Holden, T., Barney, N., et al. (2006). A flexible computational framework for detecting, characterizing, and interpreting statistical patterns of epistasis in genetic studies of human disease susceptibility. *J. Theor. Biol.* 241, 252–261. doi: 10.1016/j.jtbi.2005.11.036
- Rapley, E., and Nathanson, K. (2010). Predisposition alleles for testicular germ cell tumour. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 20, 225–230. doi: 10.1016/j.gde.2010.02.006
- Rosenberg, N. (2002). Genetic structure of human populations. *Science* 298, 2381–2385. doi: 10.1126/science.1078311
- Sakuma, Y., Sakurai, S., Oguni, S., Hironaka, M., and Salto, K. (2003). Alterations of the c-kit gene in testicular germ cell tumors. *Cancer Sci.* 94, 486–491. doi: 10.1111/j.1349-7006.2003.tb01470.x
- Salazar-Flores, J., Zuñiga-Chiquette, F., Rubi-Castellanos, R., Álvarez-Miranda, J., Zetina-Hernández, A., Martínez-Sevilla, V., et al. (2015). Admixture and genetic relationships of mexican mestizos regarding latin american and caribbean populations based on 13 CODIS-STRs. *Homo* 66, 44–59. doi: 10.1016/j.jchb.2014.08.005
- Sheikine, Y., Genega, E., Melamed, J., Lee, P., Reuter, V., and Ye, H. (2012). Molecular genetics of testicular germ cell tumors. *Am. J. Cancer Res.* 2, 153–167.
- Trabert, B., Chen, J., Devesa, S., Bray, F., and McGlynn, K. (2014). International patterns and trends in testicular cancer incidence, overall and by histologic subtype, 1973–2007. *Andrology* 3, 4–12.
- Turnbull, C., and Rahman, N. (2011). Genome-wide association studies provide new insights into the genetic basis of testicular germ-cell tumour. *Int. J. Androl.* 34, e86–e97. doi: 10.1111/j.1365-2605.2011.01162.x
- Viguera-Villaseñor, R., Cortés-Trujillo, L., Chávez-Saldaña, M., Vázquez, F., Carrasco-Daza, D., Cuevas-Alpuche, O., et al. (2015). Analysis of POU5F1, c-Kit, PLAP, AP2γ and SALL4 in gonocytes of patients with cryptorchidism. *Acta Histochem.* 117, 752–761. doi: 10.1016/j.acthis.2015.08.004
- Walker, W. (2003). Nongenomic actions of androgen in sertoli cells. *Curr. Top. Dev. Biol.* 56, 25–53. doi: 10.1016/s0070-2153(03)01006-8
- Williams, K., Baumann, L., Shah, A., Abdullah, F., Johnson, E., and Oyetunji, T. (2018). Age at orchiopexy for undescended testis in the United States. *J. Pediatr. Surg.* 53, 86–89. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2017.10.020
- Woldu, S., Aydin, A., Rao, A., Hutchinson, R., Singla, N., Clinton, T., et al. (2018). Differences at presentation and treatment of testicular cancer in hispanic men: institutional and national hospital-based analyses. *Urology* 112, 103–111. doi: 10.1016/j.urology.2017.08.059

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Landero-Huerta, Viguera-Villaseñor, Yokoyama-Rebollar, García-Andrade, Rojas-Castañeda, Herrera-Montalvo, Díaz-Chávez, Pérez-Añorve, Aréchaga-Ocampo and Chávez-Saldaña. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.