

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE
MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

POSGRADO DE CIENCIAS GENÓMICAS

**Evaluación de los ejes hsa-miR-372/*ARID4B*/*ARID4B*,
hsa-miR-372/*GALNT3*/*GALNT3* y hsa-miR-
372/*KPNA6*/*KPNA6* en la línea celular NTERA-2 cl-D1 y
su correlación con muestras de pacientes con tumor
testicular de células germinales**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A:

Itandehui Martínez Rodríguez

DIRECTORA

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez

CODIRECTOR

Dr. Daniel Adrian Landero Huerta

**POSGRADO
EN CIENCIAS
GENÓMICAS**

Ciudad de México, noviembre, 2025

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS ©

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

INTEGRACIÓN DEL JURADO:

Presidente: Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez, UACM Col. Del Valle
Secretario: Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga, UACM Col. Del Valle
Vocal: Dr. Daniel Adrian Landero Huerta, INP

Plantel de adscripción:

PLANTEL DEL VALLE,
UACM.

DIRECTORA

Dra. María Elizabeth Álvarez
Sánchez
UACM

CODIRECTOR



Dr. Daniel Adrian Landero
Huerta
INP

Agradecimientos institucionales

Al Posgrado en Ciencias Genómicas (PCG) de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM) plantel del Valle, dentro del cual la Bióloga Itandehui Martínez Rodríguez con matrícula 23-104-0036 desarrolló sus estudios de Maestría.

A la Coordinadora de la Maestría en Ciencias Genómicas la Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga, 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 dirección interna de la Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez de la UACM plantel Del Valle perteneciente al Laboratorio de Patogénesis Celular y Molecular Humana y Veterinaria, así como, bajo la codirección externa del Dr. Daniel Adrián Landero Huerta; perteneciente al Laboratorio de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Pediatría.

A mis asesores la Dra. Elisa Irene Azuara y el Dr. Isidro Xavier Pérez Añorve por sus oportunos comentarios e interés en mi trabajo.

A la Mtra. Laura por todas su enseñanzas y apoyo brindado durante mi estancia en la universidad.

Al Dr. José Díaz Chávez y a la M. en C. Lucero Cortes Trujillo por el apoyo en la obtención de las muestras incluidas en este proyecto.

A la Secretaria de Ciencias, Humanidades, Tecnología e Innovación (Secihti) por el apoyo brindado durante mi formación, gracias a la beca número: **4003385** otorgada durante el periodo de septiembre del 2023 a julio del 2025. Agradezco la confianza depositada en mi y el compromiso de la Secihti con la formación de nuevos talentos para el desarrollo científico del país.

Agradecimientos Institucionales

Al Instituto Nacional de Pediatría S.S., debido a que este trabajo se realizó parcialmente en el Laboratorio de Biología de la Reproducción de este instituto, en la Torre de Investigación “Dr. Joaquín Cravioto” de la Subdirección de Medicina Experimental.

La realización de esta tesis se logró con el apoyo económico de recursos fiscales del programa E-022 otorgado por el Instituto Nacional de Pediatría S.S. al proyecto general “Perfil de expresión de los miRNAs, miR-135a y el clúster miR-371-373 en pacientes con criptorquidia aislada” con número de registro INP: 063/2018, del cual deriva la presente Tesis.

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

A los técnicos Edgar Cervantes y Pedro Martínez por su invaluable apoyo durante mi estancia en el laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio, a los Drs. Julio Rojas y Jatziri Contreras, por su disposición y accesibilidad en todo momento.

A La Dra. Fabiola García, cuyo trabajo fue la base de esta tesis.

Al Dr. Daniel Adrián Landero Huerta del Instituto Nacional de Pediatría, por la codirección del trabajo de tesis y su gran apoyo en todo momento.

Agradecimientos Personales

A mi madre Manuelita por su invaluable apoyo y amor incondicional, gracias por intentar seguirle el ritmo a una hija que salió completamente de tus estándares.

A mi hermana Nadi por tu ternura, calidez y darme el mejor sobrino/hijo que pude desear, crecer contigo es la mejor bendición con la que llegué a este mundo.

A la familia que la vida me dio, mis invaluable amigos, Edgar, Baruc, Viviana, Laura y Karen por ser mi pedacito de calma en este mundo caótico, gracias por contenerme emocionalmente en mis peores momentos.

A mis compañeros de laboratorio en el INP Andy, Rocío, Christian, Fer y Ari. los técnicos Pedro Medina y Edgar, a la Dra. Rosy, la Dra. Jatziri y a Faby que, aunque no esté siempre será mi cómplice en el laboratorio.

A mis compañeros del laboratorio 1 Laurita, Edgar, Jesús, Daniel, Aldo, Luis y Abner, aprendí mucho de y con ustedes. Con un muy especial cariño a Mariana y Yussel, gracias por ser los amigos que necesitaba en el momento que lo necesitaba, me salvaron la vida sin pedir nada a cambio.

Por último, me gustaría agradecerle a Dani, por todo tu apoyo y confianza depositada en mí. Hace 4 años aceptaste al fósil más deprimente de la facultad de ciencias y lo convertiste en una Maestra en ciencias Genómicas, todo esto es gracias a ti.

*A mi gato con botas y
Guerrero Dragon: Manuel.*

índice		Página
	índice de tablas	9
	índice de figuras	10
	Abreviaturas	12
	Resumen	14
	Abstract	15
1	Introducción	16
	1.1 Descenso testicular	16
	1.2 Criptorquidia	19
	1.3 Teoría del gonocito	15
	1.4 Tumor testicular de células germinales	21
	1.5 microRNAs	24
2	Antecedentes	29
	2.1 Expresión del clúster hsa-miR-371-373 en el tumor testicular de células germinales	29
	2.2 <i>ARID4B</i> , <i>GALNT3</i> y <i>KPNA6</i> como posibles blancos del hsa-miR-372	29
3	Hipótesis	32
4	Justificación	32
5	Objetivo general	33
	5.1 Objetivos específicos	33
6	Estrategia experimental	34
7	Materiales y métodos	36
	7.1 Selección de muestras	36
	7.2 Determinación de la expresión relativa del hsa-miR-372 y de los transcritos de <i>ARID4B</i> , <i>GALNT3</i> y <i>KPNA6</i> en muestras de TCG	37
	7.3 Evaluación histológica y determinación de la inmunorreactividad para <i>ARID4B</i> , <i>GALNT3</i> y <i>KPNA6</i> en muestras de TCG	38
	7.4 Correlación de los niveles de expresión del hsa-miR-372, <i>ARID4B</i> , <i>GALNT3</i> Y <i>KPNA6</i> con las características clínico-patológicas del TCG	39
	7.5 Modulación de la expresión de <i>ARID4B</i> , <i>GALNT3</i> Y <i>KPNA6</i> mediada por el hsa-miR-372	40
	7.5.1 Extracción de RNA total	41
	7.5.2 RT-qPCR	42
	7.5.3 Extracción de proteínas totales	42
	7.5.4 Electroforesis	43
	7.5.5 Western blot	43
	7.6 Análisis estadístico	43
8	Resultados	44
	8.1 Características clínico-patológicas de los pacientes	44

	8.2	Determinación de la expresión relativa del hsa-miR-372 y de los transcritos de ARID4B, GALNT3 y KPNA6 en muestras de TCG	48
	8.3	Evaluación histológica y determinación de la inmunorreactividad para ARID4B, GALNT3 y KPNA6 en muestras de TCG	61
	8.4	Correlación de los niveles de expresión del hsa-miR-372, ARID4B, GALNT3 Y KPNA6 con las características clínico-patológicas de los pacientes con TCG	67
	8.5	Modulación de la expresión de ARID4B, GALNT3 y KPNA6 mediada por el hsa-miR-372	72
9		Discusión	78
10		Conclusión	89
11		Bibliografía	90
12		Anexos	100
	12.1	Congresos	100
	12.2	Actividades de retribución social	103
	12.3	Asistencia a simposios	105

Índice de tablas

Tabla 1 Características clínicas e histológicas del grupo Control

Tabla 2 Características clínico-patológicas de los pacientes con TTCC

tabla 3 Frecuencia de las características clínico-patológicas del TTCC

Tabla 4 Evaluación histológica e inmunohistoquímica

Índice de figuras

- Figura 1** Clasificación de la CO
- Figura 2** Teoría del gonocito como posible blanco de malignidad para el desarrollo del TTCCG
- Figura 3** Clasificación de los tumores testiculares
- Figura 4** Biogénesis de los microRNAs
- Figura 5** Estrategia experimental
- Figura 6** Comparación de los niveles de expresión relativa entre el grupo Control y TTCCG
- Figura 7** Comparación de los niveles de expresión relativa entre tejido control, sTTCCG y nsTTCCG
- Figura 8** Comparación de los niveles de expresión relativa entre tejido control y los tumores localizados en el testículo izquierdo o derecho
- Figura 9** Comparación de los niveles de expresión relativa entre tejido control y los tejidos provenientes del grupo con metástasis y del grupo sin metástasis
- Figura 10** Comparación de los niveles de expresión relativa entre tejido control y los tejidos provenientes de pacientes con TTCCG
- Figura 11** Comparación de los niveles de expresión relativa entre tejido control y los tejidos provenientes de pacientes con presencia de *N/SCG* y de pacientes sin *N/SCG*
- Figura 12** Comparación de los niveles de expresión relativa entre tejido control y los tejidos provenientes de pacientes diagnosticados en el estadio I o III
- Figura 13** Histología de las muestras control
- Figura 14** Histología de las muestras clasificadas como sTTCCG
- Figura 15** Histología de las muestras clasificadas como nsTTCCG
- Figura 16** Comparación de la inmunorreactividad
- Figura 17** Inmunorreactividad para *ARID4B*
- Figura 18** Inmunorreactividad para *GALNT3*
- Figura 19** Inmunoreactividad para *KPNA6*
- Figura 20** Correlación entre los niveles de expresión relativa del hsa-miR-372 y los transcritos *ARID4B*, *GALNT3* y *KPNA6*
- Figura 21** Correlación entre los niveles de expresión y las características clínico-patológicas en el grupo nsTTCCG
- Figura 22** Correlación entre los niveles de expresión y las características clínico-patológicas por estadio clínico
Correlación entre los niveles de expresión y las características clínico-patológicas por la presencia y ausencia de *N/SCG*, al momento del diagnóstico

- Figura 23** Correlación entre los niveles de expresión y las características clínico-patológicas por la presencia y ausencia de *N/SCG*.
- Figura 24** Comparación de los niveles de expresión relativa del hsa-miR-372
- Figura 25** Comparación de los niveles de expresión relativa de *ARID4B*
- Figura 26** Comparación de los niveles de expresión relativa de *KPNA6*
- Figura 27** Comparación de los niveles de expresión relativa de *GALNT3*
- Figura 28** Inmunodetección de las proteínas *GADPH*, *ARID4B*, *GALNT* y *KPNA6*
- Figura 29** Figura integrativa

Abreviaturas

AFP	Alfa fetoproteína
ANOVA	Análisis de varianza
AR	Receptor de andrógenos
ARID4B/ARID4B	Proteína 4B que contiene un dominio interactivo rico en AT
BSA	Albúmina sérica bovina
CC	Coriocarcinoma
CDK	Cinasa dependiente de ciclina
CD30	Clúster de diferenciación 30
CE	Carcinoma embrionario
CGP	Célula germinal primordial
CO	Criotorquidia
DAB	Diaminobencidina
DMEM	<i>Medio Eagle Modificado por Dulbecco</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DGCR8	Región 8 Crítica para el Síndrome de <i>Digeroge</i>
DICER	Ribonucleasa tipo III dicer
EAU	Asociación Europea de Urología
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
GADPH/GADPH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
GalNAc-Ts	N-acetilgalactosaminiltransferasas
GALNT3/GALNT3	N-acetilgalactosaminiltransferasa tipo 3
GEPIA2	Del inglés <i>Gene Expression Profiling Interactive Analisis 2</i>
HRP	Peroxidasa de rábano
INSL3	Hormona similar a la insulina tipo 3
INCIFO	Instituto Nacional de Ciencias Forenses
INP	Instituto Nacional de Pediatría
INCan	Instituto Nacional de Cancerología
IHC	Inmunohistoquímica
JAK2	Tirosina Cinasa Janus 2
Keap1	Proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch
KIT	Receptor tirosina cinasa del protooncogén KIT
KPNA6/KPNA6	Carioferina subunidad alfa 6
LDH	Lactato deshidrogenasa
miRNA/miR	microRNA
mRNA	Ácido ribonucleico del tipo mensajero
NGF	Nervio genitofemoral
N/SCG	Neoplasia <i>in situ</i> de células germinales
nsTTCG	Tumor testicular de células germinales del tipo seminoma
NT2/D1	Línea celular NTERA2 cl. D1

PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos
PDGFRA	Receptor derivado de plaquetas tipo A
PHB2	Phohibitina 2
PI3k/AKT	Vía fosfatidilinositol-3-cinasa/AKT
PLAP	Fosfatasa alcalina placentaria
POU5F1	<i>POU clase 5 del homeodominio 1</i>
PRGC	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
pri-miRNA	microRNA primario
pre-miRNA	microRNA precursor
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RB1	Proteína del retinoblastoma 1
RBP	Proteína del retinoblastoma
RBP	Proteína de unión al RNA
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA
Rnasa	Ribonucleasa
RXFP2	Receptor 2 del péptido de la familia de la relaxina
sTTCG	Tumor testicular de células germinales del tipo seminoma
SRC	Protooncogen tirosina-proteína cinasa Src
STAT5	Transductor de señal y activador de la transcripción 5
TTCG	Tumor testicular de células germinales
TSV	Tumor de saco vitelino
UTR	Región no traducible
VIM	Vimentina

Resumen

La Criptorquidia (CO) o no descenso testicular es la malformación urológica más frecuente en edades pediátricas y es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo del tumor testicular de células germinales (TTCG) en la adultez. Se ha propuesto que los microRNAs (miRNAs) en particular el clúster hsa-miR-371-373, participan en la tumorigenesis testicular al favorecer la proliferación y el mantenimiento del estado pluripotente en las células germinales. Dentro de este clúster se encuentra el hsa-miR-372, el cual se ha identificado como un oncogén que inhibe la vía de p53 mediante la represión de LATS2. En este trabajo se evaluaron los ejes hsa-miR372/*ARID4B*/*ARID4B*, hsa-miR372/*GALNT3*/*GALNT3* y hsa-miR372/*KPNA6*/*KPNA6*, en muestras de pacientes con TTCG con el objetivo de analizar su posible correlación con las características clínico-patológicas de los pacientes mediante RT-qPCR, inmunohistoquímica y la correlación de Spearman, sumado a la modulación del hsa-miR-372 en la línea celular NT2/D1 para observar su efecto sobre los transcritos y los productos proteicos de *ARID4B*, *GALNT3* y *KPNA6* mediante RT-qPCR y Western blot.

En el grupo con TTCG se identificó una sobreexpresión significativa del hsa-miR-372 y una disminución de los transcritos *ARID4B*, *GALNT3* y *KPNA6* respecto al grupo control aunque no se encontraron diferencias significativas entre los niveles de expresión de los 4 transcritos con las características clínicas se encontraron correlaciones positivas entre la expresión de *GALNT3* y *KPNA6*, especialmente en las correlaciones de los grupos con TTCG del tipo no seminoma (nsTTCG) y el grupo en estadio I, sugiriendo una participación conjunta en la tumorigenesis. La inmunorreacción para Vimentina mostró una pérdida de la estructura testicular en las muestras con TTCG, mientras que para *GALNT3* sólo el 29.16% (7/24) de las muestras mostró inmunoreactividad, mientras que no se mostró para *ARID4B* y *KPNA6*. La expresión anormal de *GALNT3* podría asociarse con alteraciones en células de Sertoli en etapas tempranas; así como, en la glicosilación, el transporte nuclear y la remodelación de la cromatina. Tras la modulación del hsa-miR-372 en la línea celular NT2/D1 se confirmó su impacto sobre *GALNT3* observando un

aumento del transcrito y de la proteína al inhibir el miRNA. En conclusión, estos datos respaldan la hipótesis de que la modulación del hsa-miR-372 afecta sólo los niveles de expresión del eje *GALNT3/GALNT3* en la línea celular NTERA-2 de TCG, lo que concuerda con los niveles de expresión identificados para el eje hsa-miR-372/*GALNT3/GALNT3* en muestras de pacientes con TCG.

Abstract

Cryptorchidism (CO) or undescended testicles is the most common urological malformation in childhood and is one of the main risk factors for the development of testicular germ-cell tumors (TGCTs) in adulthood. It has been proposed that microRNAs (miRNAs), particularly the hsa-miR-371-373 cluster, play an important role in testicular tumorigenesis by promoting proliferation and maintaining the pluripotent state in germ-cells. As part of this cluster is hsa-miR-372, which has been described as an oncogene that inhibits the p53 pathway by repressing LATS2. For this study, the expressions of the hsa-miR372/ARID4B/ARID4B, hsa-miR372/GALNT3/GALNT3, and hsa-miR372/KPNA6/KPNA6 axes were evaluated in samples from patients with TGCT by RT-qPCR, immunohistochemistry, and Spearman correlation. Subsequently, the correlation between expression levels and the patients' clinicopathological characteristics was assessed. Finally, hsa-miR-372 expression was modulated in the NT2/D1 cell line to determine its effect on the gene expression of *ARID4B*, *GALNT3*, and *KPNA6* and their protein products by RT-qPCR and Western blot.

The TGCT group showed significant overexpression of hsa-miR-372 and underexpression of the *ARID4B*, *GALNT3*, and *KPNA6* transcripts compared to the control group. Although no significant differences were found between the expression levels of the four transcripts and the different clinical characteristics of TGCT, positive correlations were found between the expression of *GALNT3* and *KPNA6*, especially for seminomatous and non-seminomatous TGCT, as well as for clinical stage I, suggesting a joint role in tumorigenesis. Immunohistochemical analysis for vimentin showed a loss of testicular structure in the TGCT-positive samples, while for *GALNT3* only 29.16% (7/24) of the samples showed immunoreactivity, whereas no immunoreactivity was observed for *ARID4B* and *KPNA6*. Abnormal *GALNT3* expression could be associated with alterations in Sertoli cells at early stages, as well as in glycosylation, nuclear transport, and chromatin remodeling. After modulation of hsa-miR-372 in the NT2/D1 cell line, its

impact on *GALNT3* expression was confirmed by observing an increase in transcript and protein when miRNA was inhibited.

In conclusion, these data support the hypothesis that modulation of hsa-miR-372 affects only the expression levels of the *GALNT3*/*GALNT3* axis in the NTERA-2 cell line of TGCT, which is consistent with the expression levels identified for the hsa-miR-372/*GALNT3*/*GALNT3* axis in samples from TGCT patients.

1. Introducción

1.1 Descenso testicular

El descenso testicular en el humano es un proceso bifásico secuencial, entre las semanas 10 y 15 de gestación, ocurre la fase transabdominal, durante esta etapa los testículos se ubican en la parte superior del abdomen, cerca de los riñones concretamente, los cuales se encuentran anclados por dos estructuras, en la parte superior, por el ligamento suspensorio craneal que los conecta al diafragma; y en la parte inferior, por el gubernáculo que los fija a la región inguinal (Elamo, Virtanen y Toppari, 2022). Durante esta etapa del desarrollo embrionario, los testículos experimentan una migración hacia la región lumbar próxima al anillo inguinal (la entrada del futuro canal inguinal) (Mäkelä *et al.*, 2019), la hormona clave en esta fase es la hormona similar a la insulina tipo 3 (INSL3), la cual es producida por las células de Leydig. Esta hormona se une a su receptor, el receptor 2 de la familia de la relaxina (RXFP2), ubicado en el gubernáculo. Esta unión estimula la reducción del cordón del gubernáculo y la hinchazón del bulbo del gubernáculo, lo que facilita que el testículo se sitúe cerca del área inguinal. Adicionalmente, INSL3 también induce el ensanchamiento del canal inguinal, preparando el camino para la siguiente fase del proceso (Rodprasert *et al.*, 2024). Posteriormente, entre las semanas 25 a 35 de gestación ocurre la fase inguinoescrotal, en donde se lleva a cabo la migración activa de los testículos a través del canal inguinal, el gubernáculo se remodela e inicia su migración desde la región inguinal hacia el escroto a través del *processus vaginalis*, este proceso está regulado principalmente por los andrógenos, en especial la testosterona que actúa sobre el nervio genitofermoral (NGF) lo cual

provoca la liberación del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (PRGC) lo cual estimulará la migración del gubernáculo, cuando el testículo llega al escroto el *processus vaginalis* se cierra en su extremo superior, para evitar hernias o hidroceles (Hutson *et al.*, 2015; Mäkelä *et al.*, 2019; Virtanen *et al.*, 2007).

1.2 Criptorquidia

La criptorquidia (CO) o también llamado no descenso testicular, es la malformación urológica más frecuente en varones recién nacidos. A nivel mundial, la CO afecta del 2 al 9% de los varones a término (Barthold & Ivell, 2018) y del 30 al 45% en niños prematuros, en México no se cuenta con datos epidemiológicos, sin embargo; en el Instituto Nacional de Pediatría se registran anualmente en promedio 110 casos de CO no sindromática. Se estima que posterior al descenso espontáneo, después del primer mes de vida, hasta el 1.5% de varones a término aun presentan uno o ambos testículos sin descender (Ciongradi *et al.*, 2021; Radmayr, 2017).

La CO puede clasificarse de acuerdo con el grado de descenso testicular como CO abdominal, inguinal, supraescrotal o ectópica, lo que significa que no sigue la ruta normal de descenso testicular; de acuerdo con la lateralidad, como CO unilateral o bilateral (Figura 1); de acuerdo con la etapa de presentación, como CO congénita o adquirida; o de acuerdo con su etiología, como CO sindromática o no sindromática (Elamo *et al.*, 2022; Radmayr, 2017).

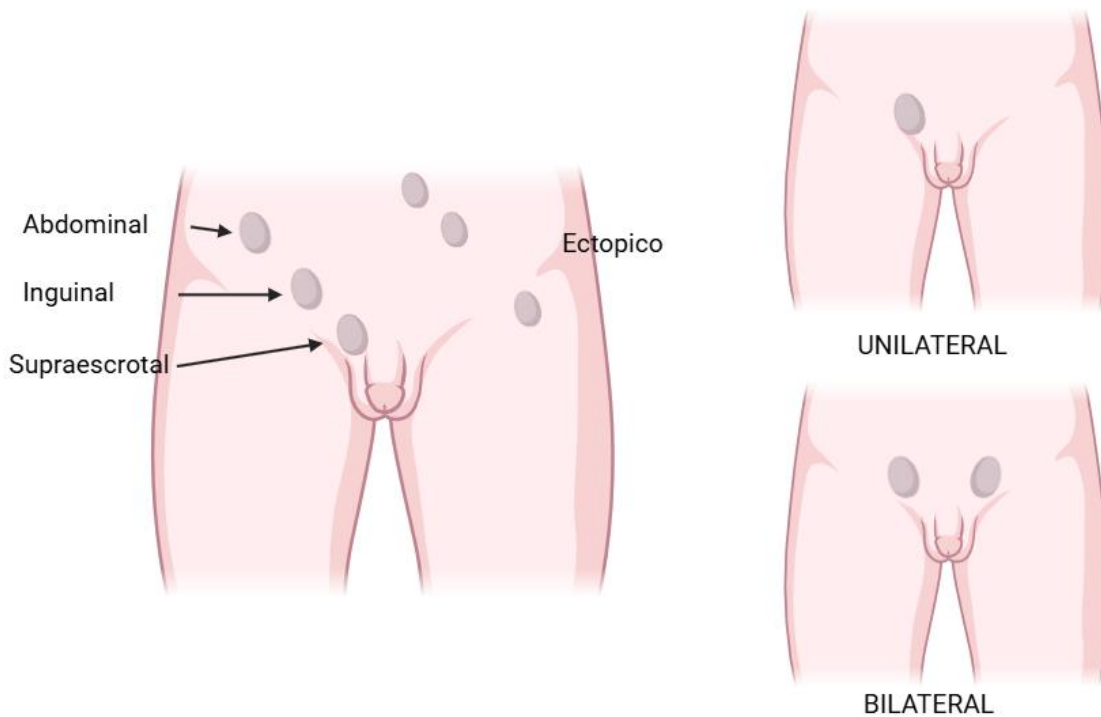


Figura1. Clasificación de la CO. La CO se puede clasificar por la localización, ya sea Abdominal, inguinal, supraescrotal y ectópico, cuando está en una localización que no coincide con el descenso normal. también se puede clasificar por el grado de afección, unilateral cuando solo afecta a un testículo o bilateral cuando afecta a ambos. Creado con BioRender.com

El tratamiento correctivo de la CO es quirúrgico, para esto se considera un periodo de 6 meses de edad, dentro del cual se puede presentar el descenso testicular espontáneo en el paciente, posterior a este periodo se da un plazo de 12 meses para realizar la corrección quirúrgica; siendo así los primeros 18 meses de vida el lapso recomendado para corregir la CO y limitar sus consecuencias sobre la fertilidad y el riesgo oncológico durante la pubertad (Hildorf *et al.*, 2020).

A nivel clínico, la CO se ha identificado como un factor de riesgo importante para el desarrollo del tumor testicular de células germinales (TTCG), a partir de un metaanálisis se determinó que esta malformación confiere un riesgo relativo (RR)

de 4.8 (con intervalos de confianza al 95% de 4.0-5.7) de desarrollar TTCG a partir de la pubertad en comparación con la población general (Dieckmann y Pichlmeier, 2004). Sumado a esto, se ha reportado que del 5 al 9% de los pacientes con diagnóstico confirmado del TTCG cursaron con CO durante la infancia (Gurney *et al.*, 2017). Recientemente, se han publicado algunos reportes que demuestran que algunos pacientes con CO mantienen de manera persistente gonocitos con capacidad pluripotente más allá del año de vida (Kvist *et al.*, 2018; Viguera-Villaseñor *et al.*, 2015), periodo en el cual estos gonocitos debieron diferenciarse hacia espermatogonias para posteriormente durante la pubertad sustentar una espermatogénesis adecuada (Tasian *et al.*, 2009).

1.3 Teoría del gonocito

Los gonocitos son las células precursoras fetales/neonatales de las espermatogonias indiferenciadas, consideradas como el reservorio de por vida de células troncales germinales. El término gonocito fue acuñado en 1957 por Clemont y Perey, para nombrar a las células germinales primordiales (CGP) que residen en la gónada durante su desarrollo (Culty, 2009). Los gonocitos son células circulares grandes que presentan un núcleo prominente que va de los 10 a los 12 mm y de uno a tres nucleolos (Drumond *et al.*, 2011) y presentan un citoplasma transparente casi vitreo en forma de anillo (Culty, 2009). De acuerdo con evidencia científica, se propone que los gonocitos son los responsables de desarrollar la neoplasia *in situ* de células germinales (N/SCG), que es considerada como la lesión precursora del TTCG (Viguera-Villaseñor *et al.*, 2015). Esta hipótesis se basa en las similitudes morfológicas y en la presentación de una estructura de la cromatina permisiva, lo

que se traduce en una actividad transcripcional elevada de factores de transcripción y proteínas que regulan la capacidad pluripotente y proliferativa, como POU5F1, TFAP2C, KIT, PLAP y NANOG entre los gonocitos y las células atípicas de la *NISCG* (Almstrup *et al.*, 2010; Chavez-Saldana, 2017). De tal manera que, si los gonocitos no se diferencian a espermatogonias y persisten más allá de la etapa neonatal en el testículo, estos deben ser programados para morir mediante apoptosis; lo que reflejará problemas de fertilidad en el futuro, si esto falla; los gonocitos se mantendrán como blancos de malignización testicular (Tien y cols,2020). Se ha reportado que PDGFR estimula a la familia de las cinasas SRC, así como; a las vías de señalización JAK2/STAT5, lo cual favorece la diferenciación de los gonocitos impulsada por el ácido retinoico (AR) (Manku y Culty, 2015). Adicionalmente, se ha detectado una variante de PDGFRA en los gonocitos que es similar a la que se ha identificado en el TTCG del tipo seminoma (sTTCG), lo cual podría explicar otra posible relación entre la persistencia de los gonocitos y el desarrollo del TTCG (Palumbo *et al.*, 2002). Actualmente, existe evidencia que ha demostrado tanto en modelos animales como en pacientes pediátricos con CO, la presencia de gonocitos persistentes con una expresión anormal de las proteínas POU5F1, TFAP2C, KIT, PLAP y SALL4 en edades donde no deberían presentarse (Figura 2) (Viguera-Villaseñor *et al.*, 2015).

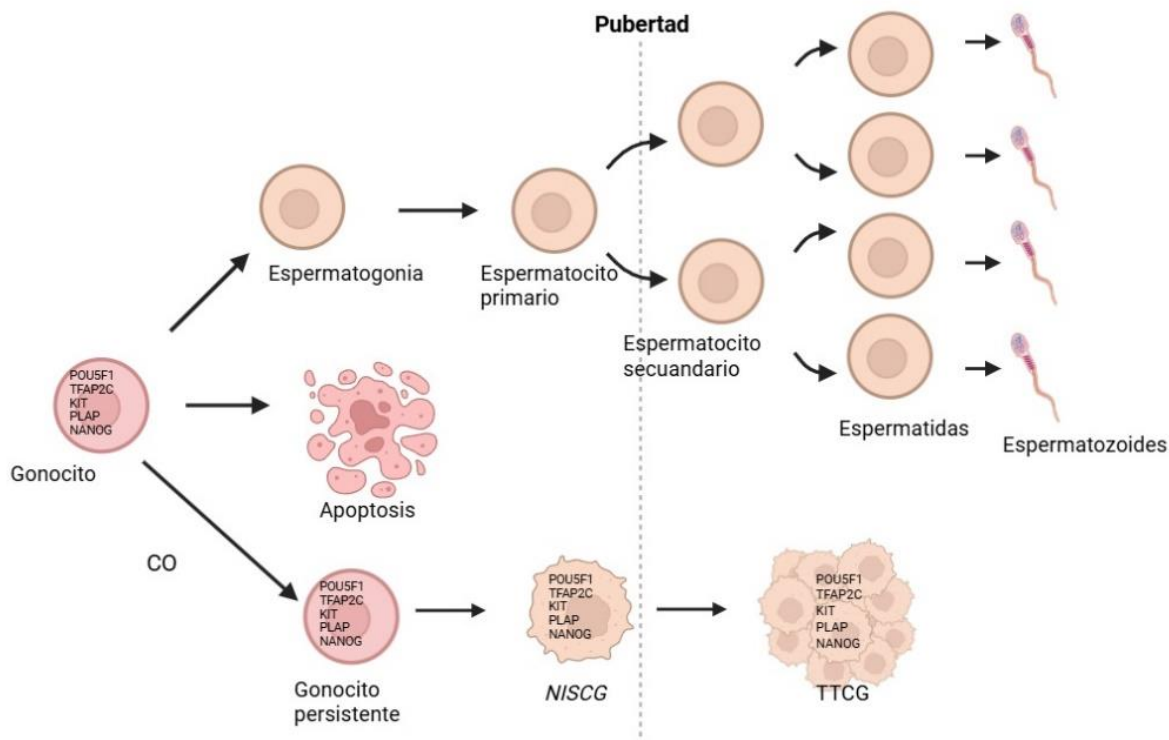


Figura 2. Teoría del gonocito como posible blanco de malignidad para el desarrollo del TTCC. Esta teoría propone que a partir de los gonocitos no diferenciados se desarrolla la *N/SCG* que da pie al desarrollo del TTCC. Creado con BioRender.com

1.4 Tumor testicular de células germinales

El TTCC es la neoplasia sólida más común en varones de 15 a 44 años de edad a nivel mundial teniendo una incidencia de 2.9 por cada 100,000 varones (Batool *et al.*, 2019), durante el siglo XX se observó un aumento en la incidencia del TTCC, en especial entre hombres de ascendencia europea, uno de los ejemplos es Dinamarca, donde aumentó de 7.0 a 10.01 por cada 100,000 habitantes entre los años 1970 y 2003 (Almstrup *et al.*, 2020). De acuerdo con datos obtenidos de GLOBOCAN (<https://gco.iarc.fr/>), en México el TTCC representa la neoplasia más incidente (9.3 por cada 100,000 habitantes) y la segunda causa de muerte asociada al cáncer en varones de la misma cohorte de edad (2.9 por cada 100,000 habitantes).

El diagnóstico de esta neoplasia comienza por un examen físico y es seguido de otro tipo de pruebas como el ultrasonido, marcadores séricos tumorales y la evaluación patológica confirmatoria (Batool *et al.*, 2019). Físicamente, el TTCG suele manifestarse como una masa testicular indolora, sin embargo; algunos pacientes pueden presentar dolor escrotal, dolor localizado y en espalda y flanco. Durante la exploración física se intenta evaluar las características de la tumoración y se busca evidencia de metástasis a distancia principalmente en los ganglios linfáticos y abdomen. La evaluación imagenológica tiene como objetivo confirmar la presencia de masa tumoral, determinar si es intra o extra testicular; valorar el tamaño y la localización anatómica; y examinar el testículo contralateral para descartar la presencia de otras lesiones o identificar factores de riesgo para la *NISCG* (EAU Guidelines On Testicular Cancer - Uroweb, s. f.). Los marcadores séricos en el TTCG son imprescindibles y estos consisten en la determinación de las concentraciones de la α -feto proteína (AFP), la gonadotropina coriónica humana fracción β (β GH) y el lactato deshidrogenasa (LDH); lo cuales se presentan en bajas concentraciones o indetectables en un individuo sano, sin embargo; en pacientes con TTCG se presentan concentraciones elevadas. Se estima que estos marcadores presentan en promedio un 60% de sensibilidad y especificidad para el diagnóstico del TTCG (Batool *et al.*, 2019) (Dieckmann *et al.*, 2012).

De acuerdo con la *American Cancer Society*, los tumores testiculares se dividen en dos grandes grupos, los que se generan a partir del cordón sexual o estroma con un origen en células de Sertoli y células de Leydig, que corresponden al 5% de los tumores testiculares; y los que se desarrollan a partir de las células germinales,

también conocidos como TTCG que corresponden al 95% de los casos restantes (<https://www.cancer.org/>). El TTCG a su vez, se divide en tres grupos que dependen principalmente de la edad de presentación en el paciente y su origen embrionario. El tipo I se presenta en pacientes en etapa infantil, los cuales desarrollan teratomas y/o tumores de saco vitelino, muy raramente mixtos (Al-Obaidy y Idrees, 2021), que se originan a partir de las células germinales primordiales (CPG) o de los gonocitos (Oosterhuis y Looijenga, 2019); el tipo II es el más común de los TTCG, se presenta en jóvenes y adultos en un intervalo de 15 a 45 años, el cual se origina durante la pubertad a partir de la *N/SCG*, que se encuentra ligada a la persistencia de gonocitos (Looijenga *et.al.*, 2007). El TTCG tipo II se divide a su vez, en dos grandes grupos, sTTCG y no seminoma (nsTTCG), este último, puede estar constituido de manera mixta o pura por cuatro tipos tumorales; carcinoma embrionario (CE), coriocarcinoma (CC), tumor de saco vitelino (TSV) y teratoma (TE) (Vasdev *et.al.*, 2013); el tipo III se presenta en hombres mayores (53 años promedio), los cuales desarrollan el seminoma espermatocítico, que como su nombre lo indica, tiene su origen en los espermatocitos y/o espermatogonias (Figura 3) (Batool *et.al.*, 2019; Oosterhuis y Looijenga, 2019).

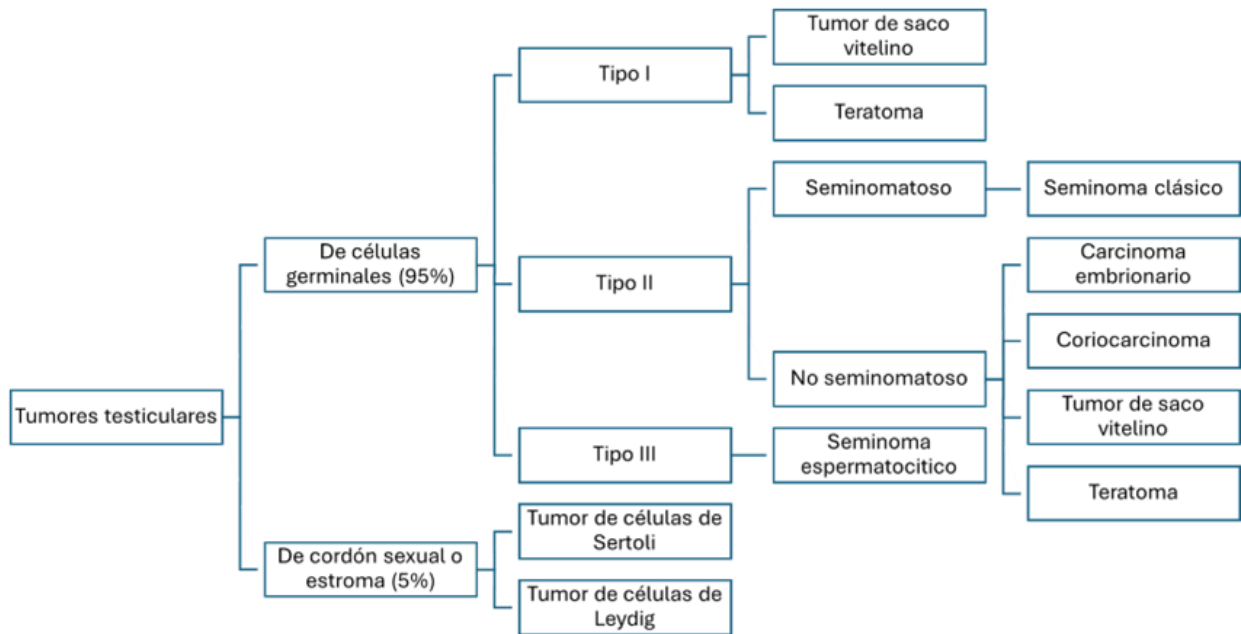


Figura 3. Clasificación de los tumores testiculares. Los tumores testiculares se clasifican en dos grupos dependiendo el origen del tumor (de células germinales o de células del cordón sexual o estroma, los tumores de células germinales de clasifican a su vez en tres tipos, donde el tipo I abarca el tumor de saco vitelino y el teratoma, el tipo II que engloba a los sTTCCG y nsTTCCG, y el tipo II que engloba a los seminomas espermatocítico.

Durante la práctica clínica, se utilizan diversos marcadores histopatológicos para poder clasificar el TTCCG y dar la pauta para su abordaje, como POU5F1, el cual es positivo en la *N/ISCG*, CE y en sTTCCG; KIT, que es positivo para la *N/ISCG* y negativo para CE; CD30, positivo para CE; Glipican 3 y SALL4, positivos para el tumor de saco vitelino (Batoool *et al.*, 2019). A pesar de contar con estos marcadores histopatológicos, en los últimos años se ha introducido al diagnóstico y pronóstico clínico, el uso de los microRNAs como biomarcadores más sensibles y específicos en esta neoplasia.

1.5 microRNAs

Los microRNAs (miRNAs) son una familia de moléculas de RNA cortos no codificantes, con una longitud de 19 a 25 nucleótidos, que participan en la regulación

génica a nivel post transcripcional donde interactúa la región semilla del miRNA que va de los 6 los 8 nucleótidos de longitud con la región 3'UTR del RNA mensajero (mRNA) (MacFarlane y R. Murphy, 2010; Peng y Croce, 2016). Un solo miRNA puede tener cientos de mRNA dianas, por lo tanto, puede influir en la expresión de muchos genes que suelen estar implicados en una vía de señalización funcional (Peng y Croce, 2016; Vishnoi y Rani, 2023).

La biogénesis canónica de los miRNAs comienza con la síntesis de un transcrito largo primario (pri-miRNA) por la RNA polimerasa II, que rápidamente es procesado en el núcleo por el complejo microprocesador conformado por DROSHA y DGCR8, estos liberan el miRNA precursor (pre-miRNA), una estructura de tallo-bucle de ~85 nucleótidos. El pre-miRNA sale al citoplasma celular por medio del complejo Ran/GTP/Exportina 5, una vez fuera del citoplasma el pre-miRNA es procesado por la RNAsa III DICER la cual corta la estructura de bucle del pre-miRNA dejando un miRNA dúplex de ~20–22 nucleótidos, este dúplex será cargado al complejo de silenciamiento por RNA denominado RISC compuesto por la proteína Argonata 2, Dicer, TRBP o PACT y GW182, el cual guía al miRNA hacia el mRNA diana para llevar a cabo la función regulatoria (Peng y Croce, 2016; Vishnoi y Rani, 2023). En general, los mRNA objetivo que contienen secuencias que son complementarias al miRNA serán degradados por un mecanismo de interferencia de RNA, mientras que los mRNA con secuencias parcialmente complementarias en su región 3'UTR estarán sujetos a la inhibición temporal de la traducción, y en menos medida también a la degradación de mRNA (Voorhoeve *et al.*, 2006) (Figura 4).

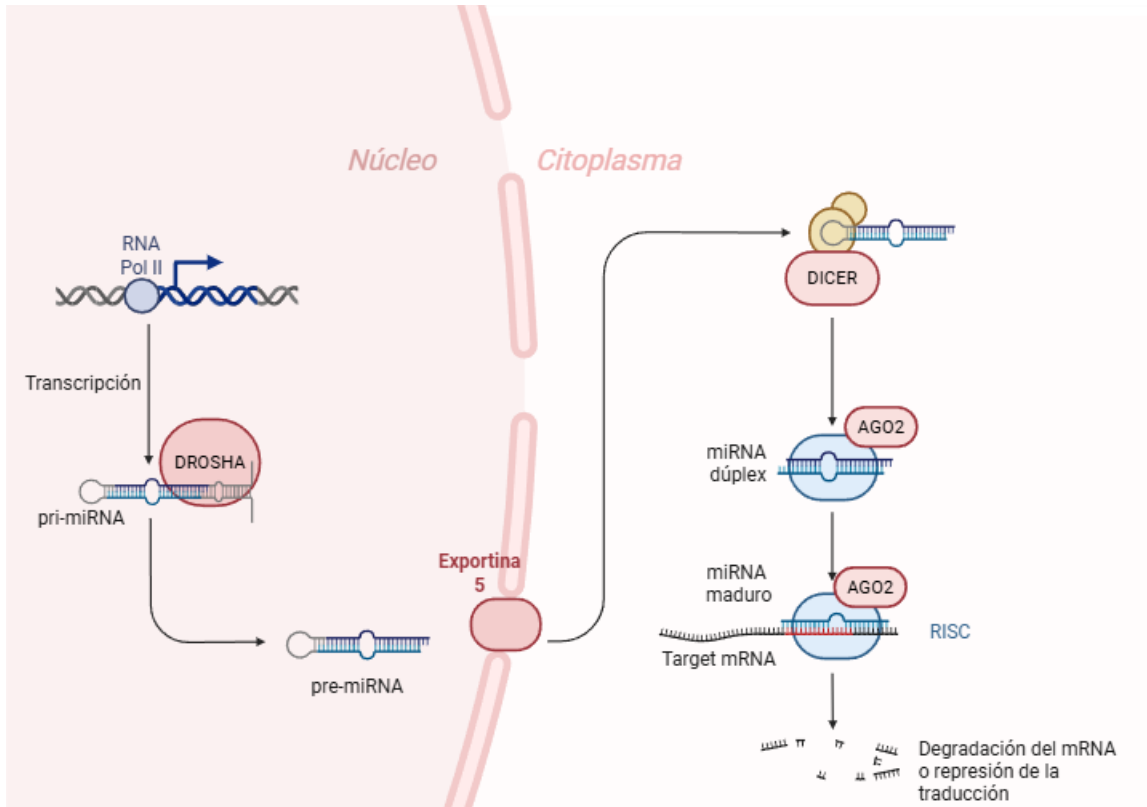


Figura 4. Biogénesis de los microRNAs, La biogénesis de los miRNAs inicia en el núcleo celular, a partir de la transcripción mediada por la RNA Pol II obtenemos el pri-miRNA, el cual será procesado por DROSHA y DGCR8 para obtener un pre-miRNA que será transportado al citoplasma por la enzima exportina 5, donde DICER cortara la estructura de bucle y se obtendrá un miRNA duplex, que madurara en compañía del complejo de silenciamiento RISC y tendrá como objetivo la represión de la traducción, o bien la degradación del mensajero blanco. Creado con BioRender.com.

Los cambios en los niveles de expresión de los miRNAs pueden ser consecuencias de los cambios fisiológicos en el cuerpo, como el embarazo, algunas enfermedades, infecciones virales, e inclusive el cáncer, lo cual permite su uso para el diagnóstico y monitoreo del estado de salud de los pacientes. El uso de los miRNAs como diagnóstico, se debe al descubrimiento de la presencia de ellos en distintos fluidos corporales, como son la orina, sangre, lavado bronquial, líquido sinovial, leche, saliva, líquido cefalorraquídeo, entre otros (Smolarz *et al.*, 2022).

2. Antecedentes

2.1 Expresión del clúster hsa-miR-371-373 en el tumor testicular de células germinales

Se ha descrito que el clúster hsa-miR-371-373 se encuentra sobreexpresado en TTCG, y que los niveles de expresión de este clúster se normalizan posterior a la orquiectomía y/o las quimioterapias, (Chavarrriaga y Hamilton, 2023) lo llevó al uso del hsa-miR-371 como un biomarcador diagnóstico y pronóstico en la práctica clínica actual en Europa. Recientemente, esta prueba diagnóstica es distribuida por *GOLD STANDARD DIAGNOSTICS*, la cual mide la abundancia relativa del hsa-miR-371 en una muestra de suero o plasma sanguíneo. Adicionalmente, se requiere la utilización de un miRNA como control endógeno, destacando una sensibilidad del 100% y una especificidad del 96% (M371-Test, s. f.).

Por su parte, se ha reportado que la expresión del hsa-miR-372 y el hsa-miR-373 previene la inhibición de CDK causada por el aumento de los niveles de p21^{cip1} en respuesta al estrés oncogénico, un análisis de los cambios en la expresión genética mostró que LATS2 está subexpresado en las células que sobreexpresan el hsa-miR-372 y el hsa-miR-373, experimentos posteriores demostraron que el hsa-miR-372 y el hsa-miR-373 se dirigen a la región 3'UTR del mRNA de *LATS2*, lo que conduce a la inhibición de la traducción de la proteína LATS2 (Voorhoeve *et al.*, 2006).

2.2 *ARID4B*, *GALNT3* y *KPNA6* como posibles blancos del hsa-miR-372

Recientemente, un análisis *in silico* reportado por García Andrade y cols., en el año 2023, encontró que *ARID4B*, *GALNT3* y *KPNA6* como posibles blancos del hsa-

miR-372 en el TTCG, los cuales además, podrían explicar la relación a nivel molecular entre la presentación de CO en etapa infantil y el riesgo de desarrollo de la neoplasia testicular durante la pubertad y la etapa adulta (García-Andrade *et al.*, 2023).

ARID4B, junto con ARID4A, son miembros del complejo de remodelación de la cromatina. Estos actúan como represores transcripcionales tras ser reclutados por la proteína RB (Wu *et al.*, 2013) y se expresan en células germinales, en donde ARID4B podría funcionar como un enlace funcional entre las vías del receptor de andrógenos (AR) y el correpresor transcripcional RB1 (RB). Estas vías son esenciales para la regulación de la meiosis espermatogénica. En particular, la vía AR es fundamental para que las células germinales progresen más allá de las fases de paquiteno o diploteno durante la meiosis, proceso que depende de la presencia de AR en las células de Sertoli. RB, además, interactúa con AR y actúa como un coactivador de su actividad transcripcional (Chen *et al.*, 2015). Cabe señalar que, ARID4B no es un marcador utilizado en el pronóstico ni diagnóstico del TTCG, en tejido tumoral su inmunoreactividad es baja o indetectable (<https://www.proteinatlas.org/>).

GALNT3, es una enzima que tiene una alta abundancia en testículo y páncreas, aunque se ha reportado que su delección en ratones produce una pérdida notable de la fertilidad, aún no está del todo clara su función en el testículo. Sin embargo, se ha sugerido que juega un papel importante en la O-glicosilación de algunas de las proteínas involucradas en la biogénesis del acrosoma en el aparato de Golgi de las espermátidas (Miyazaki *et al.*, 2013). Dichos cambios en la glicosilación son

una de las principales características del cáncer, GALNT3 mostró una fuerte asociación con un mal pronóstico en el desarrollo de glioma de bajo grado (Pucci *et al.*, 2022). Se ha reportado que la inhibición de la glicosilación disminuyó el crecimiento de las células troncales cancerosas de páncreas (Barkeer *et al.*, 2018). Adicionalmente, mutaciones en este gen han sido descritas en la microlitiasis testicular; algo importante para tener en cuenta es que la microlitiasis testicular no representa una condición maligna, a menos que se asocie con otras enfermedades urológicas como las hipospadias, infertilidad y la CO, lo cual se considera como un factor de riesgo para el desarrollo de TTCG (Campagnoli *et al.*, 2006). Cabe señalar que, GALNT3 no es utilizado como marcador pronóstico ni diagnóstico del TTCG, en tejido tumoral su inmunoreactividad es media, baja o indetectable (<https://www.proteinatlas.org/>).

KPNA6, es un miembro de la familia de las importinas α , proteínas que participan en la vía clásica de importación nuclear. Estas actúan como adaptadores que unen el sustrato a importar junto con las importinas β , facilitando así, su transporte al núcleo (Köhler *et al.*, 1999). Aunque su función específica en el testículo no ha sido completamente caracterizada, se ha sugerido que, al ser un transportador nuclear, KPNA6 podría influir en la diferenciación de células germinales mediante la regulación del ingreso de factores de transcripción al núcleo. En modelos murinos, Kpna6 promueve la importación nuclear de Keap1, una proteína que regula al factor de transcripción Nrf2. Nrf2 es un regulador clave de la homeostasis redox celular y activa la transcripción de genes relacionados con enzimas antioxidantes, desintoxicación y transporte de xenobióticos (Sun *et al.*, 2011). Cabe señalar que,

KPNA6 no es un marcador utilizado para el pronóstico ni diagnóstico del TCCG, en tejido tumoral su inmunoreactividad es alta, media, o baja (<https://www.proteinatlas.org/>).

3. Hipótesis

La modulación del hsa-miR-372 en la línea celular NT2/D1 afectará los niveles de expresión de *ARID4B*, *GALNT3*, *KPNA6*, y la Inmunodetección de las proteínas correspondientes, correlacionándose con los niveles de expresión tumoral de hsa-miR-372 y los transcritos de *ARID4B*, *GALNT3* y *KPNA6* en muestras de pacientes con TCCG.

4. Justificación

En la actualidad, existe un aumento considerable en la incidencia y mortalidad del TCCG a nivel mundial y en nuestro país. Uno de los padecimientos de riesgo para el desarrollo de esta neoplasia en edad adulta, es la presentación de CO en edad pediátrica. Se ha reportado que algunos pacientes con CO mantienen gonocitos persistentes en edades más allá del año de vida, los cuales sobreexpresan algunos marcadores de riesgo para el desarrollo del TCCG. Sin embargo, se desconocen las vías moleculares que expliquen la relación entre ambos padecimientos. Resultados *in silico* de nuestro grupo de trabajo muestran a los transcritos de *ARIB4B*, *GALNT3*, *KPNA6* como posibles blancos regulados por el hsa-miR-372. Por lo que, la realización de este trabajo, ayudará a caracterizar los niveles de expresión del hsa-miR-372, los transcritos de *ARID4B*, *GALNT3*, *KPNA6* y la Inmunodetección de las proteínas codificadas por estos mismos en la línea celular NT2/D1 y en muestras

de pacientes con de TTCG, con el objetivo de identificar su posible correlación en la expresión entre los componentes de cada eje; así como, la expresión tumoral de estos marcadores con algunas de las características clínico-patológicas de los pacientes. Lo que nos ayudará en un futuro a establecer marcadores moleculares por los cuales pacientes pediátricos con CO desarrollan la neoplasia testicular en edad adulta.

5. Objetivo general

Evaluar los ejes hsa-miR-372/*ARID4B*/*ARID4B*, hsa-miR-372/*GALNT3*/*GALNT3* y hsa-miR-372/*KPNA6*/*KPNA6* en la línea celular NTERA-2 cl-D1 y su correlación con muestras de pacientes con TTCG.

5.1 Objetivos específicos

- Determinar los niveles de expresión del hsa-miR-372 y de los transcritos *ARID4B*, *GALNT3* y *KPNA6* en muestras de TTCG.
- Describir a nivel histológico la inmunorreactividad para *ARID4B*, *GALNT3*, *KPNA6* en muestras de TTCG.
- Correlacionar los resultados de los ejes hsa-miR-372/*ARID4B*/*ARID4B*, hsa-miR372/*GALNT3*/*GALNT3* y hsa-miR-372/*KPNA6*/*KPNA6* y las características clínico-patológicas de los pacientes.
- Evaluar el efecto de la modulación del hsa-miR-372 en la línea celular NT2/D1 sobre los niveles de expresión de los transcritos de *ARID4B*, *GALNT3*, *KPNA6* y la Inmunodetección de las proteínas codificadas por estos mismo.

6. Estrategia experimental

En el presente trabajo de tesis contempló cuatro fases experimentales, descritas a continuación:

Fase 1: Selección de pacientes con tumor testicular de células germinales (TTCG) (grupo TTCG) y de individuos control (grupo Control), provenientes del INCan y del INCIFO respectivamente. A partir del tejido testicular de ambos grupos se determinaron los niveles de expresión relativa de hsa-miR-372 y de los transcritos *ARID4B*, *GALNT3* y *KPNA6*.

Fase 2: Determinación de la inmunorreactividad de las proteínas *ARID4B*, *GALNT3* y *KPNA6* mediante ensayos de inmunohistoquímica a partir del tejido testicular.

Fase 3: Determinación de la correlación entre los niveles de expresión de los componentes de cada eje, así como; con las características clínico-patológicas de los pacientes con TTCG.

Fase 4: Evaluación del efecto de la modulación de hsa-miR-372 en la línea celular NT2/D1, sobre los niveles de expresión de los transcritos *ARID4B*, *GALNT3* y *KPNA6*, así como, sobre la Inmunodetección de las proteínas codificadas por estos genes, como se muestra en la figura 5.

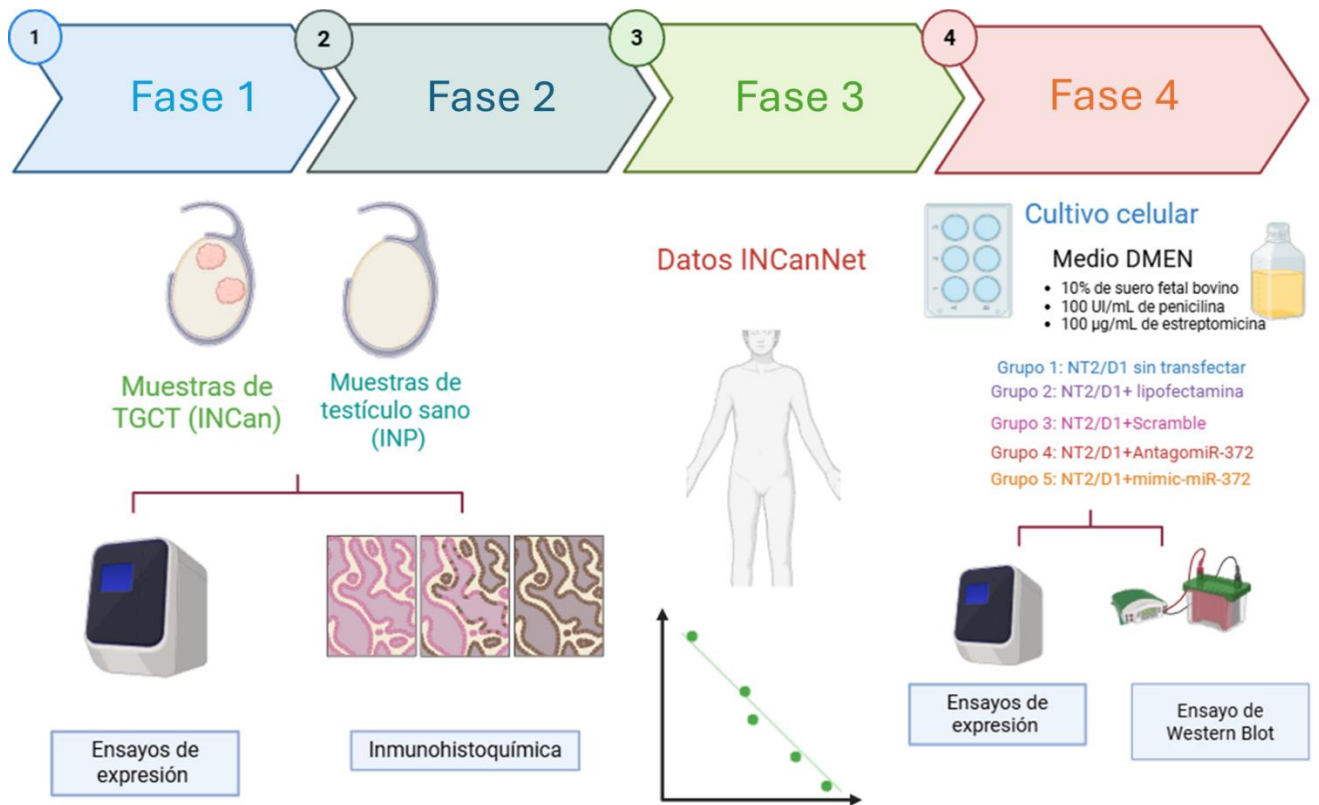


Figura 5. Estrategia experimental. Cada fase correspondió a un objetivo, en las fases 1 y 2 se trabajó con Tejido humano, en la fase 3 con los datos obtenidos a partir de la búsqueda de expedientes en I INCanet y los resultado de expresión de la fase 1, por último, en la fase 4 se trabajó con cinco grupos obtenidos de la línea celular NT2/D1. Creado con BioRender.com

7. Materiales y métodos

7.1 Selección de muestras

Respecto al grupo Control, se incluyeron a conveniencia 5 muestras de archivo de tejido testicular, las cuales cumplieron con las siguientes características:

1. Muestras provenientes de varones en etapa peripuberal.
2. Muestras histológicamente integra.
3. Muestras con un epitelio seminífero normal acorde a la edad.
4. Muestras que contaran con el consentimiento informado para su uso.

Respecto al grupo TTCG, se incluyeron a conveniencia 26 muestras de tejido tumoral con diagnóstico confirmado de TTCG por el departamento de patología, los cuales cumplieron con las siguientes características:

1. Muestras de TTCG tipo II.
2. Muestras de TTCG primario.
3. Muestras de pacientes sin tratamiento quimioterapéutico o radioterapéutico.
4. Muestras histológicamente íntegras.
5. Muestras que contaran con el consentimiento informado para su uso.

Para este último grupo, se obtuvieron las características clínico-patológicas mediante la revisión de los expedientes clínicos electrónicos en el INCanNet y posteriormente se confirmaron los datos recabados con la revisión de los expedientes físicos. Para este trabajo de tesis se consideraron como datos de relevancia la edad al diagnóstico, lateralidad del tumor, antecedentes personales de CO, edad de realización de la orquidopexia, antecedentes familiares de TTCG, el

estadio clínico del paciente, histología del tumor, presencia y localización de metástasis, presencia de microlitiasis y presencia de *NISCG*.

7.2 Determinación de la expresión relativa del hsa-miR-372 y de los transcritos de *ARID4B*, *GALNT3* y *KPNA6* en muestras de TTCG

Para esto, se extrajo RNA total de tejido fresco control y de TTCG según las instrucciones del Kit comercial RNeasy® de QIAGEN®. Las reacciones de RT para el hsa-miR-372 se llevaron a cabo utilizando el ensayo Stem-loop RT miRNA (AppliedBiosystems); mientras que, para los transcritos de *ARID4B*, *GALNT3* y *KPNA6*, se realizaron con las sondas Taqman hsa-miR-372 (#4426961-RT), RNU6B (#4427975-RT), GAPDH (#402869), *ARID4B* (#4331182), *GALNT3* (#4331182) y *KPNA6* (# 4331182), el kit comercial TaqMan® Reverse Transcription Reagents de Thermo Fisher® (#N8080234). En ambos casos, se retro-transcribieron 100 ng de RNA total utilizando iniciadores RT en bucle (Applied Biosystems) siguiendo el protocolo del fabricante. La detección del hsa-miR-372, *ARID4B*, *GALNT3* y *KPNA6* se realizó con las mismas sondas Taqman (TM en el caso el hsa-miR-372 y RNU6B), el TaqMan Universal PCR Master Mix (AppliedBiosystems). La qPCR se llevó a cabo en un equipo 7500 Real-Time PCR System (AppliedBiosystems). La expresión relativa se determinó utilizando el método comparativo Ct ($2^{\Delta\Delta Ct}$). RNU6B y *GAPDH* se utilizaron como controles endógenos para la normalización de datos, según fuera el caso, mientras que H₂O libre de RNAsas se utilizó como control negativo.

7.3 Evaluación histológica y determinación de la inmunorreactividad para ARID4B, GALNT3 y KPNA6 en muestras de TTCCG

Para la evaluación histológica y los ensayos de inmunohistoquímica, se realizaron cortes de 4 µm de grosor de tejido incluido en parafina y se montaron en laminillas cubiertas con gelatina. A partir de estas, se desparafinaron, para la evaluación histológica se realizó la tinción Hematoxilina y eosina (H&E). Para la inmunohistoquímica, posterior a la desparafinar se desenmascararon los epítopes utilizando citrato de sodio (BioSB), se marcó el contorno alrededor de los tejidos con un lápiz hidrófobo y se acomodaron las laminillas en una cámara húmeda, se lavaron con PBS 1X-Tween 20 al 0.1% (Sigma-Aldrich) para permeabilizar la membrana, se lavaron en repetidas ocasiones con PBS 1X y se incubaron con BSA al 5% (2 horas). Posterior a esto, se incubó con el anticuerpo primario monoclonal de humano para Vimentina, ARID4B, GALNT3 Y KPNA6, las diluciones se realizaron en BSA al 5% de la siguiente manera; vimentina en 1:50, ARID4B en 1:150, GALNT3 en 1:200 y KPNA6 1:150, se incubó durante 24 horas, al finalizar el tiempo de incubación se realizaron varios lavados utilizando PBS 1X Tween-20, se agregó el anticuerpo secundario, anti-ratón en el caso de vimentina y anti-conejo en el resto, ambos fueron diluidos 1:200 en BSA al 5%, se dejó incubar por 2 horas, posteriormente se realizaron lavados con PBS 1X, se incubó con el complejo Avidina+Biotina (A+B) durante 1 hora, posteriormente, se revelaron utilizando diaminobencidina GV825 DAKO y se contrastaron con Hematoxilina de Harris, finalmente fueron montadas con resina de montaje y un cubreobjetos. Se

observaron distintas secciones de los cortes buscando la presencia o ausencia de inmunorreactividad, para esto se utilizó el sistema de análisis de imágenes (Image-Pro-Plus 6.0). Se tomó nota de las muestras que presentaron una inmunorreactividad específica y reproducible, estas se consideraron como inmunorreactivas.

7.4 Correlación de los niveles de expresión del hsa-miR-372, *ARID4B*, *GALNT3* Y *KPNA6* con las características clínico-patológicas de los pacientes

La correlación entre los niveles de expresión del hsa-miR-372, de los transcritos y las variables clínico-patológicas, se determinó mediante el coeficiente (ρ) de Spearman, utilizando el software *Rstudio* 2025.09.1. Las variables categóricas se anotaron como 1= presencia y 0= ausencia. Los datos fueron organizados en hojas de Excel y exportados en formato CSV, se empleó la función **rcorr()** del paquete **Hmisc** para calcular la matriz de correlaciones de Spearman (r) y los valores de significancia estadística (p). Para la interpretación y apreciación de los resultados se generó un mapa de calor utilizando el paquete **corrplot**. En total se realizaron 6 análisis, los cuales se describen a continuación:

1. Correlación global: se correlacionaron los niveles de expresión del hsa-miR-372, *ARID4B*, *GALNT3* y *KPNA6* de todas las muestras de TTCG.
2. Correlación por tipo histológico nsTTCG: se correlacionaron los niveles de expresión de los 4 transcritos y datos clínico-patológicos como antecedentes de CO, microlitiasis, *NISCG*, metástasis y estadio clínico.

3. Correlaciones por estadio clínico (I y III): se correlacionaron los niveles de expresión de los 4 transcritos y datos clínico-patológicos como antecedentes de CO y microlitiasis, *NISCG*, metástasis y tipo histológico.
4. Correlaciones por presencia o ausencia de *NISCG*: se correlacionaron los niveles de expresión de los 4 transcritos y datos clínico-patológicos como antecedentes de CO, microlitiasis, metástasis y tipo histológico.

La fuerza de las correlaciones se determinó como se enlista a continuación, adicionalmente se consideró estadísticamente significativo con valores de $p \leq 0.05$.

- 0.00 – 0.19 Correlación muy débil
- 0.20 – 0.39 Correlación débil
- 0.40 – 0.69 Correlación moderada
- 0.70 – 1 Correlación fuerte

7.5 Modulación de la expresión de *ARID4B*, *GALNT3* y *KPNA6* mediada por el hsa-miR-372

Para esto, se utilizó la línea celular NT2/D1, la cual se cultivó en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Life Technologies), suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂, a una humedad del 95%. Para el mantenimiento de los cultivos, se realizaron pases cuando la confluencia alcanzaba el 80%. Para la transfección, se sembraron 200,000 células por pozo en una placa de 6 pozos, después de 24 horas se realizó la transfección con lipofectamina, obteniendo así 5

grupos de estudio; 1) NT2/D1 sin transfectar (condición basal), 2) NT2/D1+lipofectamina (con agente de transfección), 3) NT2/D1+Scramble (como control experimental), 4) NT2/D1+mimic-miR-372 y 5) NT2/D1+AntagomiR-372 la transfección de los últimos tres grupos se realizó a una concentración de 30 nM. Posteriormente, se obtuvo el RNA total por el método de trizol, para realizar los ensayos de expresión relativa del hsa-miR-372 y de los transcritos de *ARID4B*, *GALNT3* y *KPNA6* y proteínas totales por sonicación para determinar la Inmunodetección proteínica de las proteínas correspondientes, en ambos casos se analizaron tres replicas biológicas y sus respectivos triplicados técnicos.

7.5.1 Extracción de RNA total

Las células cultivadas en placas de 6 pozos, bajo las condiciones experimentales previamente descritas, fueron lisadas mediante la adición de 1 mL de Trizol Reagent (Ambion) por pozo. El lisado celular fue transferido a microtubos de propileno de 1.5 mL y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la completa disociación de complejos nucleoproteicos. Posteriormente, se añadieron 200 µL de cloroformo, se mezcló vigorosamente por inversión manual durante 15 segundos y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. La fase orgánica fue separada por centrifugación a 12,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Se recuperó la fase acuosa y se procedió a la precipitación del RNA total mediante la adición de isopropanol. El pellet obtenido tras centrifugación fue lavado con etanol al 75% y posteriormente con etanol absoluto (100%). Finalmente, el sedimento de RNA fue resuspendido en 50 µL de agua libre de nucleasas (grado molecular) a 53 °C y almacenado a -70 °C hasta su uso posterior.

7.5.2 RT-qPCR

Las reacciones de RT para hsa-miR-372 se llevaron a cabo utilizando el ensayo Stem-loop RT miRNA (AppliedBiosystems); mientras que, para los transcritos de *ARID4B*, *GALNT3* y *KPNA6*, se realizaron con el kit comercial TaqMan® Reverse Transcription Reagents de Thermo Fisher®. En ambos casos, se retro-transcribieron 100 ng de RNA total utilizando iniciadores RT en bucle (Applied Biosystems) siguiendo el protocolo del fabricante. La detección de hsa-miR-372 y los transcritos de *ARID4B*, *GALNT3* y *KPNA6* se realizó con el TaqMan Universal PCR Master Mix (AppliedBiosystems). La qPCR se llevó a cabo en un equipo 7500 Real-Time PCR System (AppliedBiosystems). La expresión relativa se determinó utilizando el método comparativo Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). RNU6B y GAPDH se utilizaron como controles endógenos para la normalización de datos respectivamente, mientras que H₂O libre de RNAsas se utilizó como control negativo.

7.5.3 Extracción de proteínas totales

Las células cultivadas en placas de 6 pozos, bajo las condiciones experimentales previamente descritas, fueron cosechadas mediante la adición de 1 ml de PBS-EDTA al 0.5%, se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente y se almacenaron en microtubos de propileno de 1.5 mL, se agregaron 200 µL de inhibidor de proteasas y se llevaron a sonicación con el protocolo de 20 pulsos/20 segundos de actividad/ 20 segundos de descanso durante 3 minutos, se añadieron 200 µL de 2x β-Mercaptoetanol, se llevó a baño maría en hervor durante 5 min, posterior a esto se llevó a centrifugar durante 5 minutos a 12,000 rpm a 4 °C.

7.5.4 Electroforesis

Se realizó una electroforesis SDS/PAGE, con geles de acrilamida al 10% y en cada pozo se cargaron 100 µg de proteína total, en una proporción 1:1 con el buffer de carga 2X β-mercaptoetanol, el orden de las muestras es el mismo que se describió anteriormente, se corrieron a 100 volts durante 2 horas, al finalizar se transfirió el contenido del gel a una membrana de nitrocelulosa con un poro de 0.45 µm, la transferencia se hizo en una cámara semihúmeda a 70 voltz durante 20 minutos, posterior a esto se confirmó la transferencia con rojo Ponceau, se dejó bloqueando la membrana en una solución de leche descremada al 5% durante 24 horas a 4°C.

7.5.5 Western blot

Después de incubar las membranas se realizaron 5 lavados con PBS-tween al 1% durante 10 minutos cada uno, se agregó el anticuerpo primario para GADPH (anticuerpo monoclonal) a una dilución de 1:2000, ARID4B (#A302-233), GALNT3 (#PA5-52458) y KPNA6 (#PA5-53867) (anticuerpos policlonales) a una proporción 1:1000 en PBS 1X pH 7. Pasadas las 24 horas se realizaron nuevamente 5 lavados con PBS-tween al 1% durante 10 minutos cada uno, se agregó el anticuerpo secundario HRP anti- Rabbit a una dilución 1:2000 durante 2 horas, al finalizar este tiempo se realizaron 5 lavados con PBS-tween al 1% durante 10 min cada uno, se revelaron las membranas con SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity (#A45916) y se observaron en el foto documentador Chemidoc™ XRS+ de Bio-rad

7.6 Análisis estadístico

Para analizar los niveles de expresión de los transcritos en el tejido se utilizó la prueba de *Shapiro-Wilk* para determinar si se trataba de una muestra con comportamiento normal, al no ser así se utilizó la prueba de U de *Mann-Whitney* (grupo TTCG vs grupo Control) y *Kruskal-Wallis* y *D de Dunet* (presencia/ ausencia de una característica clínico-patológicas vs grupo control), se utilizaron los datos obtenidos del método comparativo Ct ($2^{\Delta\Delta Ct}$). Para la correlación entre la expresión relativa y las características clínico-patológicas de los pacientes, se realizó la prueba de *correlación de Spearman*. Para comparar los niveles de expresión de los grupos obtenidos a partir de la modulación de la línea celular NT2/D1 se realizó la prueba de *Shapiro-Wilk*, se determinó que se trataba de una muestra con un comportamiento normal y se realizó el *Análisis de varianza (ANOVA)* de una vía (NT2/D1 sin transfectar vs NT2/D1+lipofectamina vs NT2/D1+Scramble vs NT2/D1+AntagomiR372 vs NT2/D1+mimic-miR-372.). En todo momento, se consideraron como valores estadísticamente significativos aquellos con una $p \leq 0.05$.

8. Resultados

8.1. Características clínico-patológicas de los grupos de estudio

En el grupo control, la mediana de edad fue de 8 años y se presentó un epitelio seminífero normal, como se aprecia en la tabla 1. Respecto al grupo TTCG, se muestran se muestra la relación de los datos clínico-patológicos de todos los pacientes en la tabla 2.

Tabla 1. Características clínicas e histológicas del grupo control.

Caso (n=5)	Edad (mediana=8 años)	Histología
Control 1	6	Normal para la edad
Control 2	7	Normal para la edad
Control 3	8	Normal para la edad
Control 4	10	Espermatogénesis normal
Control 5	16	Espermatogénesis normal

Tabla 2. Características clínico-patológicas de los pacientes con TTCG.

Muestra	Edad	Histología	Lateralidad del TTCG	Estadio clínico	Antecedentes de CO	Metástasis	Microlitiasis	N/SCG
TTCG 1	23	sTTCG	izquierdo	III	Si	no	no	no
TTCG 2	39	sTTCG	izquierdo	III	No	no	no	no
TTCG 3	25	nsTTCG	derecho	I	No	no	no	no
TTCG 4	46	sTTCG	izquierdo	I	No	no	no	no
TTCG 5	50	nsTTCG	derecho	I	No	no	no	no
TTCG 6	24	nsTTCG	izquierdo	III	No	no	no	si
TTCG 7	26	sTTCG	derecho	III	No	si	no	si
TTCG 8	51	sTTCG	izquierdo	I	No	no	no	no
TTCG 9	23	sTTCG	derecho	I	No	no	no	si
TTCG 10	27	nsTTCG	izquierdo	I	No	no	no	no
TTCG 11	19	nsTTCG	derecho	I	No	no	no	no
TTCG 12	26	nsTTCG	derecho	III	No	si	no	no
TTCG 13	40	sTTCG	izquierdo	III	No	no	no	no
TTCG 14	30	nsTTCG	derecho	I	No	no	no	si
TTCG 15	24	nsTTCG	derecho	I	No	si	si	si
TTCG 16	23	nsTTCG	izquierdo	I	No	no	no	si
TTCG 17	29	sTTCG	derecho	I	Si	no	no	si
TTCG 18	33	nsTTCG	izquierdo	III	No	si	si	no
TTCG 19	26	nsTTCG	derecho	III	No	no	si	si
TTCG 20	26	nsTTCG	izquierdo	II	No	no	si	si
TTCG 21	18	nsTTCG	bilateral	III	No	si	si	no
TTCG 22	21	nsTTCG	derecho	I	No	no	no	si
TTCG 23	41	sTTCG	izquierdo	III	No	no	no	si
TTCG 24	17	nsTTCG	derecho	I	No	no	no	si

En los pacientes de las muestras con TTCCG la mediana de la edad al diagnóstico fue de 26 años, de estos pacientes el 4.17% (1/24) presentó el tumor en su forma bilateral, el 45.83% (11/24) en el testículo izquierdo y el 50% (12/24) en el testículo derecho; en cuanto a los antecedentes de CO durante la edad pediátrica, sólo el 8.34% (2/24) se reportaron positivos, los cuales además fueron corregidos quirúrgicamente mediante orquidopexia; el estadio clínico predominante fue el I con el 50% (12/24) de los pacientes, seguido del estadio III con el 45.83% (11/24) y por último el estadio II con el 4.17% (1/24). Respecto al tipo histológico el 37.5% (9/24) correspondió al sTTCCG, mientras que 62.5% (15/24) correspondió al nsTTCCG. Por otra parte, la presencia microlitiasis y de la *N/SCG* se reportaron en 20.83 % (5/24) y 50% (12/24) de los pacientes respectivamente. El 20.83% (5/24) de los pacientes presentaron metástasis, de esos casos el 100% (4/5) fue metástasis en pulmón, adicionalmente el 50% de ellos (2/4) tuvo metástasis en retroperitoneo y el 25% (1/4) en mediastino, como se observa en la tabla 3.

Tabla 3. Frecuencia de las características clínico-patológicas del TTCG.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS		PACIENTES CON TGCT n= 24 (%)
		Edad al diagnóstico (mediana=26 años)
Lateralidad	Bilateral	1 (4.17)
	Izquierdo	11 (45.83)
	Derecho	12 (50)
Antecedentes de CO	Si	2 (8.34)
	No	22 (91.66)
Orquidopexia	Si	2 (8.34)
Estadio clínico al diagnóstico	I	12 (50)
	II	1 (4.17)
	III	11 (45.83)
Histología del tumor	sTTCG	9 (37.5)
	nsTTCG	15 (62.5)
Microlitiasis	Si	5 (20.83)
	No	19 (79.17)
NISCG	Si	12 (50)
	No	12 (50)
Metástasis	Positivos	5 (20.83)
	Negativos	19 (91.66)
Localización de la metástasis	Pulmón	5 (100)
	Retroperitoneo	2 (40)
	Mediastino	1 (20)

8.2. Determinación de la expresión relativa del hsa-miR-372 y de los transcritos de *ARID4B*, *GALNT3* y *KPNA6* en muestras de TTCG

Respecto a los resultados de expresión relativa entre el grupo Control y TTCG se observó en este último un aumento para el hsa-miR-372 con un valor de $p < 0.001$; como se observa en la figura 6A. Mientras que, para los transcritos *ARID4B*, *GALNT3* y *KPNA6* el grupo TTCG mostró una disminución significativa con los siguientes valores de $p = 0.0020$, $p < 0.0001$, $p = 0.0034$ respectivamente, como se observa en las figuras 6B, C y D.

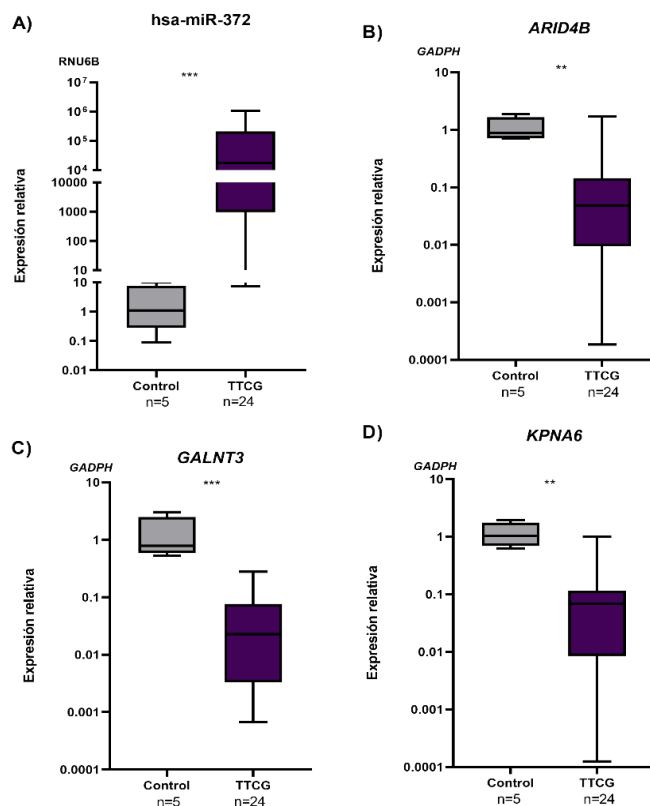


Figura 6. Comparación de los niveles de expresión relativa entre el grupo Control y TTCG. Niveles de expresión relativa para A) hsa-miR-372, B) *ARID4B*, C) *GALNT3* y D) *KPNA6*. En color gris se muestra al grupo Control y en color morado al grupo TGCT. Los gráficos se muestran como media \pm SDs. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$ y *** = $p < 0.001$.

Posterior a las diferencias encontradas entre casos y controles, se realizó la comparación de los niveles de expresión entre el grupo Control y subgrupos del grupo TTCG correspondientes a las características clínico-patológicas. En cuanto a las comparaciones de expresión relativa entre el grupo Control y los subtipos histológicos sTTCG y nsTTCG, estos últimos mostraron un aumento significativo en los niveles de expresión del hsa-miR-372 respecto al grupo Control con una $p=0.0307$ y $p=0.0059$ respectivamente. En contraste a esto, no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión entre el grupo sTTCG y nsTTCG con una $p=0.99$, evidenciando un patrón de expresión similar en ambos tipos histológicos como se aprecia en la figura 7A. Para *ARID4B* se observó una disminución significativa en la expresión relativa del grupo nsTTCG respecto al grupo Control con una $p=0.0099$, por el contrario, no se observaron diferencias significativas entre el grupo control y sTTCG con una $p=0.129$ y entre sTTCG y nsTTCG con una $p=0.897$, figura 7B. Para los niveles de expresión de *GALNT3* se mostró una disminución significativa en sTTCG con una $p=0.0025$ y en nsTTCG con una $p=0.020$, ambos con respecto al grupo control, mientras que entre sTTCG y nsTTCG no se observaron diferencias significativas con una $p=0.746$, figura 7C. Finalmente, para *KPNA6* se mostró una disminución significativa en sTTCG con $p=0.0134$ y en nsTTCG con $p=0.026$, ambos con respecto al grupo control, mientras que, entre los dos tipos histológicos no se observó diferencias significativas $p=0.999$, figura 7D.

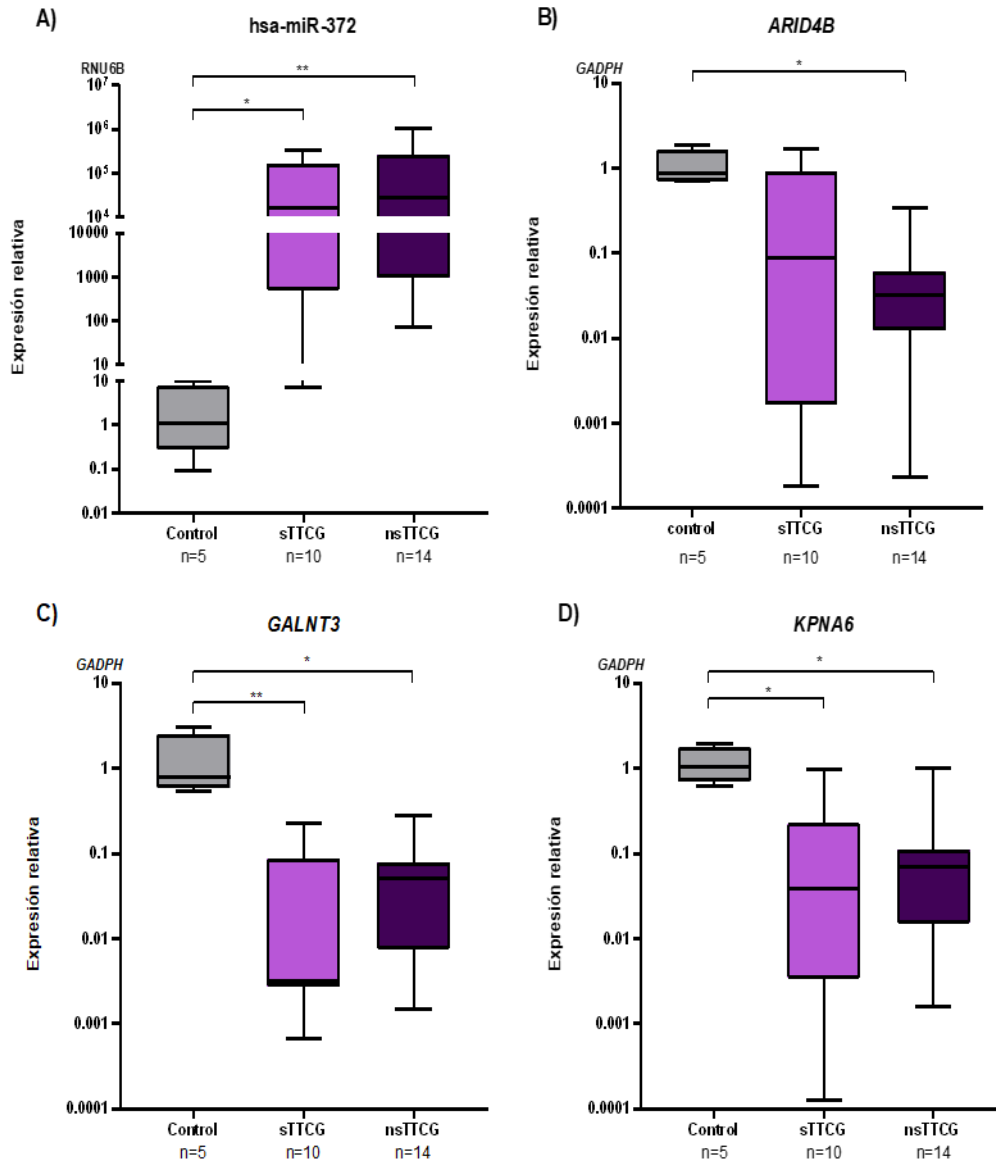


Figura 7. Comparación de los niveles de expresión relativa entre tejido control, sTTCG y nsTTCG. Niveles de expresión relativa para A) *hsa-miR-372*, B) *ARID4B*, C) *GALNT3* y D) *KPNA6*. En color gris se muestra el grupo Control, en color lila el grupo sTTCG y en color morado el grupo nsTTCG. Los resultados se muestran como media \pm SDs. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$ y *** = $p < 0.001$.

Para los resultados de expresión relativa entre el grupo Control y los grupos de TTCG izquierdo o derecho (para el análisis se omitió la muestra bilateral), se

observó que si el tumor se encuentra tanto en el testículo izquierdo como en el derecho hay un aumento significativo en los niveles de expresión del hsa-miR-372 con un valor de $p=0.0035$ y $p=0.0214$ respectivamente, en contraste a esto, no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión entre el grupo derecho e izquierdo ($p=0.99$), figura 8A. Se observó una disminución en la expresión relativa de *ARID4B* obteniendo diferencias significativas entre el grupo Control y el TTCG derecho $p=0.013$, por el contrario, no se observó diferencias significativas entre el grupo Control con el TTCG izquierdo $p=0.069$ y entre el TTCG izquierdo y derecho con una $p=0.99$, figura 8B. Para los niveles de expresión de *GALNT3* encontramos que hay una disminución significativa en el TTCG izquierdo $p=0.0025$ y en el TTCG derecho $p=0.027$ con respecto al grupo Control, no se observó una disminución significativa entre el TTCG izquierdo y el derecho $p=0.787$, figura 8C. En *KPNA6* encontramos una disminución significativa en el TTCG izquierdo $p=0.014$ y el TTCG derecho $p=0.027$ con respecto al grupo Control, no se observó una disminución significativa entre el TTCG izquierdo y derecho $p=0.999$, figura 8D.

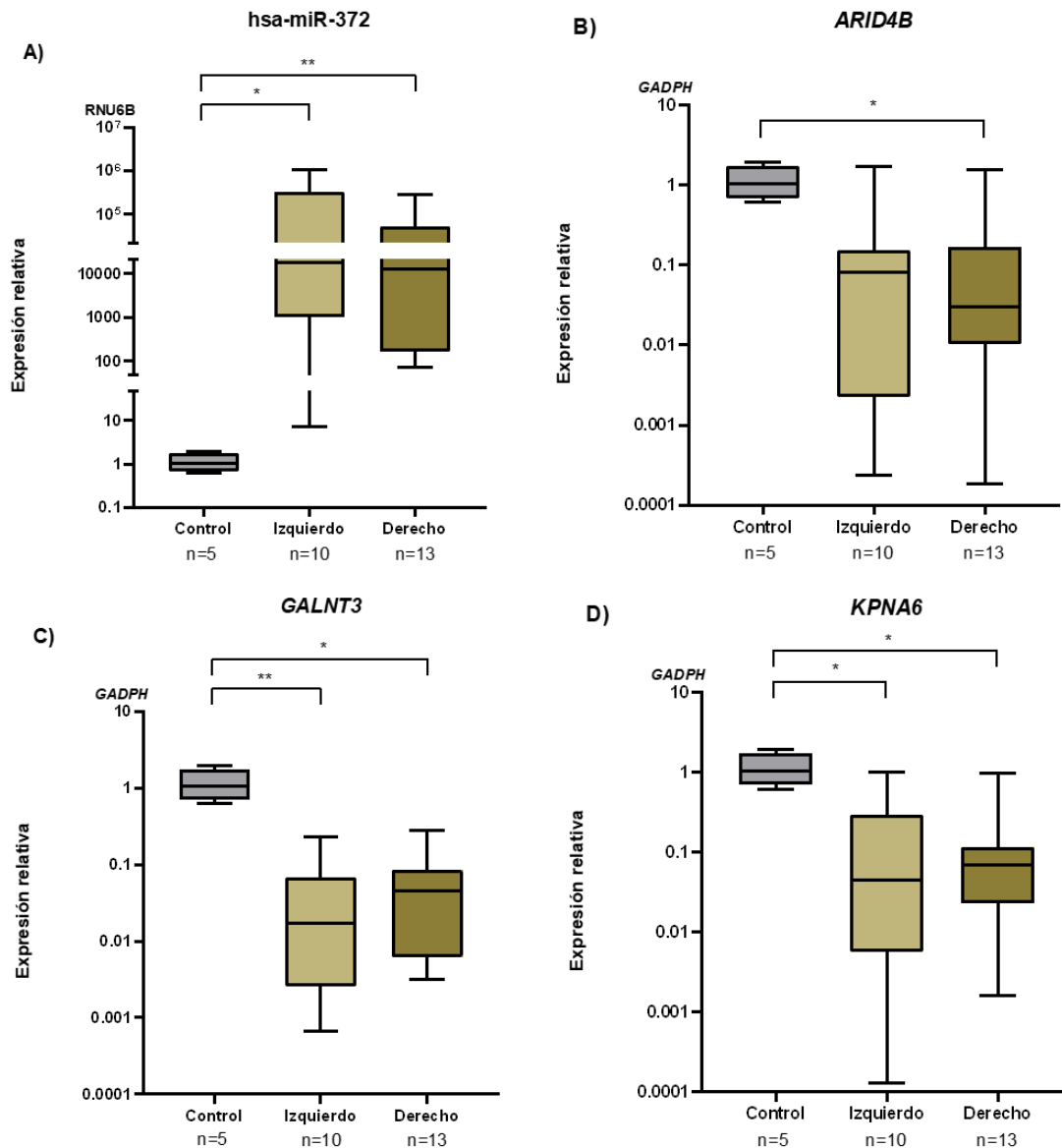


Figura 8. Comparación de los niveles de expresión relativa entre tejido control y los tumores localizados en el testículo izquierdo o derecho. Niveles de expresión relativa para A) hsa-miR-372, B) *ARID4B*, C) *GALNT3*, y D) *KPNA6*. En color gris se muestra el grupo Control, en café claro el grupo con tumor en el testículo izquierdo y en café oscuro el grupo con tumor en el testículo derecho. Los resultados se muestran como media \pm SDs. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$ y *** = $p < 0.001$.

Respecto a los niveles de expresión relativa entre el grupo Control y la presencia o ausencia de metástasis, mostraron un aumento significativo en los niveles de expresión del hsa-miR-372 $p=0.033$ y $p=0.005$ respectivamente, en contraste a esto, no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión entre el grupo metástasis y sin metástasis ($p=0.99$), como se aprecia en la figura 9A. Se observó una disminución en la expresión relativa de *ARID4B* obteniendo diferencias significativas entre el grupo Control y el grupo sin metástasis $p=0.018$, por el contrario, no se observan diferencias significativas entre el grupo Control con el grupo metástasis $p=0.106$ y entre el grupo metástasis y sin metástasis con una $p=0.99$, figura 9B. En los niveles de expresión de *GALNT3* encontramos que hay una disminución significativa en el grupo sin metástasis con respecto al grupo Control $p=0.0031$, no se observó una disminución significativa entre el grupo Control y el grupo metástasis $p=0.157$, y entre el grupo metástasis y sin metástasis $p=0.940$, figura 9C. En *KPNA6* encontramos que hay una disminución significativa en el grupo sin metástasis con respecto al grupo Control $p=0.0073$, sin embargo, no se observó una disminución significativa entre el grupo Control y el grupo metástasis $p=0.255$, y entre el grupo metástasis y sin metástasis $p=0.925$, figura 9D.

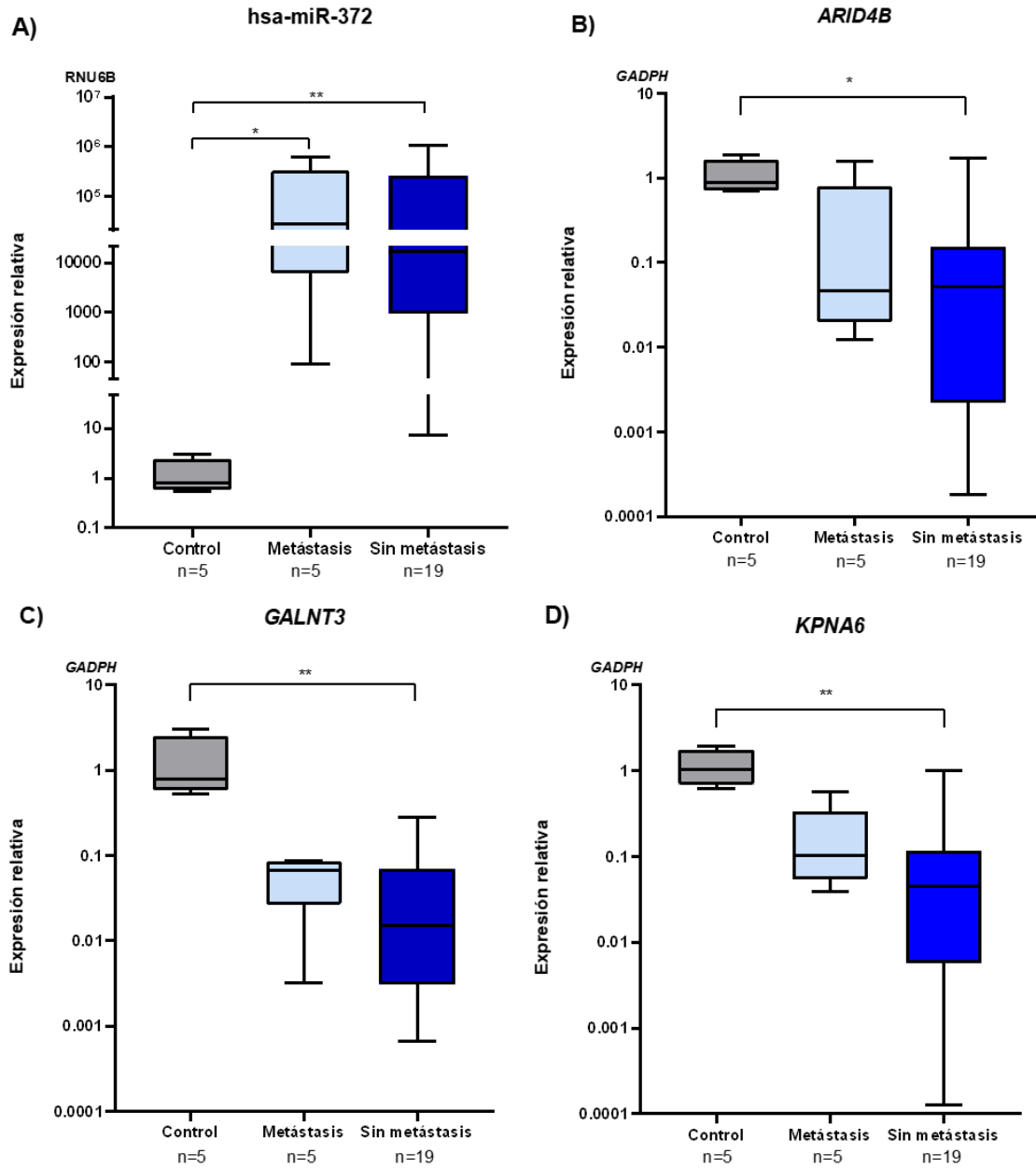


Figura 9. Comparación de los niveles de expresión relativa entre tejido control y los tejidos provenientes del grupo con metástasis y del grupo sin metástasis. Niveles de expresión relativa para A) hsa-miR-372, B) *ARID4B*, C) *GALNT3* y D) *KPNA6*. En color gris se muestra el grupo Control, en color azul claro el grupo con metástasis y en color azul marino el grupo sin metástasis. Los resultados se muestran como media \pm SDs. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$ y *** = $p < 0.001$.

En cuanto a los niveles de expresión entre el grupo Control y los grupos con microlitiasis y sin microlitiasis, se observó en estos últimos un aumento significativo en los niveles de expresión del hsa-miR-372 $p=0.006$ y $p=0.013$ respectivamente, en contraste a esto, no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión entre el grupo microlitiasis y sin microlitiasis $p=0.99$, como se aprecia en la figura 10A. Se observó una disminución en la expresión relativa de *ARID4B* obteniendo diferencias significativas entre el grupo Control con el grupo con microlitiasis y sin microlitiasis $p=0.041$ y $p=0.025$ respectivamente, por el contrario, no se observan diferencias significativas entre el grupo microlitiasis y sin microlitiasis con una $p=0.999$, figura 10B. En los niveles de expresión de *GALNT3* se encontró una disminución significativa en el grupo sin microlitiasis con respecto al grupo Control $p=0.0039$, y no se observó una disminución significativa entre el grupo Control y el grupo microlitiasis $p=0.093$, y entre el grupo microlitiasis y sin microlitiasis $p=0.999$, figura 10C. En *KPNA6* se mostró una disminución significativa en el grupo sin microlitiasis con respecto al grupo Control $p=0.0023$, no se observó una disminución significativa entre el grupo Control y el grupo microlitiasis $p=0.275$, y entre el grupo microlitiasis y sin microlitiasis $p=0.453$, figura 10D.

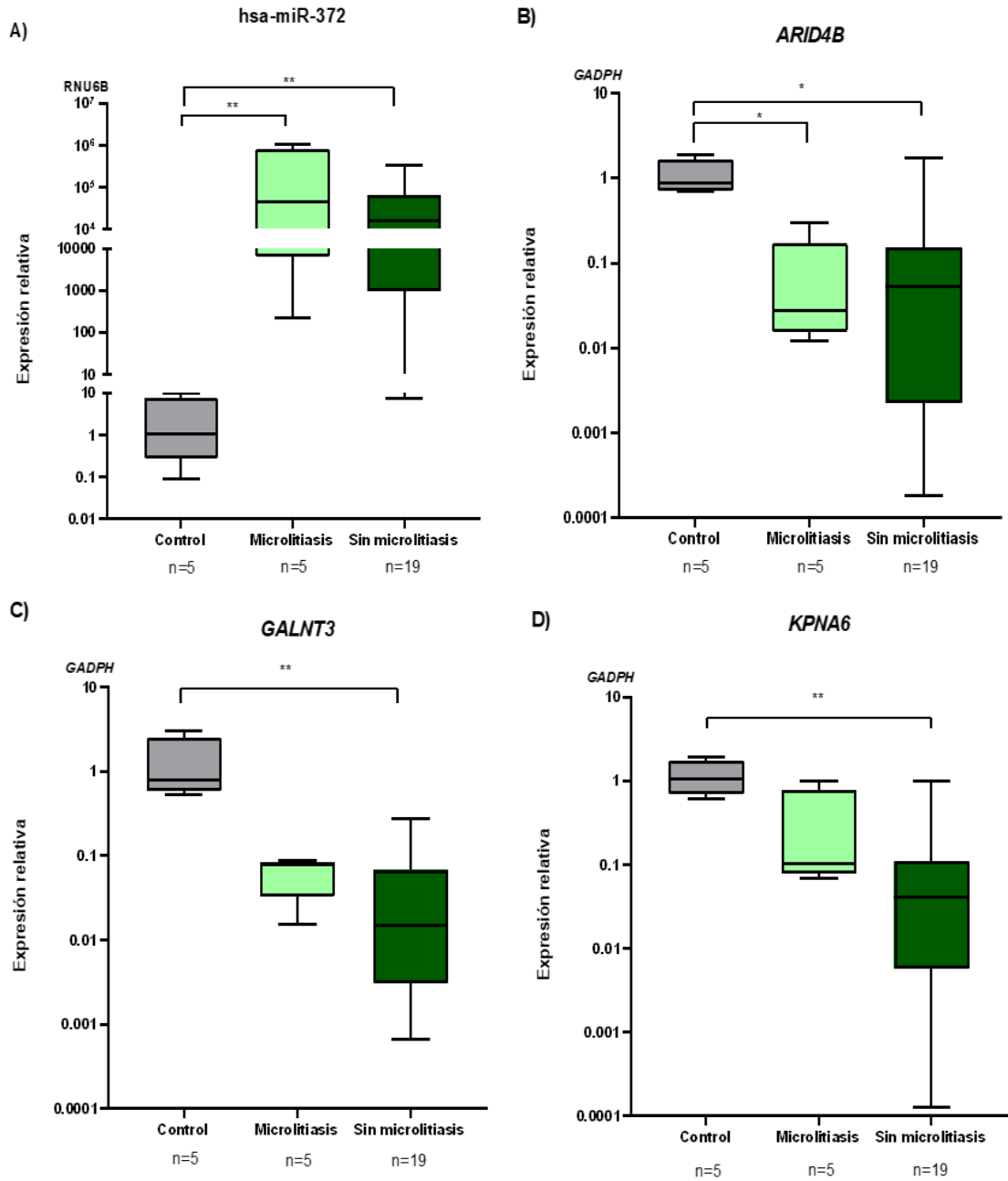


Figura 10. Comparación de los niveles de expresión relativa entre tejido control y los tejidos provenientes de pacientes con microlitiasis y de pacientes sin microlitiasis. Niveles de expresión relativa para A) hsa-miR-372, B) *ARID4B*, C) *GALNT3* y D) *KPNA6*. En color gris se muestra el grupo Control, en verde claro el grupo con microlitiasis y en verde olivo el grupo sin microlitiasis. Los resultados se muestran como media \pm SDs. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$ y *** = $p < 0.001$.

Al analizar los niveles de expresión relativa entre el grupo Control y las muestras de pacientes con *N/SCG* y sin *N/SCG*, se encontró que tanto en el grupo con *N/SCG* como en el grupo sin *N/SCG* aumentaron de manera significativa los niveles de expresión del hsa-miR-372 respecto al grupo Control con valores de $1qqp=0.0091$ y $p=0.0102$, en contraste a esto, no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión entre el grupo *N/SCG* y sin *N/SCG* $p=0.999$, figura 11A. Se observó una disminución en la expresión relativa de *ARID4B* obteniendo diferencias significativas entre el grupo Control y el *N/SCG* $p=0.0096$, por el contrario, no se observaron diferencias significativas entre el grupo Control con *N/SCG* $p=0.0811$ y entre *N/SCG* y sin *N/SCG* con una $p=0.891$, figura 11B. En los niveles de expresión de *GALNT3* se observó una disminución significativa en grupo sin *N/SCG* $p=0.0005$ con respecto al grupo Control, no se observó una disminución significativa entre el grupo Control y *N/SCG* $p=0.096$ y entre *N/SCG* y sin *N/SCG* $p=0.067$, figura 11C. En *KPNA6* se mostró una disminución significativa en el grupo sin *N/SCG* $p=0.0037$ con respecto al grupo Control, no se observó una disminución significativa entre el grupo Control y el grupo *N/SCG* $p=0.088$ y el grupo *N/SCG* comparado con el grupo sin *N/SCG* $p=0.409$, figura 11D.

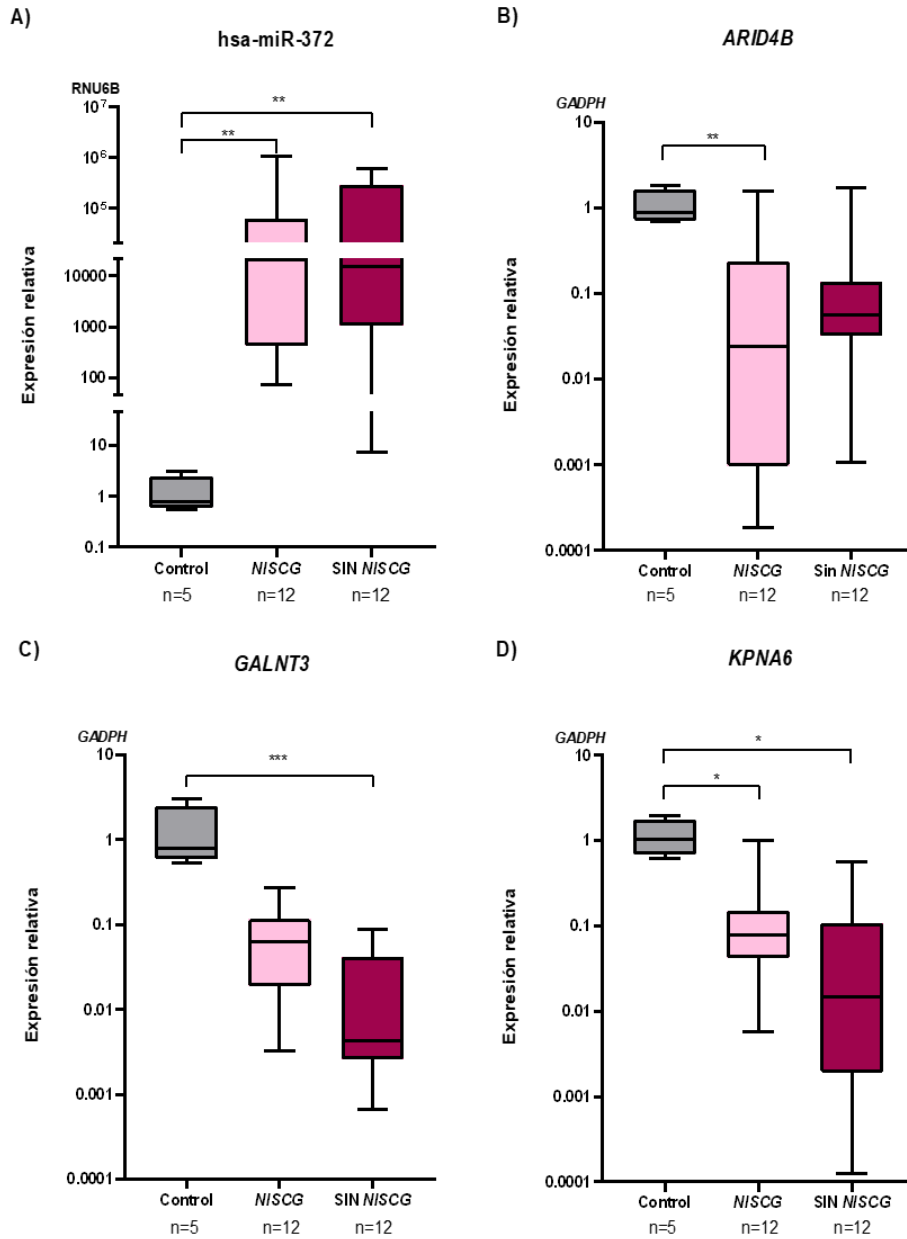


Figura 11. Comparación de los niveles de expresión relativa entre tejido control y los tejidos provenientes de pacientes con presencia de *NISCG* y de pacientes sin *NISCG*. Niveles de expresión relativa para A) *hsa-miR-372*, B) *ARID4B*, C) *GALNT3* y D) *KPNA6*. En color gris se muestra el grupo Control, en rosa el grupo con *NISCG* y en magenta el grupo sin *NISCG*. Los resultados se muestran como media \pm SDs. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$ y *** = $p < 0.001$.

Finalmente, al comparar los niveles de expresión relativa entre el grupo Control y los grupos de pacientes en estadio II o III (para el análisis se omitió el estadio II puesto que solo se contaba con una muestra con esa característica), se observó que tanto en el grupo diagnosticado en el estadio I como en el grupo en estadio III hubo un aumento significativo en los niveles de expresión del hsa-miR-372 $p=0.0043$ y $p=0.0417$ respectivamente, en contraste a esto, no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión entre el grupo en estadio I y en estadio III $p=0.999$, figura 12A. Se observó una disminución en la expresión relativa de *ARID4B* obteniendo diferencias significativas entre el grupo Control y el estadio I $p=0.021$, por el contrario, no se observan diferencias significativas entre el grupo Control con estadio III $p=0.054$ y entre el estadio I y III con una $p=0.999$, figura 12B. En los niveles de expresión de *GALNT3* se encontró una disminución significativa para el estadio I y III con respecto al grupo Control $p=0.012$ y $p=0.007$ respectivamente, no se observó una disminución significativa entre el estadio I y el III $p=0.999$, figura 12C. En *KPNA6* se observó una disminución significativa para el grupo estadio I y III con respecto al grupo Control $p=0.037$ y $p=0.048$, no se observó una disminución significativa entre el grupo en estadio I y III $p=0.088$, figura 12D.

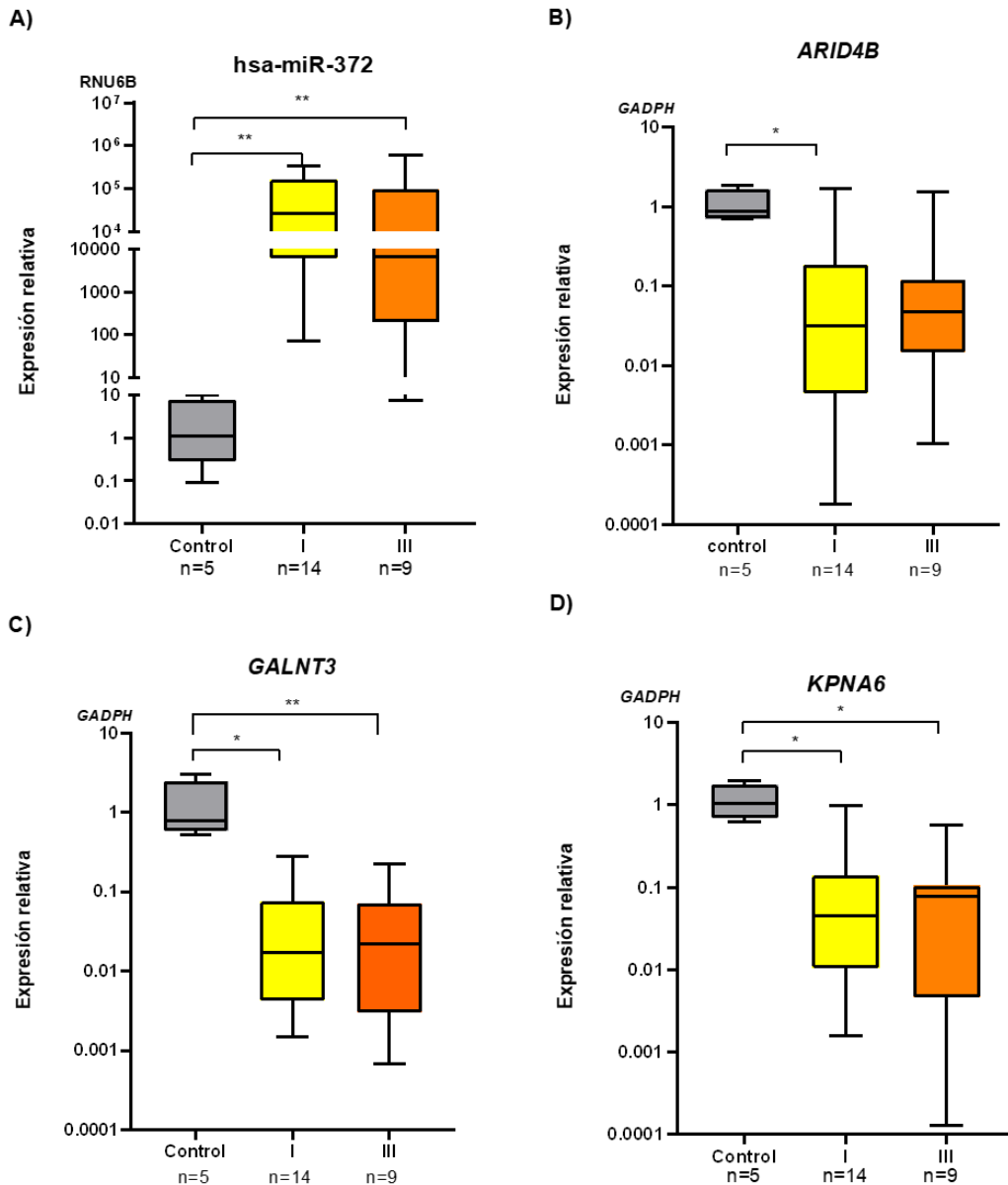


Figura 12. Comparación de los niveles de expresión relativa entre tejido control y los tejidos provenientes de pacientes diagnosticados en el estadio I o III. Niveles de expresión relativa para A) hsa-miR-372, B) *ARID4B*, C) *GALNT3* y D) *KPNA6*. En color gris se muestra el grupo Control, en amarillo el grupo correspondiente al estadio I y en color naranja el grupo correspondiente al estadio III. Los resultados se muestran como media \pm SDs. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$ y *** = $p < 0.001$.

8.3. Evaluación histológica y determinación de la inmuno-reactividad para ARID4B, GALNT3 y KPNA6 en muestras de TTCG.

En cuanto a las características histológicas del grupo control, 4/5 (80%) presentaron con un epitelio seminífero acorde a la edad. En estas muestras se observó un arresto en la maduración y una espermatogénesis incompleta, con una presencia incompleta de lo que parecieran ser espermatogonias, figura 13 A-D, en uno de ellos observamos lo que parecieran ser tubos seminíferos inmaduros, figura 13 D, por último 1/5 (20%) mostró una espermatogénesis normal, con tubos seminíferos con aparentemente células germinales en distintas etapas de maduración (no se observaron espermatozoides, figura 13 E).

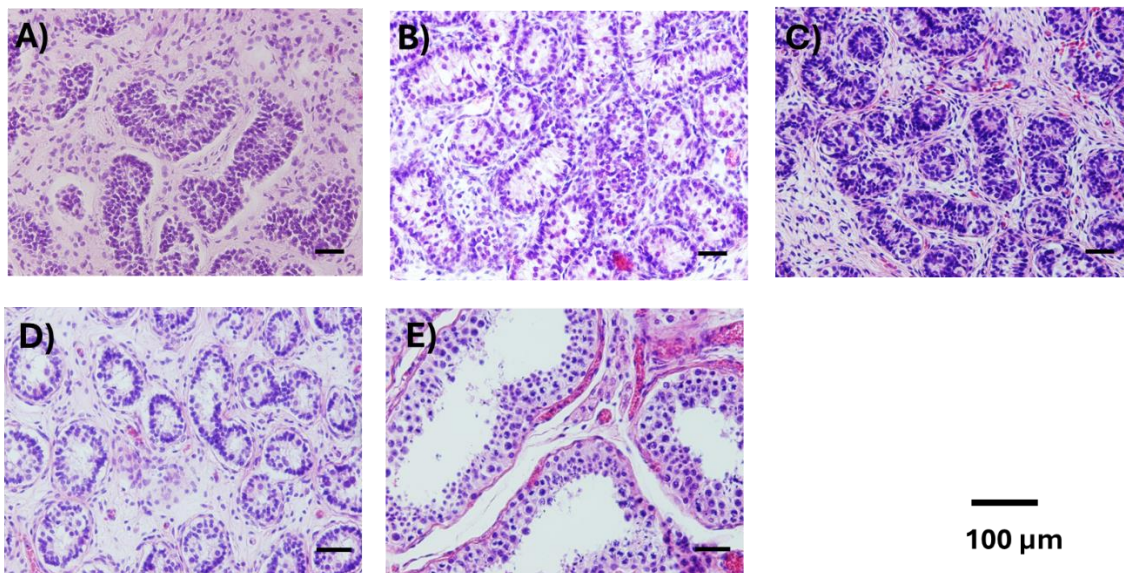


Figura 13. Histología de las muestras control. Corte histológico correspondiente al A) control 1 (6 años), B) control 2 (7 años), C) control 3 (8 años), D) c control 4 (10 años) y E) al control 5 (16 años). Tinción H&E, aumento 20X.

En el caso del grupo TTCG, se observaron dos patrones histológicos generales como se describe a continuación. Para el caso del sTTCG todas las muestras

presentaron características típicas de este tipo histológico; células grandes, uniformes y pleomórficas con un citoplasma claro, tal como se observa en la figura 14.

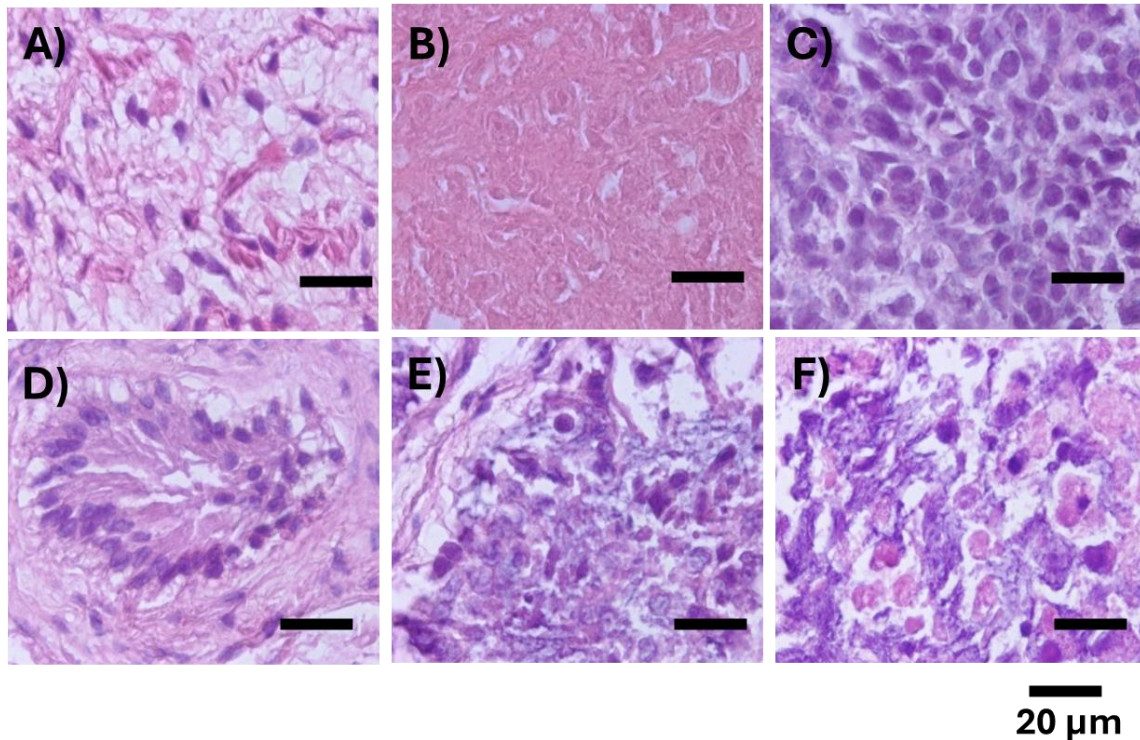


Figura 14. Histología de las muestras clasificadas como sTTCG. Se muestran seis cortes representativos para el sTTCG que corresponden al A) TTCG 13, B) TTCG 2, C) TTCG 4, D) TTCG 7, E) TTCG 8 y F) TTCG 9. Tinción H&E, aumento 60X.

Para el caso del grupo nsTTCG, no fue posible agrupar todas las muestras en un grupo general, puesto que se trata de un tipo histológico muy heterogéneo, sin embargo, observamos distintos patrones celulares; en la figura 15A,C y E encontramos células grandes, con un citoplasma claro, similar a lo que se observó en el grupo sTTCG, pero también observamos patrones celulares más compactos con una pérdida evidente del citoplasma, como se observa en la figura 14B,D y F.

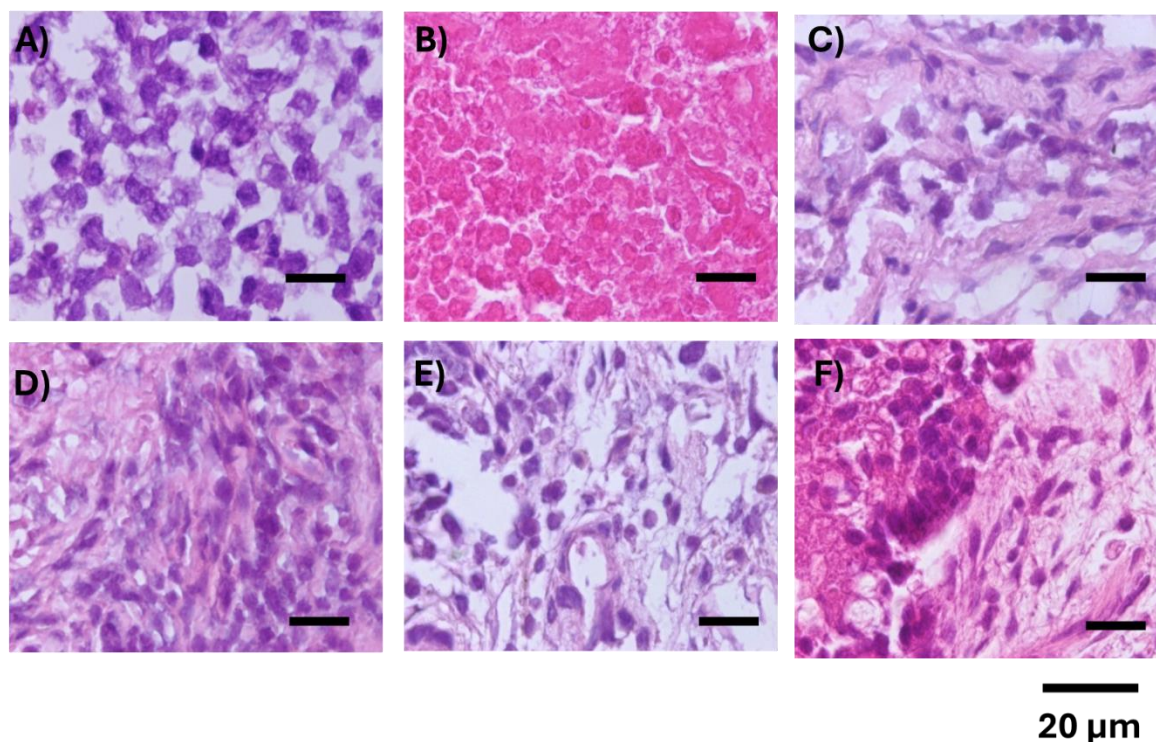


Figura 15. Histología de las muestras clasificadas como nsTTCG. Se observan seis cortes representativos del nsTTCG que corresponden al A) TTCCG 3, B) TTCCG 5, C) TTCCG 6, D) TTCCG 10, E) TTCCG 11 y F) TTCCG 14. Tinción H&E, aumento 60X

Para comprobar la integridad de los tejidos, se realizó la inmunohistoquímica para Vimentina, todos los tejidos de nuestra muestra fueron inmuno-reactivos 24/24 (100%), en el grupo control se observa una inmuno-reacción localizada en el área donde se distribuyen las células de Sertoli, figura 16 1A, en el caso de los tejidos tumorales tanto sTTCCG (figura 16 2A y 2B respectivamente) este patrón de distribución ya no se mantiene, puesto en la mayoría de los casos ya no existe un epitelio seminífero estructurado.

Respecto a ARID4B, no se observó inmunorreactividad en el grupo control. (figura 16 1B) ni en el grupo con TTCCG (Figura 16 2B y 3B). Respecto a GALNT3 sólo se observó inmunorreactividad en el 40% (2/5) de los tejidos del grupo Control que

corresponden a tejido de individuos de 10 y 16 años, esta inmunorreactividad se caracterizó por tener forma de medialuna, puesto que GALNT3 se encuentra en aparato de Golgi (figura 1C), en el caso del grupo de TTTCG sólo se observó inmunorreactividad en el 29.16% (7/24) tejidos, de los cuales 5 corresponden a sTTTCG y 2 a nsTTTCG, sin embargo, esta inmunorreactividad no mantiene la forma característica de medialuna, por lo que se consideró una marca inespecífica (figura 2 y 3C). Finalmente, para KPNA6 se observó inmunorreactividad en el 40% (2/5) tejidos del grupo Control que corresponden a tejido de individuos de 10 y 16 años, esta se observó a lo largo de toda la línea germinal (figura 16 1D), mientras que para el grupo de TTTCG no se observó inmunorreactividad (figura 16 2 y 3 D), como se muestra en la Tabla 4, en la Figura 16, 17 y 18 y 19.

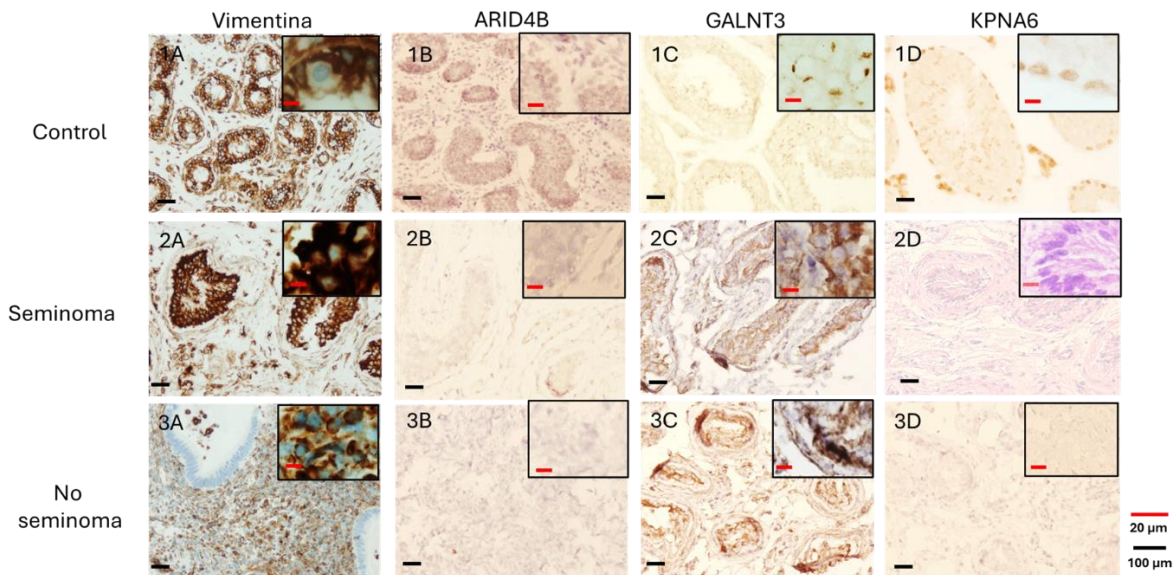


Figura 16. Comparación de la inmunorreactividad. El siguiente panel muestra inmunohistoquímicas representativas del individuo Control 4, del paciente TTTCG 7 (sTTTCG) y del paciente TTTCG 11 (nsTTTCG) para A) Vimentina, B) ARID4B, C) GALNT3 y D) KPNA6. Vista 20X y 60X.

Tabla 4. Evaluación histológica e inmunohistoquímica

Grupo Control				
Muestra	Inmunorreactividad			
	Vimentina	ARID4B	GALNT3	KPNA6
Control 1				
Control 2				
Control 3				
Control 4				
Control 5				

Grupo con TTCG				
Muestra	Inmunorreactividad			
	Vimentina	ARID4B	GALNT3	KPNA6
TTCG 1				
TTCG 2				
TTCG 3				
TTCG 4				
TTCG 5				
TTCG 6				
TTCG 7				
TTCG 8				
TTCG 9				
TTCG 10				
TTCG 11				
TTCG 12				
TTCG 13				
TTCG 14				
TTCG 15				
TTCG 16				
TTCG 17				
TTCG 18				
TTCG 19				
TTCG 20				
TTCG 21				
TTCG 22				
TTCG 23				
TTCG 24				

En color rojo se indican las muestras inmunorreactivas al anticuerpo, mientras que en color verde se muestran las muestras sin inmunorreactividad.

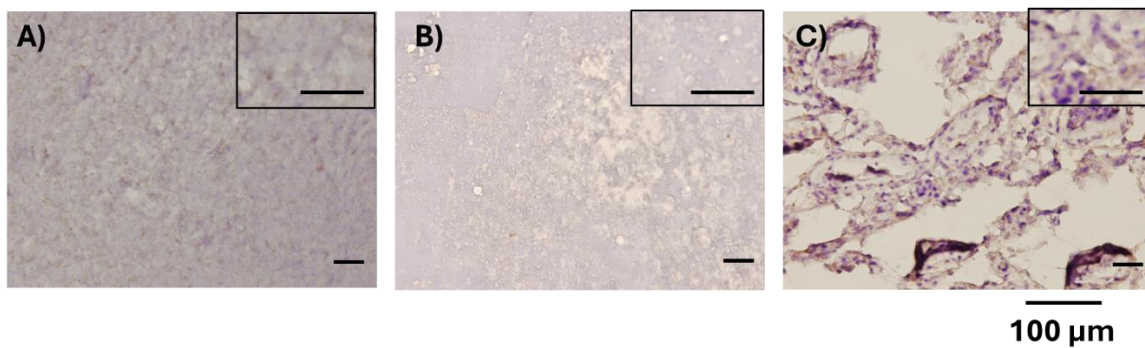


Figura 17. Inmunorreactividad para ARID4B A) Muestra TTCG 9, que corresponden a sTTCG. B-C) Muestra TTCG 18, y TTCG 19, que corresponden a nsTTCG, vista 20X.

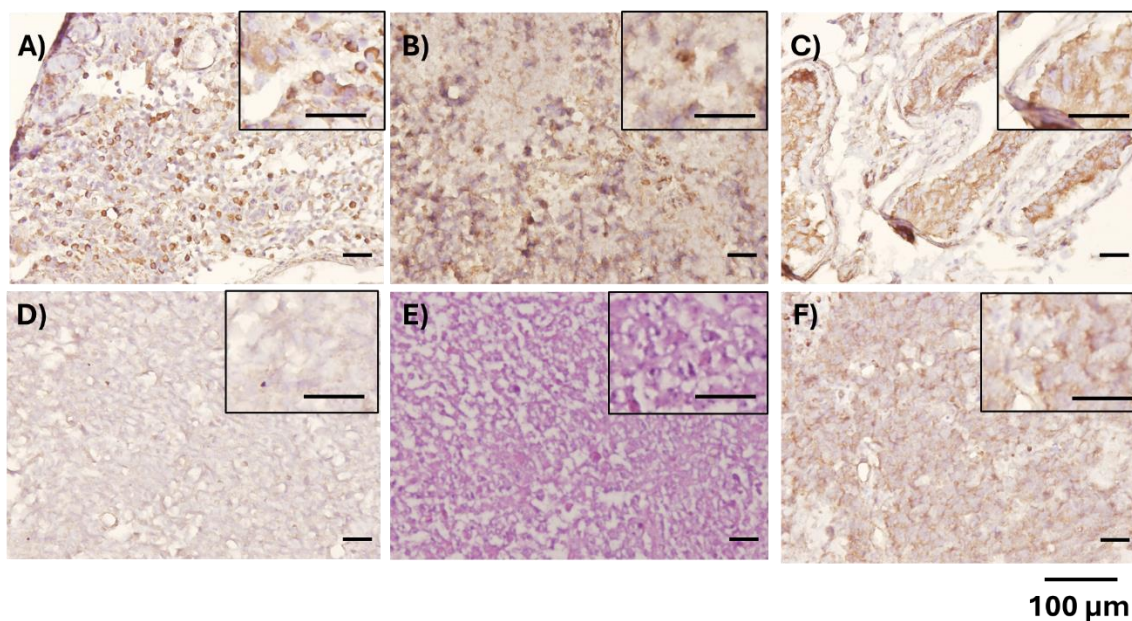


Figura 18 Inmunorreactividad para GALNT3. A-C) Muestra TTCG 8, TTCG 1 y TTCG 7, que corresponden a sTTCG. D-F) Muestra TTCG 12, TTCG 14 y TTCG 18, que corresponden a nsTTCG. Vista 20X.

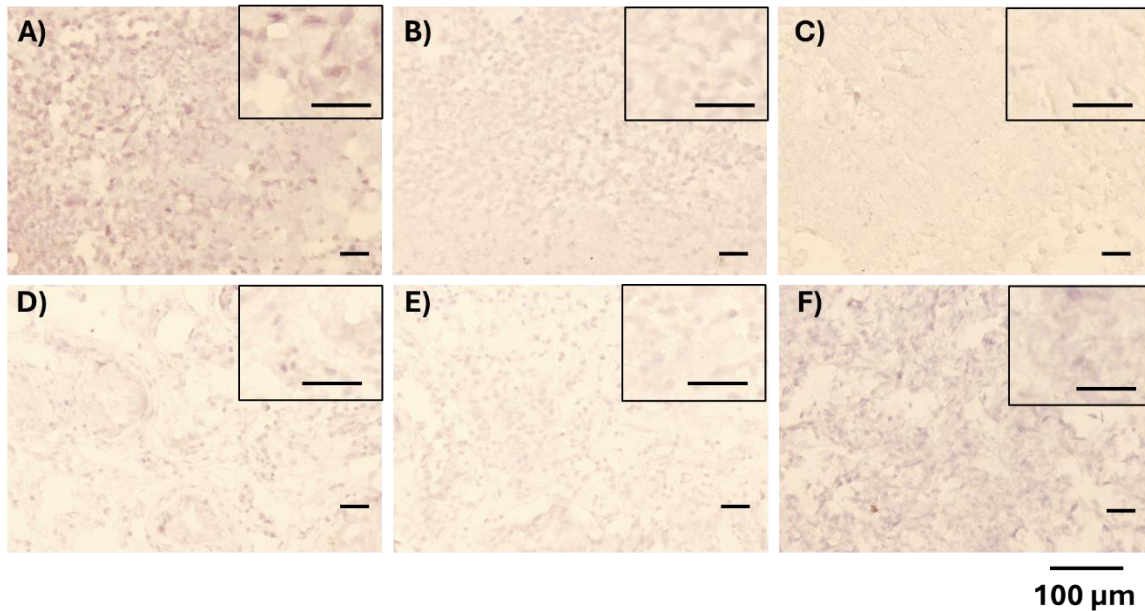


Figura 19. Inmunoreactividad para KPNA6 A-C) Muestra TTCG 1, TTCG 2 y TTCG 4, que corresponden a sTTCG. D-F) Muestra TTCG 20, TTCG 21 y TTCG 22, que corresponden a nsTTCG. Vista 20X.

8.4. Correlación de los niveles de expresión del hsa-miR-372, *ARID4B*, *GALNT3* Y *KPNA6* con las características clínico-patológicas de los pacientes con TTCG.

Respecto a la correlación global entre los niveles de expresión de los 4 transcritos, no se observaron correlaciones estadísticamente significativas. Teniendo un valor de $r=-0.09$ y una $p=0.665$ entre la expresión del hsa-miR-372 y *ARID4B*, un valor de $r=0.11$ y una $p=0.613$ entre la expresión del hsa-miR-372 y *GALNT3* y un valor de $r=0.12$ y una $p=0.590$ entre la expresión del hsa-miR-372 y *KPNA6*. Finalmente, se observó una correlación moderada ($r=0.62$) entre los niveles de expresión de *GALNT3* y *KPNA6*, sin embargo, esta no fue significativa ($p=0.618$) figura 20.

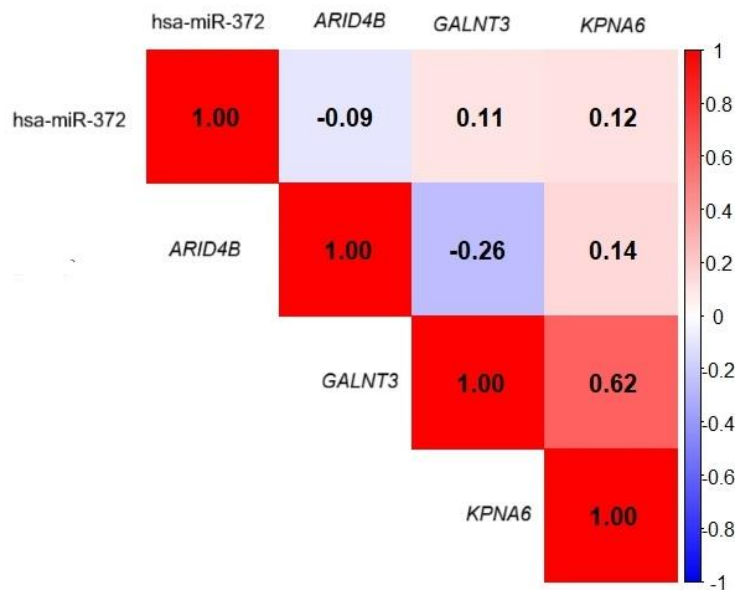


Figura 20. Correlación entre los niveles de expresión relativa del hsa-miR-372 y los transcritos *ARID4B*, *GALNT3* y *KPNA6*. Los colores indican la dirección y magnitud de las correlaciones, donde los tonos azules representan correlaciones negativas y los rojos correlaciones positivas. La intensidad del color corresponde al valor del coeficiente de correlación (r), según la escala mostrada a la derecha, que varía de -1 (correlación negativa) a $+1$ (correlación positiva).

Al obtener las correlaciones por el tipo histológico nSTTCG se encontró que la mayoría de las correlaciones no fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, se encontraron un par de correlaciones positivas entre los niveles de expresión de *GALNT3* y *KPNA6* ($r=0.70$, $p=0.0037$); así como, los niveles de expresión de *KPNA6* con la presencia de microlitiasis ($r=0.56$, $p=0.031$), este comportamiento se mantiene con la correlación entre la presencia de microlitiasis y metástasis ($r=0.53$, $p=0.040$) esto se observa en la figura 21.

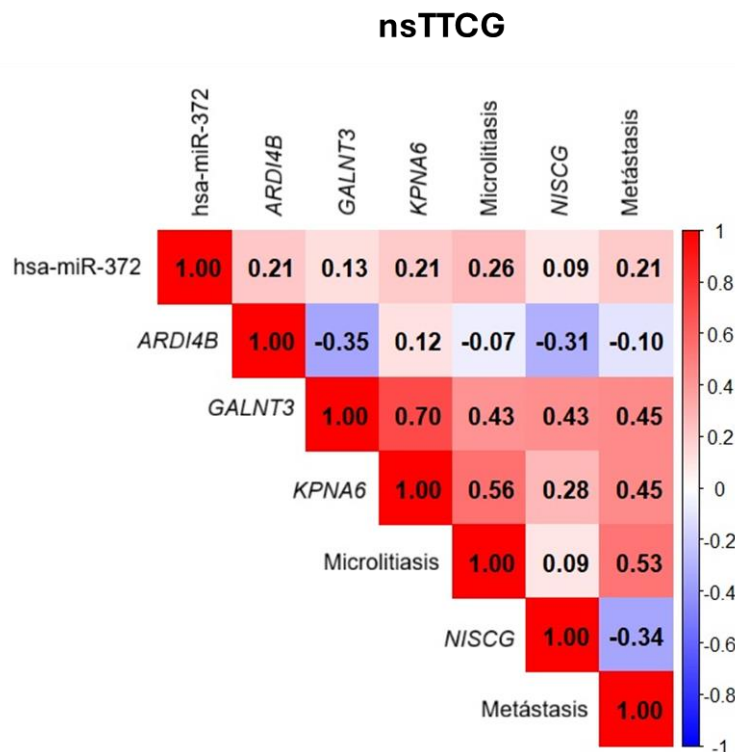


Figura 21. Correlación entre los niveles de expresión y las características clínico-patológicas en el grupo nsTTCG (n= 15 muestras). Los colores indican la dirección y magnitud de las correlaciones, donde los tonos azules representan correlaciones negativas y los rojos correlaciones positivas. La intensidad del color corresponde al valor del coeficiente de correlación (r), según la escala mostrada a la derecha, que varía de -1 (correlación negativa) a +1 (correlación positiva).

El siguiente par de correlaciones corresponden al estadio clínico al momento del diagnóstico (I y III), al igual que en el caso anterior la mayoría de las correlaciones son débiles, por lo cual en el estadio I destacan las correlaciones entre los niveles de expresión de *GALNT3* y *KPNA6* ($r=0.70$ $p= 0.0073$), asimismo *GALNT3* mostró una correlación positiva fuerte con el grupo con presencia de *NISCG* ($r=0.82$, $p=0.0005$), de manera similar los niveles de expresión de *KPNA6* presentaron una correlación positiva moderada con la presencia de *NISCG* ($r=0.62$ y $p=0.024$), por otro lado se encontró una correlación positiva moderada entre los niveles de expresión de *ARID4B* y la presencia de *NISCG* ($r=-0.58$ y $p=0.038$). Finalmente,

para este grupo se observó una correlación positiva fuerte entre la presencia de la metástasis y la presencia de microlitiasis ($r=1$ y $p< 0.001$), sin embargo, es importante aclarar que se trata de un sólo individuo que cumple con ambas características, figura 22A. Para el caso del estadio III hay una correlación positiva fuerte entre los niveles de expresión de *KPNA6* y la presencia de metástasis ($r=0.64$, $p=0.046$), figura 22B.

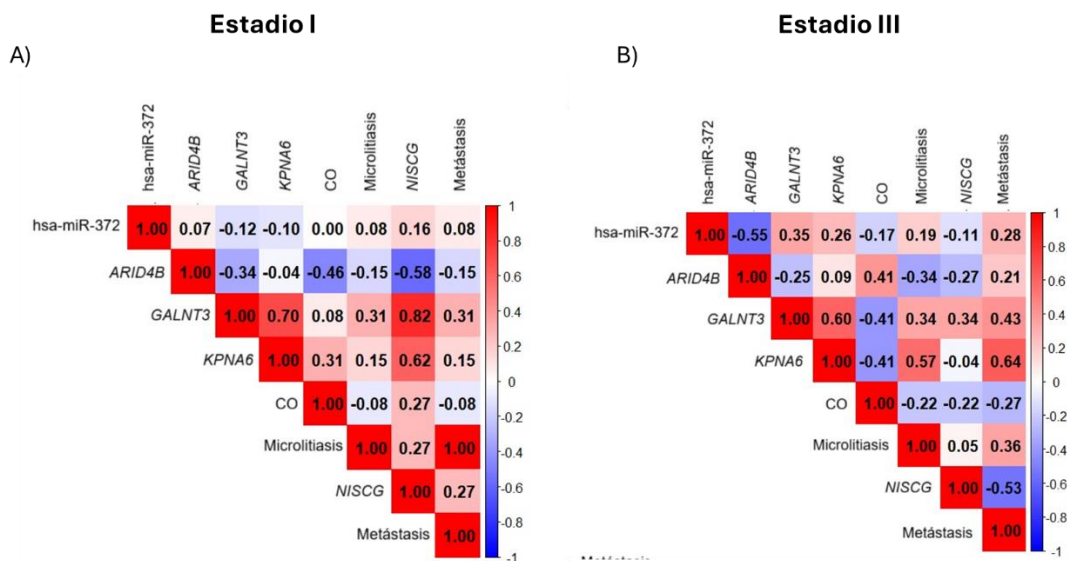


Figura 22. Correlación entre los niveles de expresión y las características clínico-patológicas por estadio clínico al momento del diagnóstico. Figura 21A) se muestra la correlación para el grupo diagnosticado en el estadio clínico I ($n= 12$ muestras). Figura 21B) se muestra la correlación para el grupo diagnosticado en el estadio clínico III ($n= 11$ muestras). Los colores indican la dirección y magnitud de las correlaciones, donde los tonos azules representan correlaciones negativas y los rojos correlaciones positivas. La intensidad del color corresponde al valor del coeficiente de correlación (r), según la escala mostrada a la derecha, que varía de -1 (correlación negativa) a $+1$ (correlación positiva).

Finalmente, las correlaciones para los grupos con presencia y ausencia de la *NISCG*, en el grupo con presencia de *NISCG* no se observó ninguna correlación

estadísticamente significativa, figura 23A. En el grupo con ausencia de *NISCG* presentó una correlación moderada entre los niveles de expresión de *KPNA6* y *GALNT3* ($r=0.69$, $p=0.013$), de igual forma los niveles de expresión de *GALNT3* se correlacionaron fuerte y de manera positiva con la presencia de metástasis ($r=0.75$ y $p=0.0047$), mientras que los niveles de expresión de *KPNA6* se correlacionaron positivamente moderada con la presencia de metástasis ($r=0.64$ y $p=0.024$), la presencia de metástasis también se correlacionó fuertemente con la presencia de microlitiasis ($r=0.77$ y $p=0.0031$), finalmente la presencia de microlitiasis y los niveles de expresión de *GALNT3* mostraron una correlación positiva moderada ($r=0.58$ y $p=0.046$) Figura 23B.

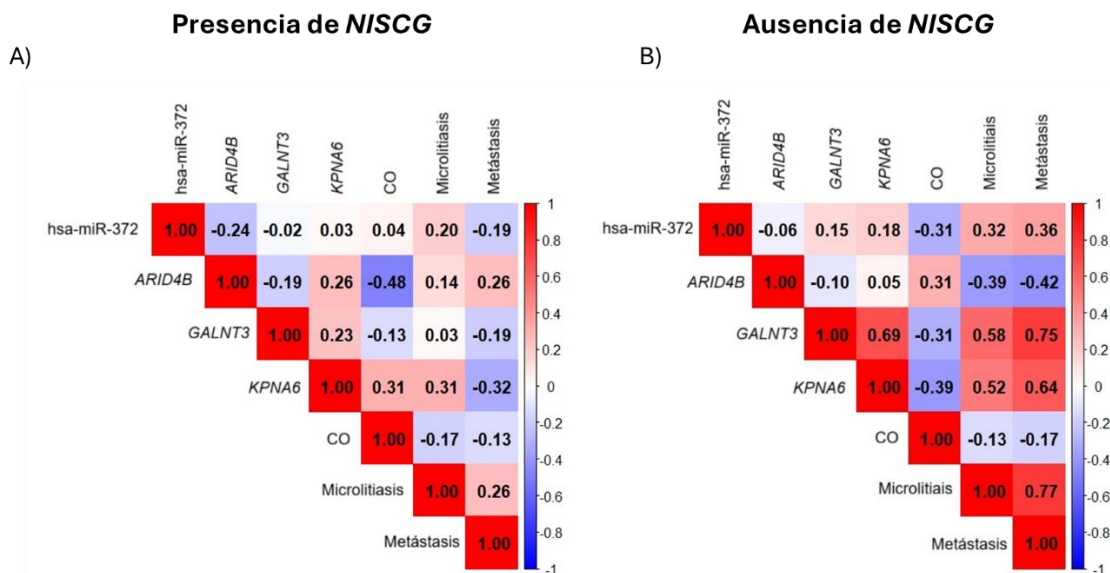


Figura 23. Correlación entre los niveles de expresión y las características clínico-patológicas por la presencia y ausencia de *NISCG*. Figura 22A) se muestra la correlación para el grupo con presencia de *NISCG* ($n= 12$ muestras). Figura 22B) se muestra la correlación para el grupo con ausencia de *NISCG* ($n= 12$ muestras). Los colores indican la dirección y magnitud de las correlaciones, donde los tonos azules representan correlaciones negativas y los rojos correlaciones positivas. La intensidad del color corresponde al valor del coeficiente de correlación (r), según la escala mostrada a la derecha, que varía de -1 (correlación negativa) a $+1$ (correlación positiva).

8.5. Modulación de la expresión de ARID4B, GALNT3 y KPNA6 mediada por el hsa-miR-372

Respecto a los niveles de expresión del hsa-miR-372, se observó de manera general un aumento en el grupo NT2/D1+mimic-miR-372 respecto al resto de los grupos experimentales; NT2/D1, NT2/D1+lipofectamina, NT2/D1+Scramble y NT2/D1+AntagomiR372, siendo este último grupo el que mostró una disminución importante en la expresión del hsa-miR-372 con un valor de $p=0.0001$ para el ANOVA entre los grupos.

Cabe señalar que, entre los tres grupos Control no se presentaron diferencias significativas entre ellos. La comparación de los tres grupos Control con el grupo NT2/D1 + AntagomiR-372 no mostró diferencias significativas ($p = 0.999$ en todas las comparaciones). En contraste, el grupo NT2/D1 + mimic-miR-372 presentó diferencias significativas respecto a los grupos Control, con valores de $p = 0.0003$ con a NT2/D1, $p = 0.0002$ con a NT2/D1 + lipofectamina, $p = 0.0003$ con a NT2/D1 + Scramble, y $p < 0.0001$ con a NT2/D1 + AntagomiR-372, como se muestra en la Figura 24.

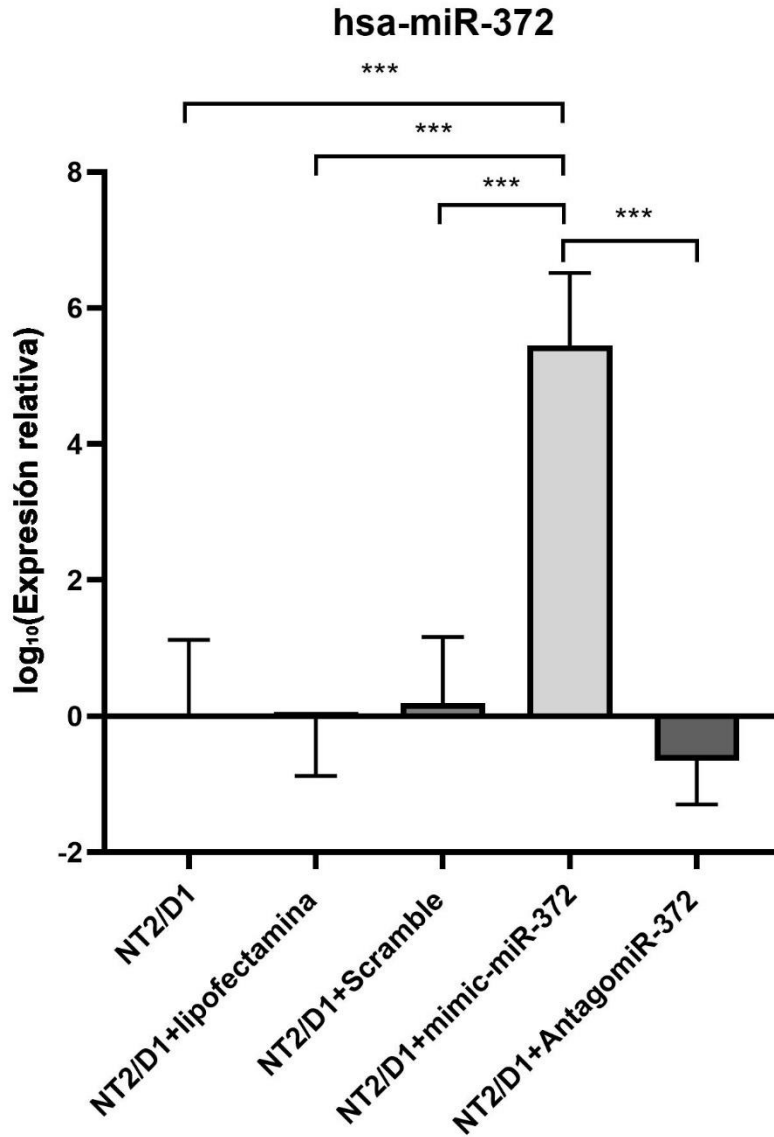


Figura 24. Comparación de los niveles de expresión relativa del hsa-miR-372. La figura muestra los niveles de expresión relativa del hsa-miR-372 en los cinco grupos experimentales. Los resultados se muestran como media \pm SDs. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$ y *** = $p < 0.001$.

En cuanto a los niveles de expresión de los transcritos *ARID4B* y *KPNA6* (Figura 25 y 26) no se observaron diferencias significativas para la prueba de ANOVA en ninguno de los dos casos ($p = 0.7547$ para *ARID4B* y $p = 0.5203$ para *KPNA6*) tampoco se observaron diferencias significativas de los niveles de expresión para ambos transcritos entre los cinco grupos.

ARID4B

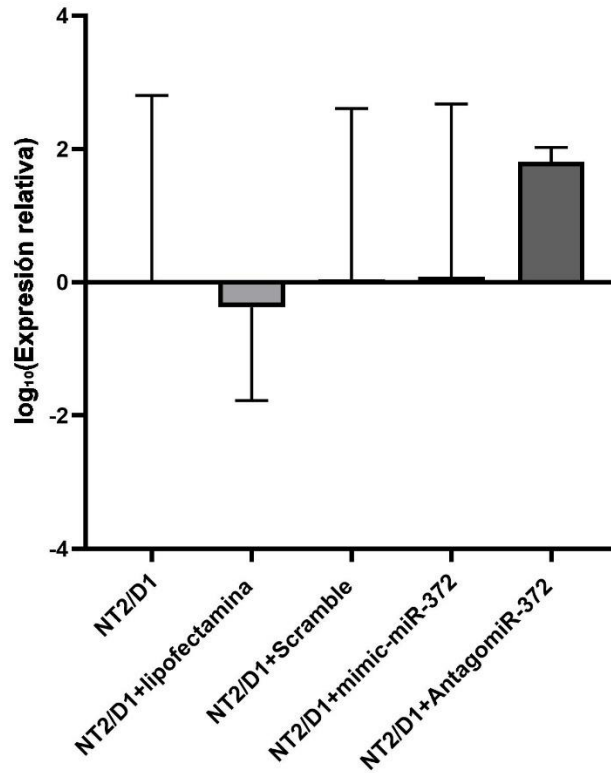


Figura 25. Comparación de los niveles de expresión relativa de *ARID4B*. La figura muestra los niveles de expresión relativa del transcrito *ARID4B* en los cinco grupos. Los resultados se muestran como media \pm SDs. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$ y *** = $p < 0.001$.

KPNA6

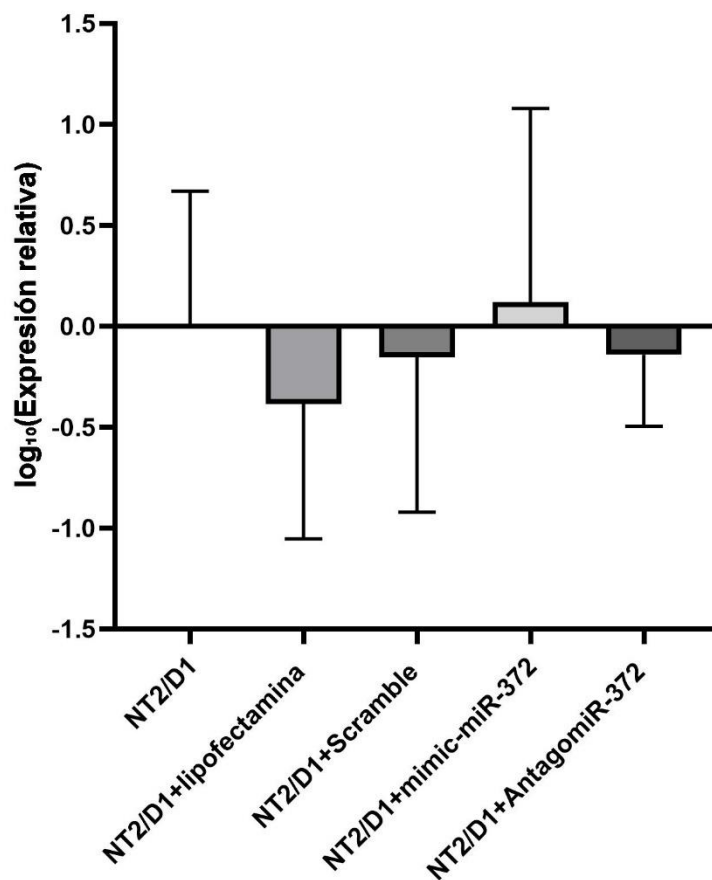


Figura 26. Comparación de los niveles de expresión relativa de *KPNA6*. La figura muestra los niveles de expresión relativa del transcrito *KPNA6* en los cinco grupos. Los resultados se muestran como media \pm SDs. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$ y *** = $p < 0.001$.

Finalmente, el análisis de ANOVA para *GALNT3* mostró diferencias significativas entre los grupos con un valor de $p = 0.0022$. El grupo NT2/D1 + AntagomiR-372 presentó una disminución significativa de los niveles de expresión en comparación con los grupos NT2/D1 ($p = 0.0026$), NT2/D1 + lipofectamina ($p = 0.0052$) y NT2/D1 + Scramble ($p = 0.0129$) y NT2/D1 + mimic-miR-372 ($p = 0.0063$). Esto sugiere que

la modulación del hsa-miR-372 puede producir cambios en los niveles de expresión del *GALNT3*. Figura 26.

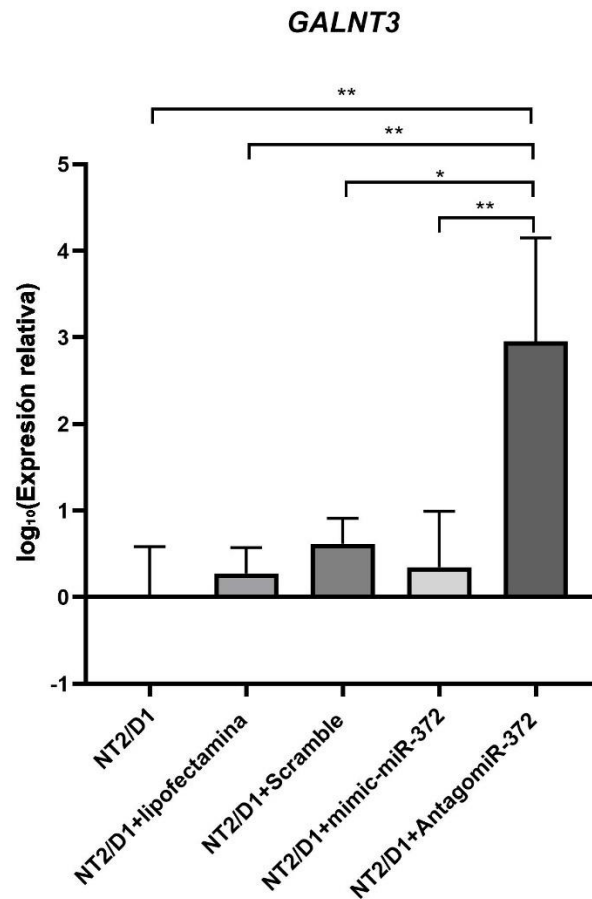


Figura 27. Comparación de los niveles de expresión relativa de *GALNT3*. La figura muestra los niveles de expresión relativa del transcrito *GALNT3* en los cinco grupos. Los resultados se muestran como media \pm SDs. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$ y *** = $p < 0.001$.

El análisis por Western blot mostró un aumento discreto en la Inmunodetección de *GALNT3* en el grupo NT2/D1+AntagomiR-372, con respecto al resto de los grupos, KPNA6 se muestra con la misma Inmunodetección en los primeros cuatro grupos, sin embargo, en el grupo NT2/D1+AntagomiR-372 no se encuentra presencia de la

proteína. ARID4B no se encuentra presente en ninguno de los grupos. El control de carga (en este caso GADPH) se observa homogéneo en todos los grupos, figura 28

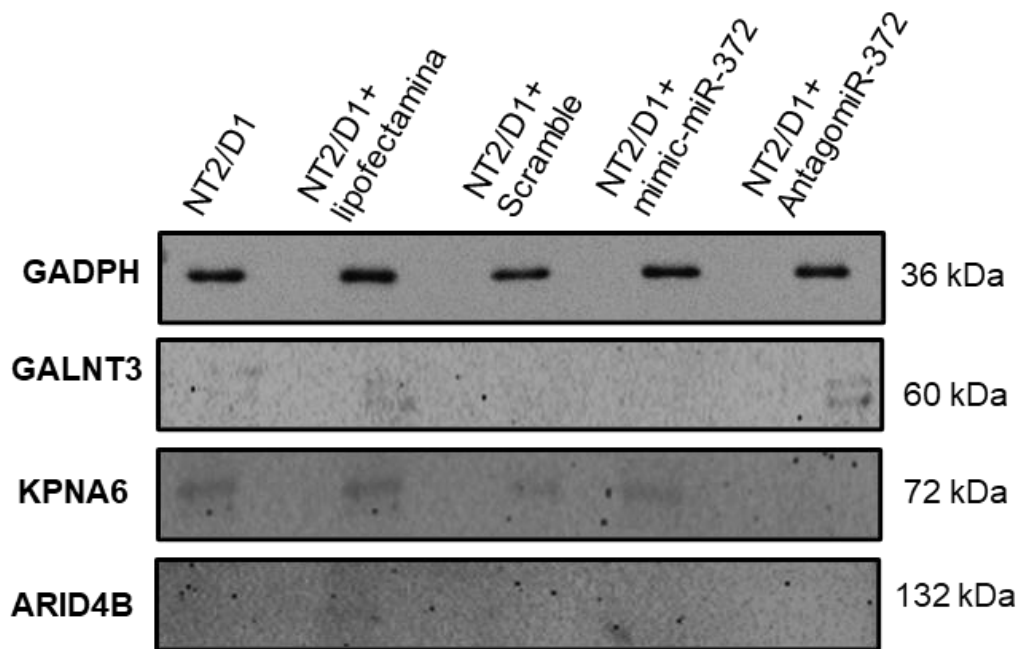


Figura 28. Inmunodetección de las proteínas GADPH, ARID4B, GALNT y KPNA6. Fotos obtenidas con ChemiDoc MP Imaging System.

9. Discusión

EL TTCG es la neoplasia sólida más común a nivel mundial en varones de 15-44 años de edad, su relación con la CO y sus mecanismos de regulación génica mediado por el clúster hsa.miR-371-373, han despertado un creciente interés en su estudio, el presente trabajo integra los hallazgos clínicos de una muestra de TTCG con los resultados de expresión del hsa.miR-372 y tres posibles blancos de este miRNA, *ARID4B*, *GALNT3* y *KPNA6*, así como su correlación con variables clínico-patológicas, con la intención de identificar en algún futuro marcadores moleculares que relacionen a la CO con la progresión al TTCG.

Respecto a los resultados clínico-patológicos del grupo TTCG de nuestro estudio, 26 años fue la mediana de edad al diagnóstico, lo que coincide con lo reportado en la literatura donde se describe desde los 15 a los 44 años (Batool *et.al.*, 2019; Chavarriaga *et.al.*, 2025; Singla *et.al.*, 2025), Lo cual confirma la presentación de esta neoplasia en la etapa productiva laboral del varón, comprometiendo, además; su reproducción sexual a futuro. En cuanto a la lateralidad del tumor, se reportó un 50% (12/24) en el testículo derecho, un 45.83% (11/24) en el izquierdo y el 4.17% (1/24) de forma bilateral, esto coincide con lo reportado por otros autores, y de manera importante para la predominancia del TTCG bilateral, el cual va del 1-5% de los casos reportados (Sarıcı *et.al.*, 2013). Continuando con los antecedentes de CO, nuestra muestra mostró que el 8.34% (2/24) lo cual es similar a lo reportado por otros autores que corresponde al 10% (Singla *et al.*, 2025). En relación al tipo histológico el nsTTCG fue el más predominante con el 62.5% (15/24), se ha reportado que esta predominancia es $\geq 65\%$ (Almstrup *et.al.*, 2010). El 50% de los pacientes fueron diagnosticados en el estadio I, sin embargo el 45.83% (11/24) fue

diagnosticado en el estadio III, estudios anteriores reportan que a nivel mundial entre el 70% y 75% de los casos se diagnostican en el estadio I (Singla *et.al.*, 2025), esto podría darnos un indicio de que se requiere más atención al diagnóstico oportuno, pero además mayor difusión del riesgo de desarrollar TTCG y cuáles son los factores de riesgo que podrían desencadenarlo. La microlitiasis testicular se identificó en el 20.83% (5/24) de la muestra, a pesar de que no hay datos de la prevalencia de microlitiasis en adultos con TTCG, se ha reportado que en presencia de otros factores de riesgo si se asocia con el TTCG (T Hoen *et.al.*, 2021). Por otro lado, el 20.83% (5/24) de los pacientes en esta muestra presentaron metástasis a su vez todos ellos presentaron metástasis en pulmón, el cual es uno de los sitios metastásicos más comunes del TTCG (Li *et.al.*, 2023).

Respecto a los resultados de expresión de los transcritos en el tejido testicular, se observó un incremento significativo en la expresión del hsa-miR-372 en del grupo TTCG en comparación con el grupo Control, esto coincide con lo reportado por distintos autores. Se ha descrito que el clúster de miRNAs hsa-miR-371-373 se expresa en conjunto en el TTCG, donde sustituye la ausencia de p53 mutado y participa en las funciones tumorales de proliferación y mantenimiento del estado pluripotente (Looijenga, L. H. *et. al*, 2007).

En células germinales el hsa-miR-372 y 373 participan en la proliferación celular al suprimir la expresión de inhibidores de CDK, en el TTCG neutralizan la función de CDK mediada por p53 mediante la represión de supresor tumoral *LATS2* (Voorhoeve, P. M. *et. al*, 2006).

Adicionalmente, un estudio prospectivo realizado por Dieckmann y colaboradores en el año 2012 en 24 pacientes con sTTCG y nsTTCG, encontraron niveles de expresión elevados del clúster hsa-miR-371a-3p-373-3p, los cuales disminuyeron posterior a la orquiectomía.

Con respecto a los niveles de expresión de los transcritos *ARID4B*, *GALNT3* y *KPNA6*, se ha reportado en bases de datos que en condiciones normales la expresión de estos transcritos va de moderada a alta (<http://gepia2.cancer-pku.cn/#i>), en nuestro trabajo los tres transcritos presentaron una disminución en el grupo TTCG con respecto al grupo Control, esto coincide con la predicción bioinformática previamente reportada por nuestro grupo de trabajo (García-Andrade *et al.*, 2023), sin embargo, estos datos solo han sido reportados en bases de datos como ArrayExpress (<https://www.ebi.ac.uk/biostudies/arrayexpress>), así como, en servidores web como GEPIA2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/#i>) y el portal UALCAN (<https://ualcan.path.uab.edu/index.html>).

El análisis de los niveles de expresión del hsa-miR-372 y de los transcritos nos sugiere que aunque son claras las diferencias entre el grupo TTCG y el grupo Control, en nuestra muestra no se observaron variaciones relevantes entre subtipos histológicos, a pesar de que se ha reportado que el clúster hsa-miR-371-3 se expresan principalmente en sTTCG y en el carcinoma embrionario (Looijenga *et al.*, 2007). Tampoco se observó variaciones entre la presencia de microlitiasis, metástasis o *NISCG*, lo cual sugiere que la expresión del hsa-miR-372 es un evento común en el TTCG. Este mismo comportamiento se presentó en el resto de los transcritos (*ARID4B*, *GALNT3* y *KPNA6*), donde no encontramos diferencias

significativas entre los subtipos histológicos, ni las características clínico-patológicas, otra posible explicación de esto se puede deber al tamaño muestral discreto de nuestro estudio.

Aunque para el TCG no hay reportes para los 3 transcritos anteriormente mencionados, existe evidencia de sus patrones de expresión para otros tipos de cáncer. De Manera similar a lo observado en nuestro trabajo, la expresión de *ARID4B* se encuentra reprimida en el cáncer colorrectal, donde uno de sus reguladores es el hsa-miR-39-3p, el cual es secuestrado por medio del circ-SMARCA5, que induce una regulación positiva para *ARID4B*, lo que a su vez inhibe la progresión del cáncer colorrectal (Miao *et.al.*, 2020). En cáncer de próstata se ha reportado que la expresión de *ARID4B* regula negativamente la progresión tumoral, mientras que su inhibición promovió la proliferación (Liang *et.al.*, 2018), por el contrario su expresión podría estar participando en la progresión del carcinoma hepatocelular al activar la vía PI3K/AKT (Akaoka *et.al.*, 2025). Similar a lo que ocurre en *ARID4B*, tampoco se tienen datos de cómo se comporta *GALNT3* en el TCG, sin embargo se ha reportado que mutaciones en *GALNT3* podrían estar asociadas con la evolución de la calcinosis tumoral familiar hiperfosfatemia (Rafaelsen *et.al.*, 2014), por otro lado la O-glicosilación aberrante en el cáncer se atribuye a alteraciones en las N-acetilgalactosaminiltransferasas (GalNAc-Ts). Ensayos *in vitro* demostraron que la inhibición simultánea de *GALNT3* y *GALNT6* se asoció con efectos inhibitorios de la progresión del cáncer de ovario epitelial (Sheta *et al.*, 2019), la sobreexpresión de *GALNT3* también se asocia con la infiltración de células inmunitarias y un mal pronóstico en el adenocarcinoma de pulmón, incluso se ha

propuesto como un biomarcador para este tipo de cáncer (Luo *et al.*, 2023), hasta el momento, no se han reportado estudios que describan como actúa la represión de *GALNT3* en otros tipos de cáncer, como se documenta en nuestro trabajo. Por último, la expresión de *KPNA6* se ha asociado como un marcador pronóstico en el cáncer de hígado y en el cáncer renal, entre más reprimido se encuentre el pronóstico es más desfavorable en ambos casos (<https://www.proteinatlas.org/>).

Los resultados de histología mostraron que en el grupo Control las características histológicas concuerdan con lo esperado para individuos peri puberales, en el 60% (3/5) de las muestras encontramos cordones seminíferos con un epitelio seminífero bien estructurado que correspondientes a individuos de 6, 7 y 8 años, en el 20% (1/5) se identificaron tubos seminíferos inmaduros bien organizados que corresponden a un individuo de 10 años, mientras que en la última muestra se observaron tubos seminíferos maduros que corresponde a un individuo de 16 años, esto concuerda con lo reportado para el desarrollo normal de la gónada (Thorup *et al.*, 2024). En contraste a esto las muestras de TTCCG mostraron una pérdida total de la estructura de tubos seminíferos, pero se encontraron las estructuras típicas para sTTCCG y nsTTCCG, en el sTTCCG se identificaron células grandes, pleomórficas y uniformes con un citoplasma claro, estas características coinciden con los reportado para este tipo histológico (Fichtner *et al.*, 2024), mientras tanto en el grupo nsTTCCG se observaron patrones celulares heterogéneos, algunas áreas imitaban el patrón celular del grupo sTTCCG, sin embargo la pérdida del citoplasma era evidente

en la mayoría de ellos, el grupo nsTTTCG no tiene una histología definida, por lo cual cada caso debe ser clasificada por histopatología (Winter *et.al.*, 2022).

Respecto a la inmunorreactividad para Vimentina, se confirmó la integridad de todos los tejidos incluidos en este trabajo, tanto el grupo Control y el grupo TTTCG, la distribución de la Vimentina en el grupo control concuerda con su función principal en el testículo, que es dar soporte a las células de Sertoli, sin embargo en el grupo TTTCG ya no se observa este patrón lo cual es un indicio de la desorganización del parénquima testicular, lo cual es esperable en esta neoplasia (Saito *et.al.*, 2023).

En el caso de ARID4B no se observó inmunorreactividad para los ensayos inmunohistoquímicos preliminares, sin embargo, antes de descartar estos resultados, consideramos que aún se debe trabajar en la estandarización de la técnica para este anticuerpo.

La inmunorreactividad para GALNT3 y KPNA6 se observó en el 40% (2/5) del grupo Control, su localización coincide con la función reportada para estas proteínas, aparato de Golgi en el caso de GALNT3 y Citoplasma en el caso de KPNA6 (<https://www.uniprot.org/>). En el grupo TTTCG sólo se observó inmunorreactividad en el 29.16% (7/24) para GALNT3, lo cual no sugiere una alteración en la glicosilación de proteínas, las alteraciones en GALNT3 se han asociado con la progresión del adenocarcinoma de pulmón (Liu *et.al.*, 2018). La ausencia de inmunorreactividad para KPNA6 se puede asociar con la pérdida en las funciones de transporte nuclear, aunque para el TTTCG no hay nada reportando pero en el cáncer de mama se ha

descrito que la interferencia de BIG3 en las regiones de unión de PHB2 a KPNA1, KPNA5 y KPNA6, esto desencadena la inhibición de la translocación nuclear de PHB2 y a su vez provoca la pérdida de la supresión tumoral (Kim *et.al.*, 2015).

Hasta el momento no existen datos sobre la abundancia de GALNT3 ni de KPNA6 a lo largo del desarrollo testicular, sin embargo, en este trabajo se identificó su presencia de manera consistente en los tejidos correspondiente a pacientes en etapa puberal, mientras que no se observó inmunorreactividad en etapas infantiles, lo que sugiere por un lado un patrón dependiente de maduración gonadal, pero que además su función está ligada a la espermatogénesis.

El análisis de la correlación entre los niveles de expresión del hsa-miR-372, *ARID4B*, *GALNT3* y *KPNA6* no se presentó ninguna correlación estadísticamente significativa, lo que sugeriría en este contexto que no hay un patrón lineal entre la expresión del microRNA y los transcritos, esto puede deberse al tamaño de la muestra y la heterogeneidad histológica del TTCG, puesto que aunque se ha reportado que el clúster hsa-miR-371-373 se expresa de manera general en el TTCG si hay reportes de la variación de esta expresión por tipo histológico (Almstrup *et.al.*, 2020).

La correlación para el grupo nTTCG reflejó una correlación positiva fuerte entre la expresión de *GALNT3* y *KPNA6* ($r = 0.70$, $p = 0.0037$), esta correlación sugiere que podrían estar participando en conjunto en alguna vía asociada al TTCG, sin embargo no se han reportado en una vía conjunta, se ha descrito que la regulación positiva de *GALNT3* puede promover la progresión maligna en el adenocarcinoma

de ratón al funcionar como un activador de la vía NF- κ B (Y. Li *et.al.*, 2022), por el contrario en el cáncer de pulmón funciona como un supresor tumoral al inhibir la función de las vías TNFR1-NF κ B y cMET-pAKT (Park *et.al.*, 2021). Por su parte KPNA6 no ha sido asociada con alguna vía de señalización asociada al cáncer. Sin embargo, la correlación positiva entre la microlitiasis y *KPNA6* nos sugiere que su regulación a la baja puede estar asociada a la alteración celular y cambios en la expresión génica vinculados a muerte celular, esta relación no ha sido reportada. La correlación positiva entre la microlitiasis y la metástasis ($r=0.53$ y $p=0.040$) refuerza la hipótesis de que su presencia en conjunto con otra afección urológica conllevan a un mayor riesgo para desarrollar TTCG (T Hoen *et.al.*, 2021) pero que además podría ser un factor agravante de la afección.

En el análisis por estadio clínico, las correlaciones en el estadio I destacaron ya que se encontró una correlación fuerte entre los niveles de expresión de *GALNT3* y *KPNA6* ($r=0.70$, $p=0.007$), al igual que entre *GALNT3* y la presencia de la NISCG ($r=0.82$, $p=0.0005$), estos resultados nos podrían sugerir que hay un papel importante en la transformación de la NISCG a TTCG, si bien en TTCG no se tiene información, en el cáncer de ovario se ha reportado que las GalNAc-Ts, en especial *GALNT3* está estrechamente involucrada con la progresión del tumor (Wang *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2021). Además, *KPNA6* mantiene una correlación moderada con la presencia de la NISCG ($r=0.62$, $p=0.024$) pero *ARID4B* tiene una correlación moderada negativa con la presencia de la NISCG ($r=-0.58$, $p=0.038$), lo cual nos sugiere un role opuesto de los productos proteicos, por un lado *KPNA6* podría comportarse como un facilitador de transporte nuclear de factores oncogénicos en

etapas tempranas del TCG y ARID4B podría estar participando como un regulador de la transcripción con una función supresora, el papel de supresor tumoral de ARID4B se ha reportado en el cáncer de próstata (Liang *et al.*, 2018b) y en el cáncer colorrectal (Miao *et al.*, 2020).

En el estadio III la correlación positiva entre los niveles de expresión de *KPNA6* y la presencia de metástasis ($r=0.64$, $p=0.046$) es particularmente interesante, ya que nos da un indicio de que tipo de factores podría estar transportando *KPNA6* en las etapas tempranas de la tumoración, pero también en etapas avanzadas, en este caso serían factores asociados con la invasión y migración celular, sin embargo, no existen estudios que relacionen a *KPNA6* con la metástasis.

En la última correlación que abarco el grupo sin *N/SCG*, se observó que en este grupo se mantiene una correlación positiva entre los niveles de expresión de *GALNT3* y los de *KPNA* ($r=0.69$, $p=0.013$), esto es similar a la correlación que se encontró en el grupo *nsTCG* ($r=0.70$, $p=0.0037$), lo cual refuerza la consistencia de esta correlación, también se encontró que los niveles de expresión de *GALNT3* y *KPNA6* se correlacionan de manera significativa con la presencia de metástasis ($r=0.75$, $p=0.0047$ y $r=0.64$, $p=0.024$ respectivamente), a su vez encontramos una correlación fuerte entre la metástasis y la microlitiasis ($r=0.77$, $p=0.0031$) lo cual nos sugiere que las alteraciones en *GALNT3/KPNA6* podrían formar un eje con la microlitiasis y la metástasis, la relación entre la microlitiasis y la metástasis no está del todo documentada, pero en un estudio observacional donde se compararon pacientes con TCG con microlitiasis y sin microlitiasis, con seguimiento post orquiectomía, reporto una mayor tasa de metástasis en pacientes con presencia de

microlitiasis con respecto a pacientes sin microlitiasis (58,3% frente a 5,9%, $p < 0,001$) (Selvi *et al.*, 2020).

Aunque algunas correlaciones no consiguieron significancia estadística, debemos recalcar que el tamaño de la muestra en nuestro estudio fue limitado y heterogéneo, estos factores pueden influir al momento de hacer el análisis estadístico, aun así, los resultados nos sugieren que *GALNT3* y *KPNA6* podrían actuar de manera coordinada en el TTCG.

En nuestro ultimo objetivo, la modulación del hsa-miR-372 en la línea celular NT2/D1 nos permitió explorar su posible relación con los ejes de regulación de *ARID4B*, *GALNT3* y *KPNA6*, y a su vez con sus productos proteicos.

Como era de esperarse la transfección con el mimic-miR-372 provocó un aumento significativo en los niveles de expresión del hsa-miR-372, esto comparándolo con los tres grupos control (NT2/D1, NT2/D1+ Lipofectamina y NT2/D1+ Scramble los tres casos con una $p = 0.0003$) y con el grupo transfectado con el antagonista del hsa-miR-372 $p < 0.0001$, estos resultados nos ayudan a confirmar la eficiencia de la transfección y la validez del modelo celular.

Con respecto a los genes evaluados, tanto *ARID4B* como *KPNA6* no mostraron diferencias significativas entre los niveles de expresión en ninguno de los grupos, esto podría ser provocado por varios factores, por un lado podría ser la dosis del mimic-miR y el Antago-miR, en este trabajo la concentración utilizada fue de 30 nm siguiendo lo publicado para este microRNA (Huang *et al.*, 2015), sin embargo no

descartamos la posibilidad de que a concentraciones más elevada tengamos mejores resultados.

Por otro lado, en *GALNT3* los resultados fueron bastante relevantes, teniendo una disminución significativa en los niveles de expresión en el grupo transfectado con el AntagomiR-372 en comparación con los grupos control; NT2/D1 ($p = 0.0026$), NT2/D1 + lipofectamina ($p = 0.0052$) y NT2/D1 + Scramble ($p = 0.0129$) y con el grupo transfectado con el mimic-miR ($p = 0.0022$), esto sugiere que la represión del hsa-miR-372 puede inducir la expresión de *GALNT3* en el TTCG.

En congruencia a lo reportado en los niveles de expresión, el Western blot mostró una variación discreta en la Inmunodetección proteica de *GALNT3* en el grupo NT2/D1 + AntagomiR-372, mientras que *KPNA6* mantuvo una Inmunodetección similar en todos los grupos, excepto en el grupo NT2/D1 + AntagomiR donde fue indetectable su presencia, *ARID4B* no fue detectado, esto quizás se deba a su expresión basal baja, pero también a limitaciones técnicas del anticuerpo.

Estos últimos resultados sugieren que el hsa-miR-372 podría estar modulando la expresión del *GALNT3* en la línea celular NT2/D1 y a su vez afectar su producto proteico.

La disminución conjunta de *ARID4B*, *GALNT3* y *KPNA6* en el tejido tumoral apuntan hacia una posible interacción funcional en vías relacionadas con la progresión del TTCG, la regulación de *GALNT3/GALNT3* como consecuencia de la modulación del hsa-miR-372 en NT2/D1 refuerzan la importancia del hsa-miR-372 como un importante regulador en el TTCG

10. Conclusión

La modulación del hsa-miR-372 no afectó los niveles de expresión de los ejes ARID4B/ARID4B y KPNA6/KPNA6 .

La modulación del hsa-miR-372 afectó los niveles de expresión del eje GALNT3/GALNT3 en la línea celular NTERA-2 de TTCG, lo que concuerda con los niveles de expresión identificados para el eje hsa-miR-372/GALNT3/GALNT3 en muestras de pacientes con TTCG.

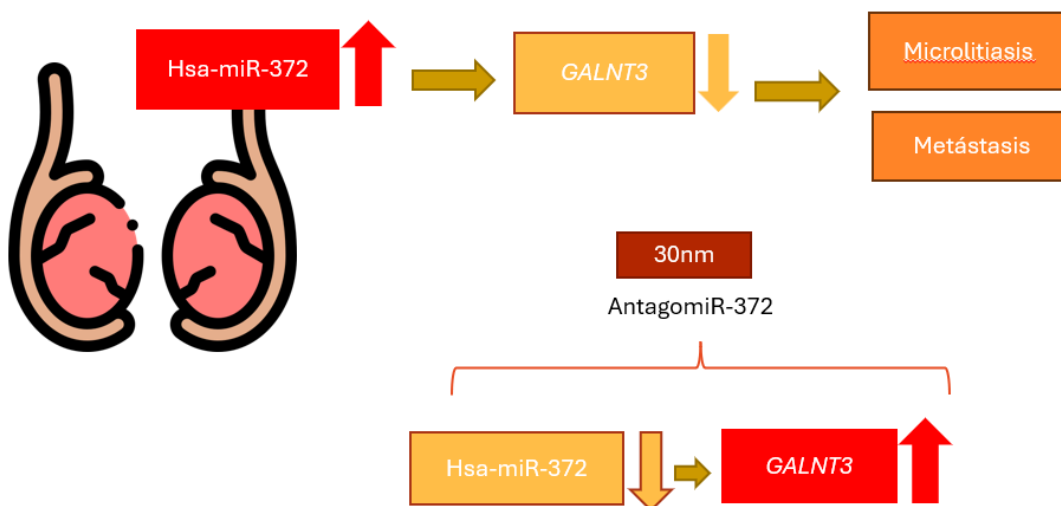


Figura 29. Figura integrativa.

11. Bibliografía

1. Akaoka, M., Yanagaki, M., Kubota, H., Haruki, K., Furukawa, K., Taniai, T., Onda, S., Hamura, R., Tsunematsu, M., Shirai, Y., Matsumoto, M., Shimoda, M., & Ikegami, T. (2025). ARID4B Promotes the Progression of Hepatocellular Carcinoma Through the PI3K/AKT Pathway. *Annals of Surgical Oncology*, 32(4), 3009-3018. <https://doi.org/10.1245/s10434-024-16790-9>
2. Almstrup, K., Lobo, J., Mørup, N., Belge, G., Rajpert-De Meyts, E., Looijenga, L. H. J., & Dieckmann, K.-P. (2020). Application of miRNAs in the diagnosis and monitoring of testicular germ cell tumours. *Nature Reviews Urology*, 17(4), 201-213. <https://doi.org/10.1038/s41585-020-0296-x>
3. Almstrup, K., Nielsen, J. E., Mlynarska, O., Jansen, M. T., Jørgensen, A., Skakkebaek, N. E., & Rajpert-De Meyts, E. (2010). Carcinoma in situ testis displays permissive chromatin modifications similar to immature foetal germ cells. *British Journal of Cancer*, 103(8), 1269-1276. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605880>
4. Al-Obaidy, K. I., & Idrees, M. T. (2021). Testicular Tumors: A Contemporary Update on Morphologic, Immunohistochemical and Molecular Features. *Advances in Anatomic Pathology*, 28(4), 258-275. <https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000302>
5. Barthold, J. S., & Ivell, R. (2018). Perspective: A Neuro-Hormonal Systems Approach to Understanding the Complexity of Cryptorchidism Susceptibility. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 401. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00401>
6. Batool, A., Karimi, N., Wu, X.-N., Chen, S.-R., & Liu, Y.-X. (2019). Testicular germ cell tumor: A comprehensive review. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(9), 1713-1727. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03022-7>

7. Chavarriaga, J., & Hamilton, R. J. (2023). miRNAs for testicular germ cell tumours: Contemporary indications for diagnosis, surveillance and follow-up. *Andrology*, *11*(4), 628-633. <https://doi.org/10.1111/andr.13337>
8. Chavarriaga, J., Nappi, L., Papachristofilou, A., Conduit, C., & Hamilton, R. J. (2025). Testicular cancer. *The Lancet*, *406*(10498), 76-90. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(25\)00455-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(25)00455-6)
9. Chavez-Saldana, M. (2017). Epigenetic and risk factors of testicular germ cell tumors a brief review. *Frontiers in Bioscience*, *22*(7), 1073-1098. <https://doi.org/10.2741/4534>
10. Ciongradi, C. I., Sârbu, I., Iliescu Halițchi, C. O., Benchia, D., & Sârbu, K. (2021). Fertility of Cryptorchid Testis—An Unsolved Mistery. *Genes*, *12*(12), 1894. <https://doi.org/10.3390/genes12121894>
11. Culty, M. (2009). Gonocytes, the forgotten cells of the germ cell lineage. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, *87*(1), 1-26. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20142>
12. Dieckmann, K.-P., & Pichlmeier, U. (2004). Clinical epidemiology of testicular germ cell tumors. *World Journal of Urology*, *22*(1), 2-14. <https://doi.org/10.1007/s00345-004-0398-8>
13. Dieckmann, K.-P., Spiekermann, M., Balks, T., Flor, I., Löning, T., Bullerdiek, J., & Belge, G. (2012). MicroRNAs miR-371-3 in serum as diagnostic tools in the management of testicular germ cell tumours. *British Journal of Cancer*, *107*(10), 1754-1760. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.469>
14. Drumond, A. L., Meistrich, M. L., & Chiarini-Garcia, H. (2011). Spermatogonial morphology and kinetics during testis development in mice: A high-resolution light microscopy approach. *REPRODUCTION*, *142*(1), 145-155. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0431>

15. Elamo, H. P., Virtanen, H. E., & Toppari, J. (2022). Genetics of cryptorchidism and testicular regression. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 36(1), 101619. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2022.101619>
16. Fichtner, A., Nettersheim, D., & Bremmer, F. (2024). Pathogenesis and pathobiology of testicular germ cell tumours: A view from a developmental biological perspective with guidelines for pathological diagnostics. *Histopathology*, 85(5), 701-715. <https://doi.org/10.1111/his.15249>
17. García-Andrade, F., Viguera-Villaseñor, R. M., Chávez-Saldaña, M. D., Rojas-Castañeda, J. C., Bahena-Ocampo, I. U., Aréchaga-Ocampo, E., Flores-Fortis, M., Díaz-Chávez, J., Herrera, L. A., & Landero-Huerta, D. A. (2023). Molecular Characterization of Patients with Cryptorchidism: Preliminary Search for an Expression Profile Related to That of Testicular Germ-Cell Tumors. *Diagnostics*, 13(18), 3020. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13183020>
18. Gurney, J. K., McGlynn, K. A., Stanley, J., Merriman, T., Signal, V., Shaw, C., Edwards, R., Richiardi, L., Hutson, J., & Sarfati, D. (2017). Risk factors for cryptorchidism. *Nature Reviews Urology*, 14(9), 534-548. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2017.90>
19. Hildorf, S., Clasen-Linde, E., Cortes, D., Fossum, M., & Thorup, J. (2020). Fertility Potential is Compromised in 20% to 25% of Boys with Nonsyndromic Cryptorchidism despite Orchiopexy within the First Year of Life. *Journal of Urology*, 203(4), 832-840. <https://doi.org/10.1097/JU.0000000000000615>
20. Huang, X., Huang, M., Kong, L., & Li, Y. (2015). miR-372 suppresses tumour proliferation and invasion by targeting IGF 2 BP 1 in renal cell carcinoma. *Cell Proliferation*, 48(5), 593-599. <https://doi.org/10.1111/cpr.12207>

21. Hutson, J. M., Li, R., Southwell, B. R., Newgreen, D., & Cousinery, M. (2015). Regulation of testicular descent. *Pediatric Surgery International*, 31(4), 317-325. <https://doi.org/10.1007/s00383-015-3673-4>
22. Kim, N.-H., Yoshimaru, T., Chen, Y.-A., Matsuo, T., Komatsu, M., Miyoshi, Y., Tanaka, E., Sasa, M., Mizuguchi, K., & Katagiri, T. (2015). BIG3 Inhibits the Estrogen-Dependent Nuclear Translocation of PHB2 via Multiple Karyopherin-Alpha Proteins in Breast Cancer Cells. *PLOS ONE*, 10(6), e0127707. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127707>
23. Kvist, K., Clasen-Linde, E., Langballe, O., Hansen, S. H., Cortes, D., & Thorup, J. (2018). The Expression of Markers for Intratubular Germ Cell Neoplasia in Normal Infantile Testes. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 286. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00286>
24. Li, S., Xiong, S., Yang, L., Zheng, F., Liu, J., Jiang, M., Liu, X., Liu, W., Deng, J., Fu, B., & Deng, W. (2023). Development and validation of a nomogram to predict lung metastasis in patients with testicular germ cell tumors. *Heliyon*, 9(9), e20177. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e20177>
25. Li, Y., Zhao, J., Zhang, W., Wang, A., Jiao, M., Cai, X., Zhu, J., Liu, Z., & Huang, J. (2022). LINC02535/miR-30a-5p/GALNT3 axis contributes to lung adenocarcinoma progression via the NF- κ B signaling pathway. *Cell Cycle*, 21(23), 2455-2470. <https://doi.org/10.1080/15384101.2022.2101336>
26. Liang, Y., Han, Z., Lu, J., Liu, Z., Zhuo, Y., Zhu, X., Chen, J., Ye, J., Liang, Y., He, H., & Zhong, W. (2018a). Downregulation of ARID4A and ARID4B promote tumor progression and directly regulated by microRNA-30d in patient with prostate cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(9), 7245-7255. <https://doi.org/10.1002/jcb.26913>

27. Liang, Y., Han, Z., Lu, J., Liu, Z., Zhuo, Y., Zhu, X., Chen, J., Ye, J., Liang, Y., He, H., & Zhong, W. (2018b). Downregulation of ARID4A and ARID4B promote tumor progression and directly regulated by microRNA-30d in patient with prostate cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(9), 7245-7255. <https://doi.org/10.1002/jcb.26913>
28. Liu, B., Pan, S., Xiao, Y., Liu, Q., Xu, J., & Jia, L. (2018). LINC01296/miR-26a/GALNT3 axis contributes to colorectal cancer progression by regulating O-glycosylated MUC1 via PI3K/AKT pathway. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 37(1), 316. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0994-x>
29. Looijenga, L. H. J., Gillis, Ad. J. M., Stoop, H. J., Hersmus, R., & Oosterhuis, J. W. (2007). Chromosomes and Expression in Human Testicular Germ-Cell Tumors: Insight into Their Cell of Origin and Pathogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1120(1), 187-214. <https://doi.org/10.1196/annals.1411.000>
30. Luo, D., Fang, M., Shao, L., Wang, J., Liang, Y., Chen, M., Gui, X., Yan, J., Wang, W., Yu, L., Fan, X., & Wu, Q. (2023). The EMT-Related Genes GALNT3 and OAS1 are Associated with Immune Cell Infiltration and Poor Prognosis in Lung Adenocarcinoma. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 28(10), 271. <https://doi.org/10.31083/j.fbl2810271>
31. MacFarlane, L.-A., & R. Murphy, P. (2010). MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Current Genomics*, 11(7), 537-561. <https://doi.org/10.2174/138920210793175895>
32. Mäkelä, J.-A., Koskeniemi, J. J., Virtanen, H. E., & Toppari, J. (2019). Testis Development. *Endocrine Reviews*, 40(4), 857-905. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00140>

33. Manku, G., & Culty, M. (2015). Mammalian gonocyte and spermatogonia differentiation: Recent advances and remaining challenges. *REPRODUCTION*, 149(3), R139-R157. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0431>
34. Miao, X., Xi, Z., Zhang, Y., Li, Z., Huang, L., Xin, T., Shen, R., & Wang, T. (2020). Circ-SMARCA5 suppresses colorectal cancer progression via downregulating miR-39-3p and upregulating ARID4B. *Digestive and Liver Disease*, 52(12), 1494-1502. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2020.07.019>
35. Oosterhuis, J. W., & Looijenga, L. H. J. (2019). Human germ cell tumours from a developmental perspective. *Nature Reviews Cancer*, 19(9), 522-537. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0178-9>
36. Palumbo, C., Van Roozendaal, K., Gillis, A. J., Van Gorp, R. H., De Munnik, H., Wolter Oosterhuis, J., Van Zoelen, E. J., & Looijenga, L. H. (2002). Expression of the *PDGF α -receptor* 1.5 kb transcript, *OCT-4*, and *c-KIT* in human normal and malignant tissues. Implications for the early diagnosis of testicular germ cell tumours and for our understanding of regulatory mechanisms. *The Journal of Pathology*, 196(4), 467-477. <https://doi.org/10.1002/path.1064>
37. Park, M. S., Yang, A.-Y., Lee, J. E., Kim, S. K., Roe, J., Park, M.-S., Oh, M. J., An, H. J., & Kim, M.-Y. (2021). GALNT3 suppresses lung cancer by inhibiting myeloid-derived suppressor cell infiltration and angiogenesis in a TNFR and c-MET pathway-dependent manner. *Cancer Letters*, 521, 294-307. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.08.015>
38. Peng, Y., & Croce, C. M. (2016). The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 1(1), 15004. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2015.4>

39. Radmayr, C. (2017). Management of undescended testes: European Association of Urology/European Society for Paediatric Urology guidelines. *Journal of Pediatric Urology*, 13(5), 550. <https://doi.org/10.1016/j.jpurol.2017.06.012>
40. Rafaelsen, S., Johansson, S., Ræder, H., & Bjerknes, R. (2014). Long-term clinical outcome and phenotypic variability in hyperphosphatemic familial tumoral calcinosis and hyperphosphatemic hyperostosis syndrome caused by a novel GALNT3 mutation; case report and review of the literature. *BMC Genetics*, 15(1), 98. <https://doi.org/10.1186/s12863-014-0098-3>
41. Rodprasert, W., Virtanen, H. E., & Toppari, J. (2024). Cryptorchidism and puberty. *Frontiers in Endocrinology*, 15, 1347435. <https://doi.org/10.3389/fendo.2024.1347435>
42. Saito, H., Yokota, S., & Kitajima, S. (2023). Immunohistochemical analysis of the vimentin filaments in Sertoli cells is a powerful tool for the prediction of spermatogenic dysfunction. *Acta Histochemica*, 125(5), 152046. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2023.152046>
43. Sarıcı, H., Telli, O., & Arıcı, M. (2013). Bilateral testicular germ cell tumors. *Türk Üroloji Dergisi/Turkish Journal of Urology*, 39(4), 249-252. <https://doi.org/10.5152/tud.2013.062>
44. Selvi, I., Sarıkaya, S., & Başar, H. (2020). Is testicular microlithiasis a really innocent condition? Its effects on oncological outcomes of germ cell testicular cancer: An observational study. *Archivos Espanoles De Urologia*, 73(3), 215-229.
45. Sheta, R., Bachvarova, M., Macdonald, E., Gobeil, S., Vanderhyden, B., & Bachvarov, D. (2019). The polypeptide GALNT6 Displays Redundant Functions upon Suppression of its Closest Homolog GALNT3 in Mediating Aberrant O-Glycosylation, Associated with Ovarian Cancer Progression. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2264. <https://doi.org/10.3390/ijms20092264>

46. Singla, N., Bagrodia, A., Baraban, E., Fankhauser, C. D., & Ged, Y. M. A. (2025). Testicular Germ Cell Tumors: A Review. *JAMA*, 333(9), 793. <https://doi.org/10.1001/jama.2024.27122>
47. Smolarz, B., Nowak, A. Z., & Romanowicz, H. (2022). Breast Cancer—Epidemiology, Classification, Pathogenesis and Treatment (Review of Literature). *Cancers*, 14(10), 2569. <https://doi.org/10.3390/cancers14102569>
48. 'T Hoen, L. A., Bhatt, N. R., Radmayr, C., Dogan, H. S., Nijman, R. J. M., Quaedackers, J., Rawashdeh, Y. F., Silay, M. S., Tekgul, S., Stein, R., & Bogaert, G. (2021). The prognostic value of testicular microlithiasis as an incidental finding for the risk of testicular malignancy in children and the adult population: A systematic review. On behalf of the EAU pediatric urology guidelines panel. *Journal of Pediatric Urology*, 17(6), 815-831. <https://doi.org/10.1016/j.jpuro.2021.06.013>
49. Tasian, G. E., Hittelman, A. B., Kim, G. E., DiSandro, M. J., & Baskin, L. S. (2009). Age at Orchiopexy and Testis Palpability Predict Germ and Leydig Cell Loss: Clinical Predictors of Adverse Histological Features of Cryptorchidism. *Journal of Urology*, 182(2), 704-709. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2009.04.032>
50. Thorup, J., Hildorf, S., Hildorf, A. E., Baastrup, J. M., Mamsen, L. S., Andersen, C. Y., Olsen, T. E., & Cortes, D. (2024). The fate of germ cells in cryptorchid testis. *Frontiers in Endocrinology*, 14, 1305428. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1305428>
51. Vasdev, N., Moon, A., & Thorpe, A. C. (2013). Classification, epidemiology and therapies for testicular germ cell tumours. *The International Journal of Developmental Biology*, 57(2-3-4), 133-139. <https://doi.org/10.1387/ijdb.130031nv>
52. Viguera-Villaseñor, R. M., Cortés-Trujillo, L., Chávez-Saldaña, M., Vázquez, F. G., Carrasco-Daza, D., Cuevas-Alpuche, O., & Rojas-Castañeda, J. C. (2015). Analysis of POU5F1, c-Kit, PLAP, AP2γ and SALL4 in gonocytes of patients with

- cryptorchidism. *Acta Histochemica*, 117(8), 752-761.
<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2015.08.004>
53. Virtanen, H. E., Cortes, D., Rajpert-De Meyts, E., Ritzén, E. M., Nordenskjöld, A., Skakkebaek, N. E., & Toppari, J. (2007). Development and descent of the testis in relation to cryptorchidism. *Acta Paediatrica*, 96(5), 622-627.
<https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2007.00244.x>
54. Vishnoi, A., & Rani, S. (2023). miRNA Biogenesis and Regulation of Diseases: An Updated Overview. En S. Rani (Ed.), *MicroRNA Profiling* (Vol. 2595, pp. 1-12). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2823-2_1
55. Voorhoeve, P. M., Le Sage, C., Schrier, M., Gillis, A. J. M., Stoop, H., Nagel, R., Liu, Y.-P., Van Duijse, J., Drost, J., Griekspoor, A., Zlotorynski, E., Yabuta, N., De Vita, G., Nojima, H., Looijenga, L. H. J., & Agami, R. (2006). A Genetic Screen Implicates miRNA-372 and miRNA-373 As Oncogenes in Testicular Germ Cell Tumors. *Cell*, 124(6), 1169-1181. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.037>
56. Wang, Z.-Q., Bachvarova, M., Morin, C., Plante, M., Gregoire, J., Renaud, M.-C., Sebastianelli, A., & Bachvarov, D. (2014). Role of the polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 in ovarian cancer progression: Possible implications in abnormal mucin O-glycosylation. *Oncotarget*, 5(2), 544-560.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.1652>
57. Winter, C., Zengerling, F., Busch, J., Heinzlbecker, J., Pfister, D., Ruf, C., Lackner, J., Albers, P., Kliesch, S., Schmidt, S., & Bokemeyer, C. (2022). How to classify, diagnose, treat and follow-up extragonadal germ cell tumors? A systematic review of available evidence. *World Journal of Urology*, 40(12), 2863-2878.
<https://doi.org/10.1007/s00345-022-04009-z>
58. Xu, Z., Jin, H., Duan, X., Liu, H., Zhao, X., Fan, S., Wang, Y., & Yao, T. (2021). LNCRNA PSMA3-AS1 promotes cell proliferation, migration, and invasion in ovarian

cancer by activating the PI3K /Akt pathway via the MIR -378a-3p/ GALNT3 axis.

Environmental Toxicology, 36(12), 2562-2577. <https://doi.org/10.1002/tox.23370>

12. Anexos

12.1 Congresos

VIII CONGRESO AMIINSHAE **Asociación Mexicana de Investigadores de los Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad, A.C.** 

Investigación científica: coordinando esfuerzos generando oportunidades

10° ANIVERSARIO

Otorga la siguiente Constancia a:

Itandehui Martínez Rodríguez, Rosa María Vigueras Villaseñor, Julio César Rojas Castañeda, Itzel Jatziri Contreras García, María Elizabeth Álvarez Sánchez, Elisa Azuara Liceaga, Isidro Xavier Pérez Añorve, Jair Isidoro Bracho Gallardo, Daniel Adrian Landero Huerta.

Por su participación con el trabajo: *Determinación de la expresión relativa de los transcritos GALNT3 y KPNA6 y de sus productos proteínicos en el tumor testicular de células germinales*, en el VIII Congreso AMIINSHAE llevado a cabo en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez los días 21 y 22 de noviembre.


Dra. Mayra Chávez Courtois

AMIINSHAE
Presidencia Colegiada AMIINSHAE, A.C.


M. en C. Gerardo Barragán Mejía


Dra. Concepción Nava Ruíz

Comité Organizador VIII Congreso AMIINSHAE, A.C.


Dra. Petra Escas Gómez

CDMX, NOVIEMBRE 2024.



Salud
Secretaría de Salud



El Instituto Nacional de Pediatría

Otorga la presente

CONSTANCIA

A

Martínez Rodríguez Itandehui, Viguera Villaseñor Rosa María, Rojas Castañeda Julio César, Contreras García Itzel Jatziri, Álvarez Sánchez María Elizabeth, Azuara Liceaga Elisa, Pérez Añorve Isidro Xavier, Díaz Chávez José, Pérez Navarro Yussel Fernando, Bracho Gallardo Jair Isidoro, Medina Granados Pedro, Cervantes Arias Edgar Daniel, Landero Huerta Daniel Adrián

Por la presentación del trabajo:

Efecto de la expresión del hsa-miR-372 sobre GALNT3/GALNT3 en el tumor testicular de células germinales

Durante el "VIII Foro Estudiantil de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría"

que se llevó a cabo de manera presencial

9,10,11 y 13 de junio de 2025, en el

Instituto Nacional de Pediatría, Ciudad de México.

Dra. Martha Patricia Márquez Aguirre
Encargada de la Dirección de Enseñanza

Dra. Alejandra Aquino Andrade
Coordinadora General

EMCC 017- 2025



LA ACADEMIA DE INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN (AIBIR)

OTORGA EL PRESENTE RECONOCIMIENTO

Martínez Rodríguez I, Viguera Villaseñor RM, Rojas Castañeda JC, Contreras García IJ, Álvarez Sánchez ME, Azuara Liceaga E, Pérez Añorve IX, Díaz Chávez J, Pérez Navarro YF, Bracho Gallardo JI, Medina Granados P, Cervantes Arias ED, Landero Huerta DA

A: _____

Por la presentación del cartel titulado

“DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL hsa-miR-372 SOBRE LA INHIBICIÓN DE GALNT3/GALNT3 EN EL TUMOR TESTICULAR DE CÉLULAS GERMINALES”

en la 50ava reunión anual

llevada a cabo en Tlaxcala, Tlax., del 5 al 8 de agosto 2025

Dra. Lucía Alba Martínez Mota Presidenta

Dra. Estela Cuevas Romero Secretaria



12.2. Actividades de retribución social





SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



EL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

OTORGA LA PRESENTE

CONSTANCIA

A

*Osnaya Brizuela Norma, Bustamante Nieves Pablo Edson,
Martínez Rodríguez Itandehui,
Carmona Royo Fernanda, Belmont Monroy Laura,
Contreras García Itzel Jatziri*

Por la presentación del Taller:

Científico por un Día en el Laboratorio para Niños

que se llevó a cabo de manera presencial
del 11 al 13 de noviembre del 2024, en el
Instituto Nacional de Pediatría, CDMX.

Con una duración de 16 horas.

Dra. Cecilia Eugenia López Andrade
Jefa de Educación Médica Continua

Dra. Karla Berenice Sánchez Huerta
Coordinadora General

EMCC 023-2024



12.3. Asistencia a simposios.

