



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA.

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO.

HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO O.D.

SECRETARÍA DE SALUD.

**“ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS ANTÍGENOS TESTICULARES DE
CÁNCER MAGE-A3, MAGE-A4, SSX-1 Y PRAME, EN SANGRE
PERIFÉRICA DE PACIENTES CON TUMOR DE TESTÍCULO”**

TESIS DE POSGRADO.

*PARA OBTENER EL TÍTULO DE LA ESPECIALIDAD EN:
UROLOGÍA*

PRESENTA

DR. JOSÉ FERNANDO GIL GARCÍA

TUTOR:

**DR. HUGO ARTURO MANZANILLA GARCÍA.
DR. ADOLFO MARTÍNEZ TOVAR.**





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DR. HUGO ARTURO MANZANILLA GARCÍA
**PROFESOR TITULAR DEL CURSO UNIVERSITARIO DE
ESPECIALIZACIÓN EN UROLOGÍA**

DR. HUGO ARTURO MANZANILLA GARCÍA
ASESOR DE TESIS

DR ADOLFO MARTÍNEZ TOVAR
ASESOR DE TESIS

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

A DIOS; por darme la vida, el don y las fuerzas para seguir en este camino lleno de esperanza y amor.

A mis Padres; Por el apoyo incondicional con el que siempre me han dado.

A mi esposa; por creer en mí y darme el amor que llena de esperanza este camino que estamos dispuestos a atravesar juntos.

Amigos y Familiares

A todos ustedes por ser parte de mi inspiración, todos y cada uno están siempre en mi corazón.

TITULO:

***“ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE
LOS ANTÍGENOS TESTICULARES
DE CÁNCER MAGE-A3, MAGE-A4,
SSX-1 Y PRAME, EN SANGRE
PERIFÉRICA DE PACIENTES CON
TUMOR DE TESTÍCULO”***

ÍNDICE

Título	4
Marco teórico	6
Planteamiento del problema	24
Justificación	24
Hipótesis	24
Objetivos	25
Metodología	25
Análisis estadístico	25
Resultados	32
Discusión	44
Conclusión	47
Anexo 1	48
Bibliografía	50

MARCO TEÓRICO

EMBRIOLOGIA

EMBRIOLOGIA Y DESARROLLO GONADAL

El sexo genético o cromosómico es el que determina que la gónada indiferenciada que se convierta en ovario en la mujer y testículo en el hombre. El desarrollo de los órganos genitales externos durante la época embrionaria se produce en dos etapas: la etapa indiferenciada idéntica para ambos sexos, y la etapa diferenciada, que es distinta según el sexo cromosómico del individuo. La aparición del testículo depende básicamente del cromosoma y, que induce la diferenciación de la gónada indiferente a testículo y, si está ausente, a ovario.

El sistema genital indiferenciado contiene las estructuras necesarias para desarrollar cualquier sexo. Las gónadas son sexualmente indiferenciadas y tienen componentes masculinos y femeninos; la diferenciación hacia un sexo concreto conlleva el predominio gradual de un componente y la desaparición del otro. Las principales estructuras de este sistema genital indiferenciado son los conductos de Wolff y de Müller y el seno urogenital. Alguna de ellas es compartida con el sistema urinario también en desarrollo. La gónada indiferenciada aparece hacia la quinta o sexta semana de desarrollo embrionario. Una vez determinada la presencia de ovario o testículo (lo que se conoce como sexo gonadal) serán estos los que condicionen el posterior desarrollo de las características sexuales del individuo. La transformación a sistema genital diferenciado se realiza durante la séptima semana del embarazo, la gónada empieza asumir características de testículo u ovario, según el feto posea cromosomas XY (sexo masculino) o XX (sexo femenino). Si evoluciona hacia el testículo, la gónada aumenta de tamaño a medida que alcanza una localización más baja, Para que se produzca el desarrollo de las características masculinas, es necesaria la presencia del testículo y de la acción de sus hormonas. Los testículos abandonan posteriormente la cavidad abdominal alrededor del octavo mes y descienden en dirección al escroto. Si la gónada empieza a transformarse en un testículo, los conductos de Wolff, a través de la acción de las hormonas secretadas por el testículo fetal, comienzan a diferenciarse en el sistema masculino de conductos formando el epidídimo, los vasos deferentes, las vesículas y los conductos eyaculadores. A su vez, los conductos de Müller empiezan a desaparecer.

El parénquima testicular se encuentra formado por túbulos seminíferos, los cuales tienen células de sostén llamadas células de Sertoli localizadas en la membrana basal y proporcionando sostén a las células germinales, que son células germinales madre, primitivas de división lenta, espermatogonias de proliferación rápida, espermatidez y espermatozoides.

Las células de Sertoli mantienen contacto físico con los espermatozoides, permiten la fagocitosis y producción y secreción de líquidos como la proteína transportadora de andrógenos, proporcionando un reservorio de hormonas androgénicas (dehidrotestosterona, testosterona, androtenodiona y 17 beta estradiol) y su función principal es regular la hormona folículo estimulante (FSH) y Testosterona. Las células de Sertoli proporcionan una barrera

hematotesticular formada por células endoteliales y células miodes peritubulares, desarrollándose al comienzo de la espermatogénesis.

El epitelio germinal está formado por 13 tipos distintos de células germinales y en especial por la espermatogonia que produce división meiótica produciendo espermatozoides y originando 123×10^6 espermatozoides al día.

En cuanto a la regulación hormonal, los niveles de testosterona son 100 veces mayores que en la circulación periférica lo cual permitirá el inicio y el mantenimiento de la espermatogénesis. [24]

En estudios recientes y escasos se ha mencionado que las células testiculares en las primeras fases de la espermatogénesis, principalmente en espermatogonias y espermatocitos primarios mantienen una expresión molecular de los genes *MAGE*, siendo analizados intencionadamente, ya que estos son antígenos asociados a tumor y que se expresan de forma normal en células testiculares, ovario y placenta, llamados antígenos testiculares de cáncer. [18]

CÁNCER DE TESTÍCULO:

El Cáncer de Testículo representa entre el 1% y el 1.5% de las neoplasias en el Hombre y el 5% de los tumores Urológicos en general, con aparición de 3-6 casos nuevos por 100 000 hombres al año; es el tumor sólido más común de los hombres de 15 a 35 años de edad; en USA en el 2008 se detectaron 8 090 casos nuevos en cáncer de testículo falleciendo 380 hombres. [1]

En México, el cáncer se ha convertido en un problema de salud pública, con 110 mil casos nuevos registrados por año; los tumores malignos ocupan el tercer lugar de las principales causas de muerte en el país, en el grupo de hombres de 25 a 35 años de edad, la leucemia (18.7%) y el tumor maligno de testículo (13.3%) ocasionan 32 de cada 100 decesos INEGI. [2]

El cáncer de testículo es poco más frecuente del lado derecho que el izquierdo y el 1%-2% de los casos son bilaterales en el momento del diagnóstico, el tipo histológico varía, predominando en un 90 a 95% los tumores de células germinales, con la incidencia máxima en el tercer decenio de la vida en el caso de los tumores no seminomatosos y la cuarta década de la vida en tumores seminomatosos. [1-3]

EPIDEMIOLOGIA Y ETIOLOGÍA:

El cáncer de testículo se presenta frecuente en gente de raza blanca y el grupo de edad más afectado es de 20-40 años con tumores de células germinales, no seminomatosos principalmente el teratoma, más común en el tercer decenio de la vida. Los seminomatosos son más frecuentes en el cuarto decenio de la vida. En menores de 10 años el más común es el tumor del saco vitelino de Yolk; en hombres mayores de 60 años predominan los linfomatosos. [4]

En algunos pacientes se describen alteraciones genéticas en cualquier tipo histológico de tumores de células germinales, describiendo un marcador genético específico en el isocromosoma del brazo corto del cromosoma 12 (12p) [5], en las neoplasias testiculares intraepiteliales (TIN), se presentan las mismas alteraciones cromosómicas detectando alteraciones en el gen p53, siendo probable una disgregación pluripotencial de las células germinativas fetales identificado por marcadores específicos como M2A, C-KIT, OCT4/NANOG, que son responsables de las TIN y neoplasias de células germinativas; en la progresión a seminoma y carcinoma embrionario existe superposición de expresión en el genoma y detección del RNAm de alfafetoproteína (AFP) en seminoma atípico. [6,7]

En relación a los factores de riesgo asociados son criptorquidia, destacan el desarrollo de cáncer testicular en un 5 a 10%, síndrome de Klinefelter, antecedentes de familiares con tumores testiculares (padre, hermanos), infertilidad, virus de inmunodeficiencia humana, TIN, administración exógena de estrógenos en madres embarazadas, aumentando la incidencia de tumores de testículo hasta 5%, traumatismo y atrofia testicular, sin embargo hasta el momento se ha podido demostrar ninguna relación causa efectos clara.[1,3]

El cáncer de testículo presenta excelentes resultados de curación, los principales factores que contribuyen a esto son la estratificación minuciosa en el momento del diagnóstico, tratamiento precoz adecuado a base de combinaciones quimioterapéuticas con o sin radioterapia y cirugía, así como seguimiento estricto del paciente.[1-3]

Los tumores testiculares de células germinales representan un grupo heterogéneo de neoplasias de histología compleja, que derivan de la célula germinal primordial, esta multipotencialidad puede dar origen a diversas neoplasias según la etapa de diferenciación en que se produzca la transformación maligna. Dado su origen común, estos pueden presentar dos o más patrones histológicos y representan el 95% de los tumores malignos de testículo. [2,3]

La mayoría de los tumores de células germinales inician en el testículo, ocasionalmente surgen de forma primaria en retro peritoneo, mediastino y muy rara vez en la glándula pineal, los llamados (tumores germinales extra gonadales). En general se dividen de acuerdo al tipo de célula que les da origen, en seminomatosos (40-70%), no seminomatosos (15-20%); como él (carcinoma de células embrionarias), teratoma (5-10%) y coriocarcinoma con menos del 1%, estos presentan un crecimiento más rápido y tendencia a dar metástasis, el teratoma se diferencia de los otros tipos por su baja sensibilidad a la quimioterapia. [2]

Los tumores de células no germinales o del estroma tienen su origen en las células de Leydig y Sertoli y generalmente son benignos. [1]

Los tumores testiculares se diseminan por vía linfática y hematogena, la mayoría sigue la cadena linfática contigua a los vasos espermáticos, típicamente el primer relevo ganglionar de metástasis de lado izquierdo se localiza en la región peri y para aortica y del lado derecho en la región

interaortocava, no es común que cruce la región contralateral, pero sucede generalmente de derecha a izquierda. Con los tratamientos actuales, alrededor del 95% de los pacientes con cáncer testicular tienen sobrevida a 5 años, sin embargo su pronóstico depende del grado de extensión o estratificación del tumor, por lo que la detección y tratamiento oportuno son de suma importancia.

CLASIFICACIÓN ANATOMOPATOLÓGICA

La clasificación anatomopatológica se demuestra a continuación [8].

1. Tumores de células germinales

- Neoplasia intratubular de células germinales
- Seminoma (incluidos los casos con células sincitiotrofoblásticas)
- Seminoma espermatocítico (mencionar en caso de existir un componente sarcomatoso)
- Carcinoma embrionario
- Tumor del saco vitelino
- Coriocarcinoma
- Teratoma (maduro, inmaduro, con componente maligno)
- Tumores con más de un tipo histológico (especificar el porcentaje de componentes individuales).

2. Tumores de los cordones sexuales/estroma gonadal

- Tumor de células de Leydig
- Tumor maligno de células de Leydig
- Tumor de células de Sertoli
 - variante rica en lípidos
 - esclerosante
 - de células grandes calcificantes
- Tumor maligno de células de Sertoli
- Tumor de células de la granulosa
 - tipo adulto
 - tipo juvenil
- Grupo de tumores del tecoma/fibroma
- Otros tumores de los cordones sexuales/estroma gonadal
 - incompletamente diferenciado
 - mixto
- Tumores que contienen células germinativas y cordones sexuales/estroma gonadal (gonadoblastoma).

3. Tumores diversos del estroma inespecífico

Tumores epiteliales del ovario.
Tumores de los conductos colectores y la red de Haller.
Tumores (benignos y malignos) del estroma inespecífico.

DIAGNÓSTICO:

El cáncer de testículo afecta a hombres jóvenes entre el tercer y cuarto decenio de la vida, la forma de presentación más frecuente es como una masa escrotal indolora, sensación de ocupación o peso en bolsa escrotal y en un 10-20% dolor en lado afectado, asimetría escrotal o testicular, puede existir un hidrocele reactivo; el traumatismo en el escroto revela la presencia de un tumor testicular, en un 7% aparece ginecomastia o dolor en región dorso lumbar 11%, El retraso en el diagnóstico de la masa es frecuente, siendo la demora media de 3-6 meses, esto se debe a un mecanismo de negación por el paciente(1-4).

La exploración física debe incluir un examen físico completo para determinar las características de la tumoración en el testículo, búsqueda de metástasis a distancia (ganglios supraclaviculares, masa intra abdominal) ginecomastia. En cada caso se explora los constituyentes de la bolsa escrotal, como el escroto, testículo, epidídimo y cordón espermático. [9]

Estudio por imagen del testículo en la actualidad, la ecografía diagnostica sirve para confirmar la presencia de una masa testicular y para explorar el testículo contralateral. Su sensibilidad en la detección de un tumor testicular es prácticamente del 100% y desempeña una función importante a la hora de determinar si la masa es intra o extra testicular [10]. La ecografía es una prueba económica, pero resulta innecesaria cuando la presencia de un tumor testicular es clínicamente evidente. Se debe realizar una ecografía testicular en los varones jóvenes sin tumor testicular palpable pero si con masas viscerales o retroperitoneales o una concentración sérica elevada de hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) o AFP. La ecografía se recomienda para vigilar el testículo contralateral en el seguimiento de los pacientes con riesgo (9). La resonancia magnética (RM) ofrece una mayor sensibilidad y especificidad que la ecografía para diagnosticar tumores y puede diferenciar tumores seminomatosos de no seminomatosos; ofrece una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 95%-100%, pero su costo elevado no justifica su uso con fines diagnósticos. [11,10]

MARCADORES TUMORALES:

Los marcadores tumorales séricos en el momento del diagnóstico son factores pronósticos y contribuyen al diagnóstico y la estadificación. La Alfa-feto proteína (AFP) producida por las células del saco vitelino, Fracción beta de gonadotropina coriónica (β -hCG) expresión de los trofoblastos y Deshidrogenasa Láctica (DHL) (12, 9). En general, se observa un incremento de estos marcadores en el 51% de los casos de cáncer de testículo. La AFP aumenta en un 50%-70% de los pacientes con tumores de células germinativas no seminomatosos (TCGNS) y se observa un incremento de la β -hCG en el 40%-60% de los pacientes con TCGNS. Alrededor del 90% de los tumores no seminomatosos cursan con elevación de uno o ambos marcadores. Hasta el 30% de los seminomas debutan o presentan una concentración elevada de β -hCG durante la evolución de la enfermedad [1,14-15]. La LDH es un marcador menos específico y su concentración es proporcional al volumen tumoral. Puede estar elevada en el 80% de los pacientes con cáncer de

testículo avanzado (5). Hay que señalar que las concentraciones negativas de marcadores no descartan el diagnóstico de un tumor de células germinales. Otro marcador estudiado es la fosfatasa alcalina placentaria (FAP), que podría resultar útil para vigilar a los pacientes con seminoma puro. En algunos centros se dispone de marcadores citogenéticos y moleculares, aunque actualmente solo se emplean en estudios de investigación. La determinación de las concentraciones séricas de AFP, β -hCG y LDH (en tumores avanzados) es obligatoria, mientras que la de FAP es opcional. [1]

ALFA-FETOPROTEINA: (AFP)

Es una glicoproteína de peso molecular 70.000 Dalton, demostrada por primera vez en el plasma fetal normal de Bergstrand en 1954, producida por el saco vitelino, hígado y aparato digestivo. La concentración más elevada se encuentra entre la 12 y 14 semana de gestación, disminuyendo posterior al nacimiento, al año solo se encuentra en concentraciones bajas menores a 40ng/ml. Puede detectarse en neoplasias como testículo, hígado, páncreas, estomago, pulmón, ataxia-telangiectasia y en tirosinemia. La AFP puede producirse por el carcinoma embrionario puro, teratocarcinoma, tumores del saco vitelino o por tumores combinados, no aparece en coriocarcinoma puro o en seminoma puro; la semivida de este marcador es de 5-7 días por lo que puede utilizarse para observar la respuesta a tratamiento [1-3]. Valores normales 0 a 10 ng/ml. [3-4]

GONADOTROPINA CORIÓNICA HUMANA FRACCIÓN B: (B-HCG)

Es una glicoproteína de peso molecular 38.000 Daltons, constituida por dos cadenas poli peptídicas: alfa y beta, se produce en condiciones normales por el tejido trofoblástico; las hormonas hipofisarias FSH, LH y Tirotropina poseen una subunidad alfa, la subunidad beta posee aspectos estructurales y antigénicos diferentes a las alfa, permitiendo la producción de anticuerpos específicos contra la subunidad purificada la HCB que se emplea en las técnicas de radio inmunología. La HCG es secretada por la placenta en la gestación, y en 1930 se demostró que la HCG era detectable en tumor de células germinales demostrando que las células sincitiotrofoblásticas son responsables de la producción de HCG. La semivida plasmática es de 24-36hrs, pero las subunidades aisladas se eliminan con más rapidez 45 minutos. Está presente en pacientes con coriocarcinoma y en un 40-60% en carcinoma embrionario, un 5-10% de los pacientes con Seminoma Puro tienen una concentración detectable de HCG (menos de 500ng/ml) producida por las células sincitiotrofoblásticas presentes en algunos seminomas [1-3]. Valores normales <5 mIU/mL. [4]

DESHIDROGENASA LÁCTICA:

Son enzimas celulares de 134.000Daltons con una concentración especialmente elevada en el musculo liso, cardiaco y esquelético, en el Hígado, Riñón y Cerebro. Se ha descrito que la elevación de la concentración plasmática de DHL es un elemento destacado en el tratamiento de los tumores germinales, Se trata de un marcador de volumen tumoral que aparece elevado

en el 70% de los pacientes con un seminoma. En los pacientes con enfermedad metastásica se recomienda determinar cómo marcador de destrucción tisular. [1-3]

Los marcadores tumorales son los más útiles en el manejo de los tumores de testículo ya que son los que se encuentran elevados con mayor frecuencia, pueden ser positivos hasta en el 90% de los casos si se miden en forma simultánea, deben determinarse antes del tratamiento quirúrgico para poder efectuar una vigilancia, la elevación mantenida de los marcadores después de la orquiectomía radical inguinal sugiere la persistencia de células tumorales.

La utilidad diagnóstica de los marcadores orientan sobre la naturaleza histológica del tumor, como la AFP hacia un tumor no seminomatoso, una normalización de la β -hCG tras la orquiectomía radical es un elemento indicativo de un seminoma puro si el histopatológica se confirma. La utilidad Pronostica de los marcadores se observa al presentarse una elevación intensa de los marcadores sugerente de una masa tumoral voluminosa o metastásica, así como la persistencia de elevación de los marcadores tumores posterior a orquiectomía radical, resultando un buen pronóstico o mal pronóstico. La evaluación de la respuesta terapéutica después de un tratamiento eficaz, los marcadores deben ser negativos, algo que debe mantenerse a lo largo de la vigilancia. [9]

El estadio clásico y valor pronóstico en las cifras del marcador están en relación directa con la carga tumoral, de manera que las cifras elevadas hacen pensar en estadios avanzados y presencia de metástasis, de la misma manera se ha comprobado que la coexistencia de marcador elevado y múltiples masas adenopatías en la tomografía suponen un mal pronóstico y escasa respuesta a regímenes de tratamiento con quimioterapia.

Monitorización de la respuesta terapéutica y seguimiento: La velocidad de normalización de la cifra del marcador tras el tratamiento es considerado por muchos como un factor pronóstico ya que dicha velocidad está en relación directa con la carga tumoral previa y con la viabilidad del tumor. Cuanto más rápida sea la disminución mayor posibilidad de que el paciente se encuentre libre de enfermedad. La persistencia de un marcador elevado tras el tratamiento implica respuesta incompleta. De la misma manera la recidiva bioquímica o elevación de los marcadores puede preceder a la recidiva clínica o radiológica con lo que se puede instaurar el tratamiento antes de que la recidiva sea sintomática, cuando la carga tumoral es mínima. [3]

Todo paciente con una masa testicular debe someterse a una exploración inguinal con exteriorización del testículo dentro de sus tunicas si se detecta tumor testicular se realizará orquiectomía radical; la orquiectomía radical es considerada el tratamiento primario para la mayoría de los pacientes que presenten una masa testicular sospechosa, se debe realizar orquiectomía radical con ligadura alta y corte del cordón espermático a nivel del anillo inguinal interno. El estudio histopatológico del testículo es necesario para confirmar el diagnóstico y definir la extensión local del tumor; en caso de enfermedad diseminada y metástasis se realiza quimioterapia inicial de modo

que puede retrasarse la orquiectomía radical hasta la estabilización clínica. Puede considerarse efectuar biopsia inguinal si existe la sospecha de alguna anomalía intratesticular como masa hipo ecoica, heterogénea y micro calcificaciones.

EXAMEN ANATOMOPATOLOGICO: [1]

- Características macroscópicas: lado, tamaño máximo del tumor y características macroscópicas del epidídimo, cordón espermático y túnica vaginal.

- Obtención de muestras: corte de 1cm” por cada centímetro de diámetro del tumor, incluido el parénquima, la albugínea y el epidídimo con selección de zonas sospechosas.

- Características microscópicas y diagnóstico: tipo histológico según los criterios de la clasificación de la OMS: presencia o ausencia de invasión venosa o linfática peri tumoral, presencia o ausencia de invasión albugínea, túnica vaginal, red de haller, epidídimo o cordón espermático, presencia o ausencia de neoplasia intratubular de células germinativas en parénquima tumoral

- Categoría pT según la clasificación de TNM
- Estudios Inmunohistoquímicos.

ESTADIFICACIÓN:

Ha de evaluarse la cinética de la vida media de los marcadores tumorales séricos por inmunohistoquímica, ganglios y descartar la presencia de metástasis viscerales: (Tabla 1-3)

- Cinética de la semivida de los marcadores tumorales séricos después de la orquiectomía.
- Ganglios retroperitoneales, supraclaviculares y el hígado
- Presencia y ausencia de afectación ganglionar mediastínica y pulmonar.
- Metástasis en cerebro y hueso.

Pruebas diagnósticas:

- Muestras sanguíneas.
- Radiografía de tórax.
- Tomografía computarizada abdominopelvica y torácica.
- Ecografía abdominal y retroperitoneal.
- Resonancia magnética.
- Tomografía por emisión de positrones. (PET)

Los marcadores tumorales séricos AFP y β -hCG (5-7 y 2-3 días respectivamente), deben reevaluarse después de la orquiectomía radical para determinar la cinética de la semivida, ha de evaluarse el descenso de los marcadores en los pacientes con enfermedad en estadio clínico I hasta que se

haya producido normalización, (Clasificación de Riesgo del International Germ Cell Collaborative Group IGCCCG); la elevación persistente de los marcadores tumorales séricos puede indicar la presencia de metástasis, mientras que la normalización de los valores no descarta la presencia de metástasis tumorales; durante la quimioterapia deberían disminuir los valores de los marcadores ya que su persistencia revela un valor pronostico adverso, (tabla 2). [2]

TUMOR NÓDULO METASTASIS (TNM):

pT- Tumor primario		
El grado de tumor primario, usualmente se clasifica después de la orquidectomía radical, por lo que se asigna un estadio patológico.		
	pTX	Tumor primario no puede ser evaluado
	pT0	Sin evidencia de tumor primario (por ejemplo una cicatriz histológica en el testículo)
	pTis	Neoplasia intratubular de células germinales (carcinoma in situ)
	pT1	Tumor limitado a testículo y epidídimo sin invasión vascular/linfática; el tumor puede invadir la túnica albugínea pero no la túnica vaginal
	pT2	Tumor limitado a testículo y epidídimo con invasión vascular/linfática, ó tumor que se extiende a través de la túnica albugínea con compromiso de túnica vaginal
	pT3	Tumor que invade el cordón espermático con o sin invasión vascular/ linfática
	pT4	Tumor que invade el escroto con o sin invasión vascular/ linfática
N – Nódulos linfáticos regionales		
	NX	Ganglios linfáticos regionales no evaluables
	N0	No existe metástasis ganglionar linfática regional
	N1	Metástasis con masa en ganglio linfático de 2 cm ó menos, en su dimensión mayor; ó ganglios linfáticos múltiples, ninguno mayor 2 cm, en su dimensión mayor
	N2	Metástasis con masa en ganglio linfático mayor a 2 cm, pero no de más de 5 cm en su dimensión mayor; ó ganglios linfáticos múltiples, cada uno con masa mayor a 2 cm, pero no más de 5 cm en su dimensión mayor
	N3	Metástasis con masa en ganglio linfático mayor a 5 cm, en su dimensión mayor
Patológica		
	pNX	Ganglios linfáticos regionales no evaluables
	pN0	Sin metástasis a ganglios linfáticos regionales
	pN1	Metástasis con masa en ganglio linfático de 2 cm ó menos, en su dimensión mayor y 5 nódulos positivos ó menos, ninguno mayor de 2 cm en su dimensión mayor
	pN2	Metástasis con masa en ganglio linfático mayor de 2 cm pero no mayor a 5 cm en su dimensión mayor ó mas de 5 nódulos positivos, ninguno mayor de 5 cm; ó evidencia de extensión del tumor extra linfática
	pN3	Metástasis con masa en ganglio linfático mayor a 5 cm en su dimensión mayor
M – Metástasis a distancia		
	MX	Metástasis distante no puede ser evaluada
	M0	No hay metástasis distante
	M1	Metástasis a distancia M1a Metástasis a ganglio(s) linfático(s) no regional(es) o pulmonar M1b Metástasis a distancia diferente a ganglios linfáticos no regionales y pulmón

Fuente: NCCN. Guías de Práctica Oncológica: Cáncer de Testículo, 2009

Fuente original: American Joint Committee on Cancer: (AJCC), 2002

Tabla 1: Estadificación del Cáncer de Testículo

SX	Estudio de marcadores no disponible o no realizado	
S0	Estudio de marcadores con límites dentro de lo normal	
S 1	DHL (U/l) HGC (mlu/mL) AFP (ng/ml)	< 1.5 x N y < 500 y < 1000
S 2	DHL (U/l) HGC (mlu/mL) AFP (ng/ml)	1.5 – 10 x N ó 5000 a 50, 000 ó 1000 a 10, 000
S 3	DHL (U/l) HGC (mlu/mL) AFP (ng/ml)	> 10 x N ó > 50, 000 ó > a 10, 000
N indica el límite normal alto de la DHL		

Tabla 2: Marcadores tumorales serológicos.

Grupos de etapas				
Etapa 0	pTis	N0	M0	S0
Etapa I	pT 1-4	N0	M0	SX
Etapa I A	pT 1	N0	M0	S0
Etapa I B	pT 2	N0	M0	S0
	pT 3	N0	M0	S0
	pT 4	N0	M0	S0
Etapa I S	Cualquier pT/TX	N0	M0	S1-3
Etapa II	Cualquier pT/TX	N1-3	M0	SX
Etapa II A	Cualquier pT/TX	N1	M0	S0
	Cualquier pT/TX	N1	M0	S1
Etapa II B	Cualquier pT/TX	N2	M0	S0
	Cualquier pT/TX	N2	M0	S1
Etapa II C	Cualquier pT/TX	N3	M0	S0
	Cualquier pT/TX	N3	M0	S1
Etapa III	Cualquier pT/TX	Cualquier N	M1	SX
Etapa III A	Cualquier pT/TX	Cualquier N	M1a	S0
	Cualquier pT/TX	Cualquier N	M1a	S1
Etapa III B	Cualquier pT/TX	N 1-3	M0	S2
	Cualquier pT/TX	Cualquier N	M1a	S2
Etapa III C	Cualquier pT/TX	N 1-3	M0	S3
	Cualquier pT/TX	Cualquier N	M1a	S3
	Cualquier pT/TX	Cualquier N	M1b	Cualquier S

Fuente: NCCN. Guías de Práctica Oncológica: Cáncer de Testículo, 2009

Tabla 3: Etapas Clínicas.

ESTATIFICACIÓN Y CLASIFICACIONES PRONOSTICAS:

- Determinación de la extensión anatómica de la enfermedad.
- Evaluación de marcadores tumorales séricos, incluidos los valores de β -hCG, AFP y LDH tras la orquiectomía. (categoría S, Tabla 2).
- Definición y tamaño de ganglios regionales.

Sistema de estratificación basado en el pronóstico del cáncer metastásico de células germinales. (*International Germ Cell Cancer Collaborative Group*).

SSP = supervivencia sin progresión; AFP = alfafetoproteína; β -hCG = gonadotropina coriónica humana; LDH = lactato deshidrogenasa.

<p>Grupo de buen pronóstico</p> <p><i>No seminomatoso (56% de los casos)</i> SSP a los 5 años del 89% Supervivencia a los 5 años del 92%</p>	<p><i>Todos los criterios siguientes:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Primario de testículo/retroperitoneal • Ausencia de metástasis viscerales extra pulmonares • AFP < 1.000 ng/ml • β-hCG < 5.000 UI/l (1.000 ng/ml) • LDH < 1,5 veces el LSN
<p><i>Seminoma (90 % de los casos)</i> SSP a los 5 años del 82 % Supervivencia a los 5 años del 86 %</p>	<p><i>Todos los criterios siguientes:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Cualquier localización primaria • Ausencia de metástasis viscerales extra pulmonares • AFP normal • Cualquier β-hCG • Cualquier LDH
<p>Grupo de pronóstico intermedio</p> <p><i>No seminomatoso (28 % de los casos)</i> SSP a los 5 años del 75 % Supervivencia a los 5 años del 80 %</p>	<p><i>Todos los criterios siguientes:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Primario de testículo/retroperitoneal • Ausencia de metástasis viscerales extra pulmonares • AFP > 1.000 y < 10.000 ng/ml o • hCG > 5.000 y < 50.000 UI/l o • LDH > 1,5 y < 10 veces el LSN
<p><i>Seminoma (10 % de los casos)</i> SSP a los 5 años del 67 % Supervivencia a los 5 años del 72 %</p>	<p><i>Cualquiera de los criterios siguientes:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Cualquier localización primaria • Metástasis viscerales extra pulmonares • AFP normal • Cualquier β-hCG • Cualquier LDH
<p>Grupo de mal pronóstico</p> <p><i>No seminomatoso (16 % de los casos)</i> SSP a los 5 años del 41 % Supervivencia a los 5 años del 48 %</p>	<p><i>Cualquiera de los criterios siguientes:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Primario mediastínico • Metástasis viscerales extra pulmonares • AFP > 10.000 ng/ml o • β-hCG > 50.000 UI/l (10.000 ng/ml) • LDH > 10 veces el LSN
<p><i>Seminoma</i> Ningún paciente clasificado como de mal pronóstico</p>	

Se puede ofrecer la vigilancia como una alternativa de manejo primario a pacientes con cáncer de testículo no seminomatoso etapa clínica I, de bajo riesgo en caso de recurrencia es susceptible de rescate con quimioterapia. Se ha demostrado que la aplicación de 2 ciclos de quimioterapia con BEP (Bleomicina, Etopósido y Cisplatino), en pacientes con Cáncer de Testículo no seminomatoso en etapa clínica I con riesgo alto (invasión linfovascular y que tienen 50% de probabilidad de recaída) la tasa de recurrencia es de 2.7% sin afectación de la fertilidad ni la actividad sexual.

La linfadenectomía retroperitoneal (LRP) en pacientes con Cáncer de Testículo no seminomatoso en etapa clínica I se encuentra 30% de metástasis ganglionar retroperitoneal. [1,14]

FACTORES DE RIESGO PRONOSTICOS

En relación con el seminoma en estadio I, en un análisis multifactorial se ha identificado el tamaño del tumor (> 4 cm) y la invasión de la red de Haller como los factores predictivos más importantes de recidivas.

En cuanto a los tumores no seminomatosos en estadio I, la invasión vascular de vasos sanguíneos o linfáticos por el tumor primario es el factor predictivo más importante de metástasis ocultas. La tasa de proliferación, así como el porcentaje de carcinoma embrionario, son otros factores predictivos que mejoran el valor predictivo positivo y negativo de la invasión vascular. [1]

	Seminoma	No Seminoma
Tipo Histopatológico	<ul style="list-style-type: none"> • Tamaño del Tumor >4cm • Invasión a la red de Haller 	<ul style="list-style-type: none"> • Invasión vascular/Linfática intra o peritumoral • Tasa de Proliferación >70% • Porcentaje de carcinoma embrionario >50%

Clínicos (en relación con la enfermedad metastásica)

- Localización primaria.
 - Elevación de la concentración de marcadores tumorales
 - Presencia de Metástasis viscerales extra pulmonares.
-

TRATAMIENTO.

Todo paciente con una posible masa testicular debe someterse a una exploración inguinal con exteriorización del testículo dentro de sus tunicas. Si se detecta un tumor, ha de practicarse una orquiectomía radical inmediata con sección del cordón espermático a la altura del anillo inguinal interno. Cuando el

diagnóstico no está claro, se obtiene una biopsia testicular para efectuar un examen histológico de cortes congelados.

En caso de enfermedad diseminada y metástasis potencialmente mortales, la práctica actual consiste en empezar con quimioterapia inicial, de modo que puede retrasarse la orquiectomía radical hasta que se haya logrado la estabilización clínica.

ANTIGENOS TESTICULARES DE CANCER (ATC)

Los antígenos testiculares de cáncer son un grupo de proteínas que están expresados de manera normal, únicamente en tejido testicular, placenta y ovario, son una amplia familia de antígenos asociados a la expresión de tumores de diverso origen histológico. Los ATC poseen un patrón de expresión tumoral e inmunogenicidad; están presentes también en algunos tumores sólidos, se han considerado antígenos estrictamente específicos de tumor y su principal ventaja es que son reconocidos por los LT CD8, los cuales desencadenan una respuesta inmune contra ellos. [16,21]

Los genes de los ATC fueron identificados por diversas técnicas experimentales las cuales incluyen el SEREX (clonación Serológica de Expresión), análisis de expresión de mRNA y clonación de los epitopes de los LT CD8. El término de ATC fue acuñado por Old y Chen en 1997, hasta ahora 70 familias de ATC con más de 140 miembros han sido identificadas en la base de datos del Instituto Ludwig para la investigación del cáncer. [16]

Los ATC pueden ser divididos en aquellos que son codificados en el cromosoma X, los genes X-ATC y los que no son X-ATC (Simpson et al 1995), EL 10% de genes en el cromosoma pertenecen a la familia X-CTA, representan más de la mitad de todos los ATC y frecuentemente constituyen a familias multigénicas organizadas en el cromosoma X, como los genes de la familia SSX y GAGE, PAGE, XAGE de la región Xp11, y la región de Xq24-q28 que alberga la más alta densidad de ATC incluyendo MAGE-A, MAGE-C y NY-ESO-1(Simpson 2005, Zendman 2003). Los genes no X-ATC, son distribuidos por el genoma y son en su mayoría genes de copia única. [16, 18, 17, 21]

Conforman varias familias que se encuentran ubicados en lo largo de todos los cromosomas; una de las más importantes es la que corresponde a los genes MAGE (Antígenos Asociados a Melanoma), la cual es la más amplia e históricamente la primera en describirse. [16, 17, 18]

Recientemente se ha propuesto que las proteínas de los ATC podrían estar implicadas en las vías de diferenciación de las células progenitoras o *stem cells*. [20]

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS ATC.

La expresión de estos genes está regulada por factores epigenéticos (metilación y acetilación), en donde el patrón de metilación del DNA se genera

durante el desarrollo embrionario. Las alteraciones en la metilación del DNA ocurren durante la patogénesis de los tumores puesto que se ha observado hipometilación en varios carcinomas, lo anterior sugiere que la hipermetilación del DNA así como la hipometilación juegan un papel muy importante en la tumorigenesis y que la activación transcripcional es debida a la desmetilación del promotor. [15]

La hipermetilación de los dinucleótidos CpG del extremo 5' de *MAGE-A1*, *MAGE-A3*, y *NY-ESO-1*; previene el acceso de los activadores Ets y Sp1 y por lo tanto evita la inducción del promotor, este hallazgo indica una relación entre la hipermetilación del DNA y la represión transcripcional del promotor del gen *MAGE-A1*. Otros genes *MAGE*, como B y C presentan el mismo patrón de expresión.

Cabe señalar que la expresión de estos genes no solo está determinada por la desmetilación del promotor, sino que también influyen factores asociados a la configuración de la cromatina. La acetiltransferasa de histonas y la histonadesatilas están involucradas en las modificaciones post-transcripcionales dando como resultado un reordenamiento de la cromatina.

Se ha demostrado que si se induce la hipo-metilación y la acetilación de las histonas en los promotores de células madre mesenquimales se expresaba los antígenos testiculares *MAGE-A*, *GAGE* y *XAGE-1*, entre otros; lo anterior da como resultado que tanto la metilación del DNA así como la desacetilación de histonas están involucradas en el silenciamiento de los genes *MAGE-A*. En suma al análisis de mRNA por RT-PCR, la expresión de algunos ATC han sido investigados a nivel proteico por análisis inmunohistoquímico (IHC), mostrando buena correlación entre proteína y mRNA. El uso de IHC permite investigar la distribución intratumoral de ATC, revelando lo que puede definirse como expresión ATC en cáncer: su heterogeneidad intratumoral. [15]

La metilación del DNA es una modificación que ocurre y lleva a silenciar la expresión del gen y se refiere a la suma covalente del grupo metil, catalizado por metiltransferasas del DNA (DNMTs). La metilación de DNA puede causar el silencio de genes interfiriendo directamente con la unión de factores específicos de transcripción del DNA o uniendo proteínas metil (MBDs). Todos los genes ATC estudiados son promotores normales de metilación, en tejidos somáticos normales no son expresados y son activados por desmetilación durante la espermatogénesis. La primera evidencia de la expresión de los ATC fue regulada por la metilación del DNA (Weber, et al), que demostró que el tratamiento con la DHA como agente desmetilante del DNA; 5-aza-2'-deoxycitidina (5AZACdr) activando *de novo* la expresión el gen *MAGE-A1* en línea celular de melanoma. En un profundo análisis se demostró, que *MAGE-A1* como gen de expresión correlacionado con el estado de metilación, promotor en células neoplásicas de diferentes histotipos. Esto también es verdadero para diferentes *MAGE A* y *N-Y-ESO-1*, que su expresión fue encontrada siendo asociada invariablemente con un estado de hipo metilación de sus promotores en los tumores y líneas celulares investigadas.

La prueba definitiva del estado de metilación del promotor ATC, es el mecanismo molecular que liderea la regulación de la expresión ATC que viene de los experimentos de transcripciones cuyos genes reportados son manejados por los promotores ATC no metilados y metilados *in vitro*, demostrando que el promotor de metilación fue el único factor limitante de la actividad del promotor ATC en células cancerígenas. En este mismo sentido los recientes estudios han demostrado que el estado promotor de metilación es directamente responsable por la alta expresión heterogénea intratumoral de ATC que es frecuentemente observada en el melanoma humano. Interesantemente, este promotor de metilación heterogéneo ha sido encontrado siendo heredado a un nivel unicelular propagando la expresión ATC heterogénea a generaciones de células hijas.

La asociación reportada entre hipo metilación de promotores ATC y la expresión ATC ha sido recientemente confirmada en población de melanoma de *Stem Cells*, sugiriendo la regulación epigenética que también puede ser un mecanismo importante de la regulación de genes ATC en células cancerosas *Stem Cells*. [15,16]

ANTÍGENOS ASOCIADOS A MELANOMA (*MAGE*)

Fueron identificados inicialmente en melanoma [15-18], los genes de la familia *MAGE-A* se encontraron en una gran variedad de tumores a pesar de que su expresión estaba limitada a células germinales de testículo, ovario y placenta. Los genes de la familia *MAGE-A*, *MAGE-B* y *MAGE-C* están expresados en células germinales y en células de cáncer, mientras que los genes restantes de la familia *MAGE*, sobre todo *MAGE-D* y *NECDIN/MAGE-L2*.

Todos los genes de la familia *MAGE-A*, tienen una proteína codificada por un solo exón precedidos por varios exones no codificantes esto mismo implica para los genes de la familia B, la familia C, sus regiones codificantes están interrumpidas por intrones. [16]

Los genes *MAGE-A*, *B*, *C* fueron los primeros que se descubrieron, están codificados en el cromosoma X y forman el denominado grupo *MAGE* case I (16-21), debido a lo anterior se les ha atribuido funciones similares. Las funciones de estos genes aún no están del todo descifradas pero en investigaciones realizadas de ha demostrado su relación con ciclos de proliferación y apoptosis en las células tumorales.

OTROS ANTÍGENOS TESTICULARES DE CÁNCER.

Otros ATC de importancia biológica son los genes *GAGE*, esta familia se ubica en el cromosoma 11, se le ha encontrado en gran variedad de tumores, las proteínas que codifican son inmunogénicas en humanos y son reconocidas por los linfocitos CD4 y CD8, por lo cual son un blanco importante para posibles vacunas aplicadas a inmunoterapia. *GAGE* está presente durante el desarrollo del ectodermo en el embrión, en células neuroectodermales y en células gliales; así también se encuentran en la corteza adrenal periférica en

embriones entre 6 y 9 semanas, por lo anterior se conoce como un gen del desarrollo embrionario al igual que los genes de la familia *MAGE-A*.

La familia *BAGE* se encuentra formada por 15 miembros, los cuales están presentes en diversos tumores. Se sabe que su activación es debida a factores epigenéticos como la metilación del DNA, que en el caso de *BAGE*, cambio en los patrones de metilación activan el gen, el cual se ha propuesto como biomarcador epigenético en ciertos cánceres.[16]

Los genes *LAGE-1* y *NY-ESO-1* presentan una alta homología y generalmente se encuentran coexpresados en diversos cánceres. Se ha observado la coexpresión de estos genes durante el desarrollo fetal, alrededor de las 22 semanas de gestación, lo cual sugiere que juegan un papel importante en el desarrollo de los cordones sexuales así como de las pro-espermatogonias [19].

EXPRESIÓN DE LOS ANTÍGENOS TESTICULARES DE CÁNCER EN OTRAS NEOPLASIAS.

La frecuencia de expresión del gen *MAGE-A3* en melanomas es de 73%, en carcinomas de esófago 47%, de cabeza y cuello 49% y de vejiga de 36%.

Se ha encontrado la expresión del gen *NY-ESO-1* en otros cánceres, tales como pulmón, mama, próstata, gástrico y en cáncer de esófago, neoplasia que le dio nombre al antígeno. [16]

En mieloma múltiple se demostró expresión tanto del gen *LAGE-1* (42%) como de *Ny-ESO-1* (26%) y coexpresión de ambos genes en un 18% de las muestras analizadas. Su coexpresión también se reportó en cáncer de vejiga, de ovario y carcinoma hepatocelular. Se ha reportado, que basándose en resultados y realizado una correlación clínica, los antígenos testiculares de cáncer son candidatos para inmunoterapias mientras que los genes de la familia *GAGE* y *MAGEC1/CT7* parecían tener impacto en el pronóstico de mieloma múltiple.

Estudios realizados reportaron que los genes *MAGE* estaban silenciados en la médula ósea y en sangre periférica de pacientes con leucemia, mientras que en otros se reportó que los genes estaban presentes en linfocitos T de Leucemia Linfoblástica Aguda así como en células de mieloma múltiple. En Leucemia Mieloblástica crónica los ATC están presentes en sus líneas celulares con mayor expresión del gen *MAGE-A3* y *PRAME*.

INMUNOGENEIDAD DE ATC.

Los ATC son expresados en tumores pero no en tejido normal, excepto en tejido testicular, el cual no es accesible para el sistema inmunológico, de hecho, la barrera de sangre en testículo y la falta de la expresión HLA clase 1 en la superficie de células. Desde un punto de vista inmunológico, los ATC pueden considerarse como objetivos esenciales del tumor.

Los ATC distintos codifican diferentes péptidos antigénicos que son presentados al sistema inmunológico en asociación con varios HLA clase I o

HLA Clase II, teniendo respuesta humoral y Celular. Las respuestas inmunes espontaneas y coordinadas han sido demostradas en contra en varios ATC. En este contexto, *NY-ESO-1*, parece ser el ATC más inmunogénico espontaneo y coordinado humoral y mediador celular de respuestas inmunes en un gran porcentaje de pacientes con tumores expresando *NY-ESO-1*.

NY-ESO-1 ha sido detectado en 36% de canceres tiroideos, 4-12.5% de canceres de pulmón, 7 a 13% de canceres de ovario, 8 a 16% de canceres de mama, 10% melanomas, 12.5% de canceres de vejiga, 13% canceres esofágicos; correlacionando las respuestas de anticuerpos demuestran que más del 90% de los pacientes con anticuerpos *NY-ESO-1* circulando, también han desarrollado respuesta humoral (T CD8+) , ausentes en pacientes que los anticuerpos *NY-ESO-1* no fueron detectados .

Los ATC representan un objetivo molecular ideal para inmunoterapias en pacientes con cáncer. De acuerdo a varios ensayos clínicos empleando ATC, en particular *MAGEA3* y *NY-ESO-1* como agentes de vacuna en pacientes con cáncer de pulmón, ovario y melanoma. La caracterización de péptidos inmunogénicos de ATC seleccionados, juntos con la identificación de antígenos HLA clase 1 restringidos, representa la base para iniciar inmunoterapias basadas en el uso de péptidos de ATC como agentes de vacuna.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

El cáncer de testículo representa del 1-1.5% de las neoplasias masculinas en el mundo; en México durante el 2009 murieron 65 de 100 mil personas por consecuencia de tumores malignos, la mortalidad hospitalaria en México es de aproximadamente 6 de cada 100 personas afectadas, la causa de morbilidad hospitalaria en población menor de 20 años, son los tumores malignos de órganos hematopoyéticos. En tumor testicular, la morbilidad observada en el 2009 en grupos de edad de 15-59 años es de 1.7%, semejante a la frecuencia de la población mundial y el 8.9% presentan morbilidad hospitalaria. Presentan una aparición de 3-6 casos nuevos por 100 000 hombres presentando un incremento en la incidencia en los últimos 30 años, sobre todo en países industrializados aun con los estudios establecidos para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad, en la que engloba los marcadores tumorales séricos los que representan el estado clínico y pronóstico del paciente. De existir marcadores con mayor especificidad como los marcadores moleculares podrían identificar la neoplasia y recurrencia de la enfermedad, mejorando el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad.

¿Existe expresión de los Antígenos Testiculares de *Cáncer MAGE-A3, MAGE-A4, SSX-1 y PRAME* en sangre periférica pre y pos operatoria de pacientes con Tumores de Testículo?

JUSTIFICACIÓN:

Los marcadores tumorales, serológicos en el cáncer de testículo como la alfafetoproteína (AFP), fracción beta de la Hormona de Gonadotropina Coriónica (β -hCG) y Deshidrogenasa Láctica (DHL), representan un papel importante en el diagnóstico, estadio clínico y pronóstico de la enfermedad, ya que están en relación directa con la carga tumoral y el tratamiento de la enfermedad; estos marcadores permiten realizar el diagnóstico ante la sospecha clínica de la enfermedad ya que por si solos no representan un diagnóstico específico.

Los Antígenos testiculares de Cáncer, son antígenos moleculares específicos de tumor ya que se ha demostrado su expresión en pacientes con tumores sólidos. De manera normal se encuentran en tejido de parénquima testicular, ovario y placenta, por lo tanto encontrarlos en cualquier otro tejido incluyendo tejido hematopoyético periférico podría ser indicativo de neoplasia. Los Antígenos Testiculares de Cáncer son marcadores moleculares de nueva generación que podrían ser utilizados en conjunto con los marcadores serológicos ya estudiados en pacientes con Tumores Testiculares para realizar el diagnóstico, así como en el estadio, pronóstico y progresión de la enfermedad.

HIPOTESIS:

Si los Antígenos Testiculares de Cáncer se expresan en sangre periférica de pacientes con tumor de testículo en el preoperatorio y posoperatorio, entonces habrá expresión de estos y representara la permanencia de células tumorales residuales que podrían ser identificados por medio de técnicas moleculares apoyando al diagnóstico de cáncer de testículo y su relación clínica con factores enfermedad.

OBJETIVO:

- Conocer la frecuencia de expresión de los Antígenos Testiculares del Cáncer *MAGE-A3*, *MAGE-A4*, *SSX-1* y *PRAME* en sangre periférica de pacientes con Tumor de Testículo y realizar una correlación con la etapa clínica de la enfermedad.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- 1.-Analizar la expresión a nivel de mRNA de los Antígenos Testiculares de Cáncer *MAGE-A3*, *MAGE-A4*, *SSX-1*, *PRAME* en sangre periférica preoperatoria y posoperatoria de pacientes con diagnóstico de Tumor de testículo.
- 2.-Realizar una correlación clínica entre la expresión de los Antígenos Testiculares de Cáncer y la etapa clínica de los pacientes.

METODOLOGIA

- Tipo de estudio: Experimental – Longitudinal – Prospectivo - Descriptivo

ANALISIS ESTADISTICO:

Se realizó el análisis de distribución Chi cuadrado en donde se analizaron los siguientes parámetros seleccionados de los expedientes de los pacientes, todos contaban con expediente completo del cual se tomó los siguientes parámetros: marcadores tumorales serológicos Alfafetoproteína, Gonadotropina coriónica fracción Beta y deshidrogenasa láctica preoperatorios y control posquirúrgico, tomografía toracoabdominopélvica, tele de tórax, TNM y Etapa clínica, reporte histopatológico, factores de riesgo pronóstico los cuales relacionados con la progresión de la enfermedad según los criterios ya establecidos en la literatura.

POBLACIÓN Y TAMAÑO DE MUESTRA

Pacientes Masculinos mayores de 17 años de edad con diagnóstico de tumor testicular del Servicio de Urología del Hospital General de México O.D.

MATERIAL Y MÉTODOS.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Pacientes mayores de 17 años de edad.
- Pacientes con Diagnóstico de Tumor Testicular.
- Pacientes que no hayan recibido tratamiento previo a diagnóstico.
- Pacientes con estadio clínico bien estadificado.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Pacientes menores de 17 años.
- Pacientes sin diagnóstico y protocolo de estudio completo para Tumor.
- Pacientes que hayan recibido cualquier tipo de tratamiento.

CRITERIOS DE ELIMINACION:

- Muestras insuficientes para realizar el análisis de expresión molecular.
- Abandono de tratamiento y seguimiento del paciente.
- Paciente con tratamiento fuera de la Institución

POBLACION Y MUESTRA

MATERIAL BIOLÓGICO

TEJIDO TESTICULAR Y SANGRE PERIFERICA.

Tejido Testicular de biopsias de pacientes sanos, del Servicio de Urología del HGM.

Sangre Periférica de pacientes con diagnóstico de Tumor de Testículo.

PACIENTES

Se incluyeron en el estudio 22 muestras de pacientes con diagnóstico de Tumor Testicular, pertenecientes al Servicio de Urología del Hospital General de México durante un periodo de 3 meses.

Los pacientes ingresados al estudio recibieron atención en el servicio de Urología con la sospecha clínica de tumor testicular, presentando sintomatología de masa tumoral, aumento de la consistencia o dolor testicular. Se captaron e ingresaron al estudio para ser sometidos a una serie de estudios de laboratorio y gabinete para realizar la corroboración del diagnóstico de Cáncer de Testículo, se realizó estudios sanguíneos de biometría hemática completa, química sanguínea, tiempos de coagulación, marcadores tumorales serológicos alfafetoproteína, fracción beta de gonadotropina coriónica y

deshidrogenasa láctica, ultrasonografía testicular, tomografía computada de abdomen y pelvis y tele de tórax, realizando la estadificación de cada paciente y siendo programado a tratamiento quirúrgico primario con Orquiectomía Radical.

Se obtuvo una muestra sanguínea venosa periférica 10 cc horas previas a orquiectomía radical programada, la cual fue colocada en tubos con EDTA (anticoagulante) y analizada en el servicio de Biología Molecular.

A cada muestra sanguínea preoperatoria se realizó el análisis molecular, separando los mRNA y se almacenaron a -80°C para su análisis posterior por PCR.

Se realizó una toma de muestra sanguínea control 7 a 10 días posterior a orquiectomía radical a los pacientes con Tumor de Testículo, se separó el mRNA y se almaceno a -80° para su análisis posterior en PCR.

GRUPO CONTROL EN INDIVIDUOS SANOS

Se utilizaron 10 muestras de sangre periférica de individuos sanos, las cuales fueron proporcionadas por el banco de sangre del Hospital General de México. Se analizaron los genes *PRAME*, *SSX-1*, *MAGE-A3* y *MAGE-A4* por PCR.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

SEPARACIÓN DE LEUCOCITOS.

Fundamento: Es una técnica de centrifugación por gradiente de densidad para separar las células sanguíneas.

Las muestras de sangre periférica de individuos sanos así como de los pacientes con Tumor de Testículo se trataron por el mismo procedimiento, el cual es el siguiente:

De tres muestras de sangre periférica se vierten en tubo Falcón agregando solución PBS 1x (Phosphate Buffer Solution) hasta completar 13 ml centrifugando a 2000 rpm/5 minutos, obteniendo la separación de células, se continua con aspiración de leucocitos vertiendo en nuevo tubo Falcon, se realiza lavado de células agregando solución Lítica hasta completar 13 ml, se agito con Vortex y se colocó en frio por 7 minutos, se realiza centrifugación por 5 minutos, se separan las células centrifugadas y se decantan en tubo y se realiza lavado con solución PBS 1x dilución 1:2 hasta 13 ml, se realiza una nueva centrifugación a 2000rpm/ 5 minutos, obteniendo leucocitos se colocan en tubo de eppendorf agregando 1 ml de PBS 1x dilución 1:2 continuando centrifugación en Eppendorf a 2000 rpm por 3 minutos aclarando y obteniendo leucocitos a los que se agrega solución D 500mclts. Una vez aisladas y lavadas las células leucocíticas se almacenaron a -80°C hasta el momento del análisis por RT-PCR.

AISLAMIENTO DE mRNA

El aislamiento de RNA se realizó por el método de Chomczynski. El procedimiento se lleva a cabo en hielo.

Una vez obtenidas los leucocitos de Sangre periférica se les agregó 500 μ L de solución D (4M tiocinato de guanidina, 25mM citrato de sodio, 0.5% sarcosil, 0.1 M 2-mercaptoetanol) y se mezcló mediante agitación hasta homogeneizar.

Se agregaron 100 μ L de acetato de sodio 2M pH 4, se agitó durante 5 segundos 2 veces. Se adicionaron 500 μ L de fenol saturado y se mezcló por inversión. Se agregaron 100 μ L de cloroformo-alcohol isoamílico (49:1), mezclando hasta homogeneizar completamente. Se incubó a 4°C durante 15 min y se centrifugó a 7450 g por 20 min. Se separó la fase acuosa procurando no tomar la fase intermedia, se colocó en un tubo limpio. Se adicionaron 500 μ L de etanol, mezclando por inversión y se guardaron a -20°C toda la noche. Al siguiente día se centrifugó a 9000 g por 15 min. Se decantó el sobrenadante, dejando el "pellet" de RNA. Se agregaron 500 μ L de etanol al 75% y se centrifugó a 2600 g por 6 min. Se decantó el sobrenadante y se dejó secar el exceso de etanol invirtiendo el tubo. Según el tamaño del pellet se agregaron de 10 a 40 μ L de agua inyectable. Se alineó a 70°C durante 10 min. Se aguardó a -80°C hasta su utilización.

INTEGRIDAD, PUREZA Y CUANTIFICACIÓN DEL RNA

INTEGRIDAD

Para observar la integridad del RNA se prepara un gel de agarosa al 2%. Se toma como referencia las subunidades 18s y 28s del RNA ribosomal.

Procedimiento:

Se pesaron 0,3 grs de agarosa. Se disolvieron en 30 mL de TAE 1X. Se calentó hasta completa disolución. Se dejó enfriar un poco y se adicionaron 5 μ L de bromuro de etidio. Se vació el contenido en el molde para gel y se dejó solidificar. La cámara de electroforesis se llenó con TAE 1X. Para cargar las muestras en los pozos del gel se tomaron 2 μ L de RNA y se diluirlos con 2 μ L de Loading Buffer.

Una vez cargadas las muestras en cada pozo se conectó la cámara a la fuente de poder aplicando una corriente de 70V. Se dejó correr de 20-60 min. Se retira el gel de la cámara y se observa a luz UV.

CUANTIFICACIÓN Y PUREZA

Fundamento: Los ácidos nucleicos absorben eficientemente luz ultravioleta debido a la presencia de bases aromáticas nitrogenadas a lo largo de las cadenas de DNA. La absorción de UV de DNA es una característica de la molécula, que es usada eficientemente para determinar su concentración. Cada una de las bases tiene su propio y único espectro de absorción y por lo

tanto contribuye de manera diferente a la propiedad total de absorción de UV de una molécula de DNA.

Las absorbancias utilizadas son 260 nm y 280 nm. A 260 nm los ácidos nucleicos alcanzan la absorción máxima de luz. Las proteínas tienen un máximo de absorción a A280 (principalmente por residuos de triptófano) las lecturas a esta longitud pueden mostrar si existe contaminación proteica.

El cálculo de la relación A260 /A280 es una manera común para expresar la pureza del material genético. Dependiendo de la composición nucleica, un valor de 1.65 a 1.9 indican una muestra pura.

Tomar 2 µL de RNA y diluirlo en 998 µL de agua inyectable (dil 1:500). Leer a 260 y 280 nm. Una vez obtenidas las absorbancias a cada una de las longitudes de onda, realizar los cálculos para pureza y cantidad de RNA respectivamente. Pureza = A260nm/ A280nm

µg/µL de RNA = (A260nm) (dilución) (0.04**)

**1 unidad de absorbancia corresponde a 40 µg/mL de RNA

RT-PCR

El cDNA se sintetizó a partir de 5µg de RNA total, utilizando oligo dT (Invitrogen) y 200 U de la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen), la síntesis del cDNA se llevó a cabo a 37°C durante 50 min transcurrido ese tiempo se inactivó la enzima a 70°C por 15 minutos.

DETECCIÓN DE LOS ATC MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Los primers para los genes *MAGE-A3* fueron previamente utilizados por Shichijo et al., en 1995 y por McCurdy et al., en 1998 respectivamente. La misma secuencia de primers se utilizó para amplificar las muestras de los pacientes del HGM. En lo concerniente al resto de los ATC (*MAGE-A3*, *MAGE-A4*, *SSX-1* y *PRAME*) los oligonucleótidos fueron diseñados en el laboratorio de Biología Molecular del HGM. Como control se utilizó el gen constitutivo GAPDH

La amplificación se realizó en PCR individuales, es decir, un gen por tubo de reacción. La estandarización (Tabla 6) se llevó a cabo utilizando diversas concentraciones de oligonucleótido, así como de temperaturas de alineación, dicha estandarización se llevó a cabo con tejido testicular, el cual es el control positivo. A continuación se muestra la secuencia de cada primer así como el la longitud esperada del producto de PCR.

Tabla 1. Secuencias de los primers utilizados para la detección de los antígenos testiculares de Cáncer.

GEN	SECUENCIA DEL PRIMER	TAMAÑO DEL PRODUCTO (pb)
<i>MAGE-A3</i>	5'-TGGAGCACCAGAGGCCCCC-3' (F) 5'-GGACGATTATCAGGAGGCCTGC-3' (R)	725
<i>MAGE-A4</i>	5'-GAGCAGACAGGGCCAACCG -3' (F) 5'-AAGGACTCTGCGTCAGGC-3' (R)	445
<i>SSX-1</i>	(F) 5'- AAGCCAGCAGAGGAGGAAAA-3' (R) 5'-TATTTGCTTTTCCTGGGGGG-3'	97 pb
<i>PRAME</i>	(F) 5'- AACTGCTGGGCTTATGGG-3' (R) 5'-CCCTCACACTGAACACTTG-3'	124 pb
<i>GAPDH</i>	5'-CGGGAGCTTGTCATCAATGG-3' (F) 5'-CATGGTTCACCCCATGACG-3' (R)	217 pb

La amplificación se realizó en PCR individuales, es decir, un gen por tubo de reacción. La estandarización (Tabla 6) se llevó a cabo utilizando diversas concentraciones de primer, así como de temperaturas de alineación, dicha estandarización se llevó a cabo con tejido testicular, el cual es el control positivo.

Tabla 2. Volúmenes de los reactivos para PCR.

REACTIVO	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
10X Buffer PCR (200mM Tris-HCl, 500 mM KCl)	1,3 µL	1x
MgCl ₂ (25mM)	0,8 µL	1 mM
Cóctel de dNTP's 10 mM	0,7 µL	1 mM
Primer 5' (100 nM) Primer 3' (100nM)	0,7 µL 0,7 µL	10 nM 10 nM
Templado cDNA	1,0 µL	1 µg/µL
Taq polimerasa 5U/ µL	0,1 µL	20 U/µL
H ₂ O	cbp 10 µL	

Tabla 3. Condiciones de amplificación para los antígenos testiculares de cáncer.(Tamaño mayor a 150 pb)

	DESNATURALIZACIÓN	ALINEACIÓN	ELONGACIÓN
TEMPERATURA	94°	MAGE-A3 67°	72°C
		MAGE-A4 64°	72°C
TIEMPO	2 minutos	45 segundos	1 minutos

Tabla 4. Condiciones de amplificación para los antígenos testiculares de cáncer. (Tamaño menor a 150 pb)

	DESNATURALIZACIÓN	ALINEACIÓN	ELONGACIÓN
TEMPERATURA	94°	PRAME SSX-1	72°
TIEMPO	40 SEGUNDOS	30 SEGUNDOS	8 MINUTOS

SECUENCIACIÓN DE LOS ATC

Los fragmentos amplificados por PCR fueron enviados para su secuenciación al Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). Las secuencias fueron alineadas en el programa BLAST del NCBI contra la base de datos Human Genomic Plus Transcript (G+T).

RESULTADOS

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS ATC EN TEJIDO TESTICULAR

Se realizó la estandarización de cada gen en tejido testicular, el cual se tomó como control positivo debido a que los ATC se expresan de manera normal en este tejido y no en los demás a excepción de placenta en menor cantidad.

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS ATC EN INDIVIDUOS SANOS

El análisis de los antígenos testiculares en individuos sanos se realizó con la finalidad de corroborar la nula expresión de estos genes en tejido normal, como se ha reportado en estudios previos. Se colectaron 10 muestras, las cuales fueron proporcionadas por el banco de sangre del HGM. Se extrajo el RNA con reactivo Trizol y se analizó su integridad en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio

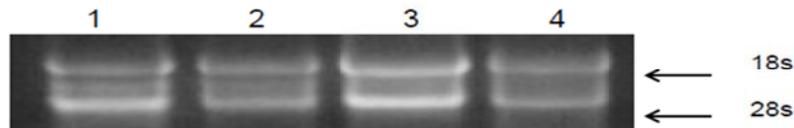
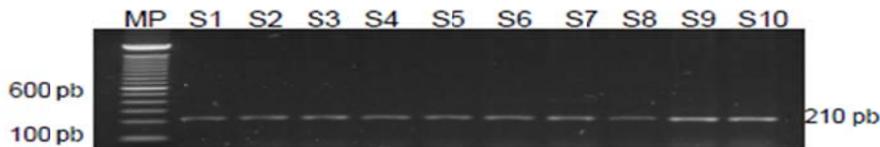


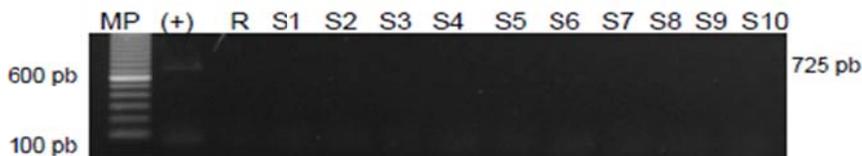
Figura1: RNA robosomal. Observación por electroforesis. Gel de agarosa al 1% se muestran las bandas 18s y 28 s. 1-4 muestras de individuos sanos.

Se realizó la RT-PCR para la identificación de los genes GAPDH (control interno) y ATC en individuos sanos con la finalidad de validar el estudio demostrando que en tejido hematopoyético normal no se encuentran expresados los ATC. Como control positivo se utilizó tejido testicular, (previamente estandarizado) y 10 muestras de individuos sanos, este número se considera aceptable para la validación ya que los genes no deben presentarse bajo ninguna circunstancia en tejido hematopoyético normal. Como era de esperarse no se encontró expresión de los ATC en los individuos sanos (figura 2)

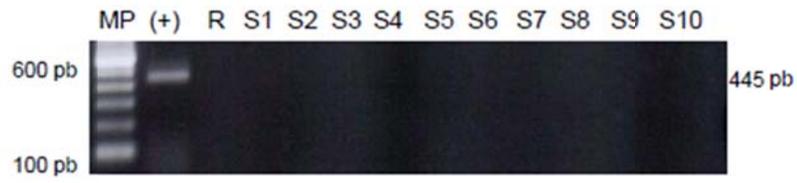
A) *GAPDH*



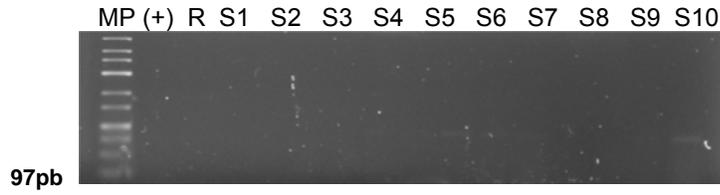
B) *MAGE-A3*



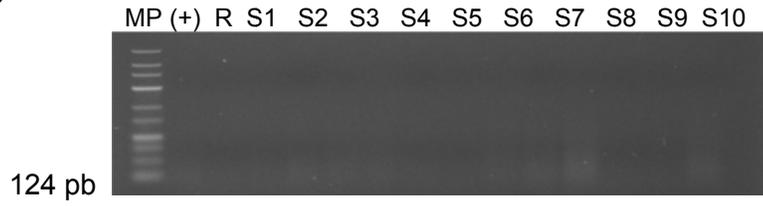
C) *MAGE-A4*



D) *SSX-1*



E) *PRAME*



	‰
	;

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS ANTÍGENOS TESTICULARES DE CÁNCER EN PACIENTES CON TUMOR TESTICULAR.

Una vez realizada la estandarización, utilizando tejido testicular como control positivo e individuos sanos como control negativo, se continuó con el análisis de los ATC en pacientes con Tumor Testicular.

De acuerdo con los criterios de inclusión se analizaron un total de 22 pacientes hombres con Tumor Testicular, los cuales 22 ingresaron al servicio de Urología Pabellón 105a del Hospital General de México O.D.

De los 22 pacientes hombres del HGM se encontraban con intervalos de edad en nuestra población de los 17- 60 años, ya que en el Servicio de Urología se da atención médico-quirúrgica a mayores de 17 años. El rango de edad de mayor frecuencia fue de 17-25 años (figura 3). Los pacientes con Tumor Testicular presentaron mayor frecuencia de afección en el testículo derecho en relación con el izquierdo (figura 4). El tiempo de evolución de la enfermedad que presentaban los pacientes fue mayor a 4 meses (figura 5). La mayoría de los pacientes presentaban antecedentes de riesgo como tabaquismo y alcoholismo. (figura 6). La etapa clínica de la enfermedad de mayor frecuencia Etapa I-S y I-A (figura 7).

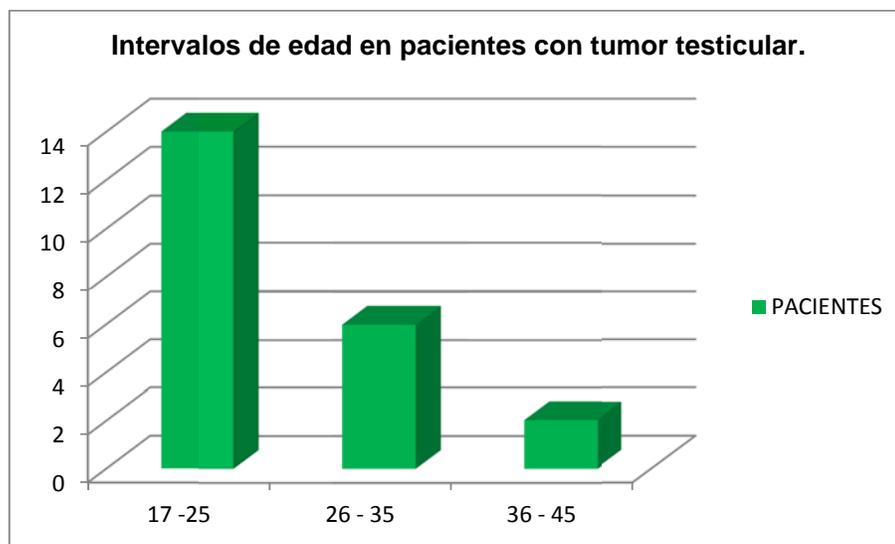


Figura 3: Intervalos de edad.

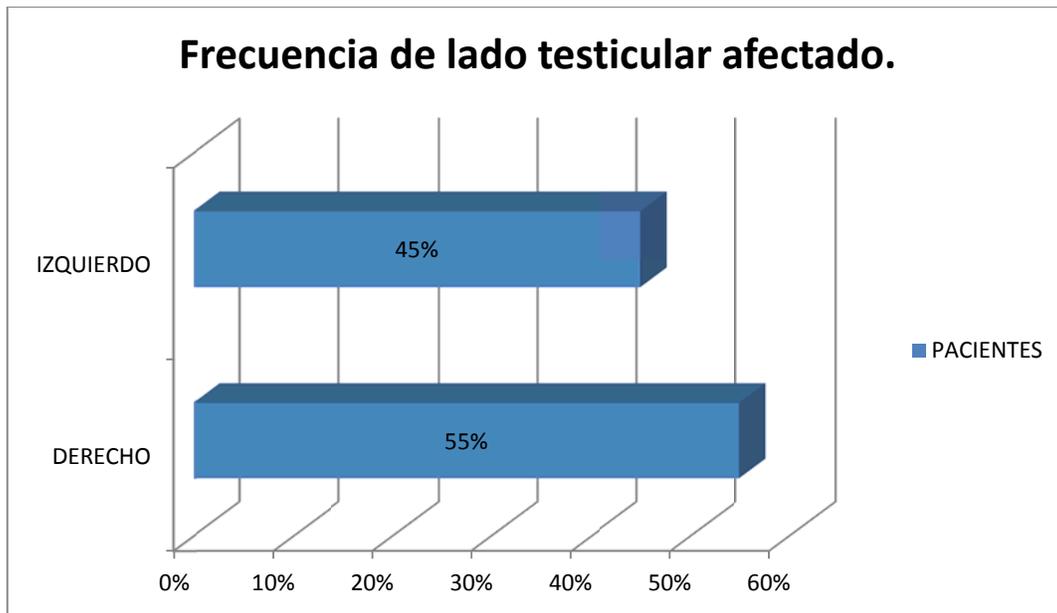


Figura 4: frecuencia de lado afectado

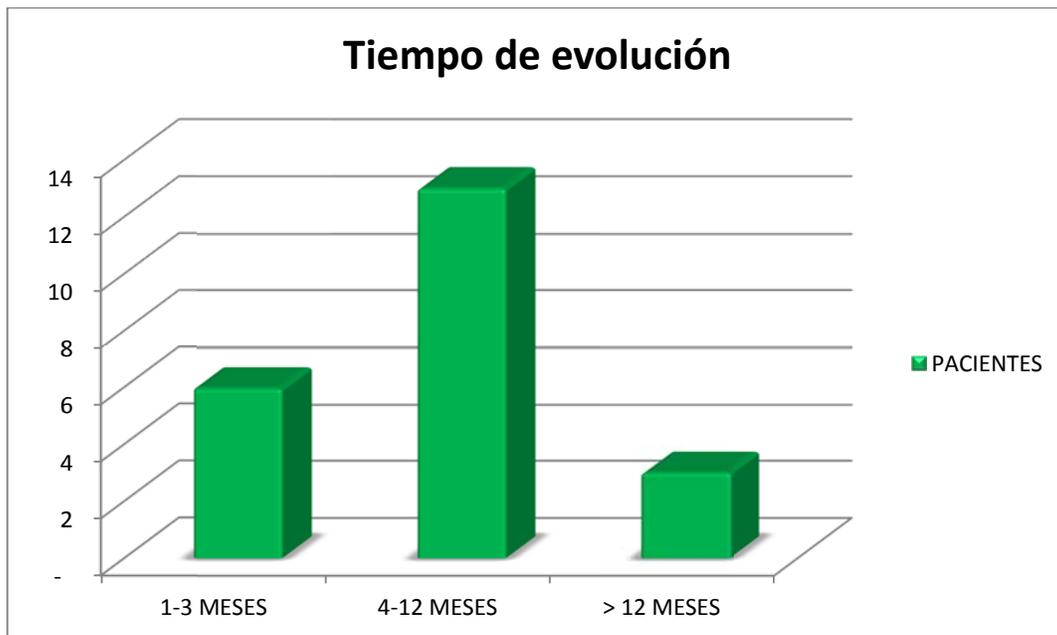


Figura 5: Intervalos de la evolución de la enfermedad en pacientes con tumor testicular.

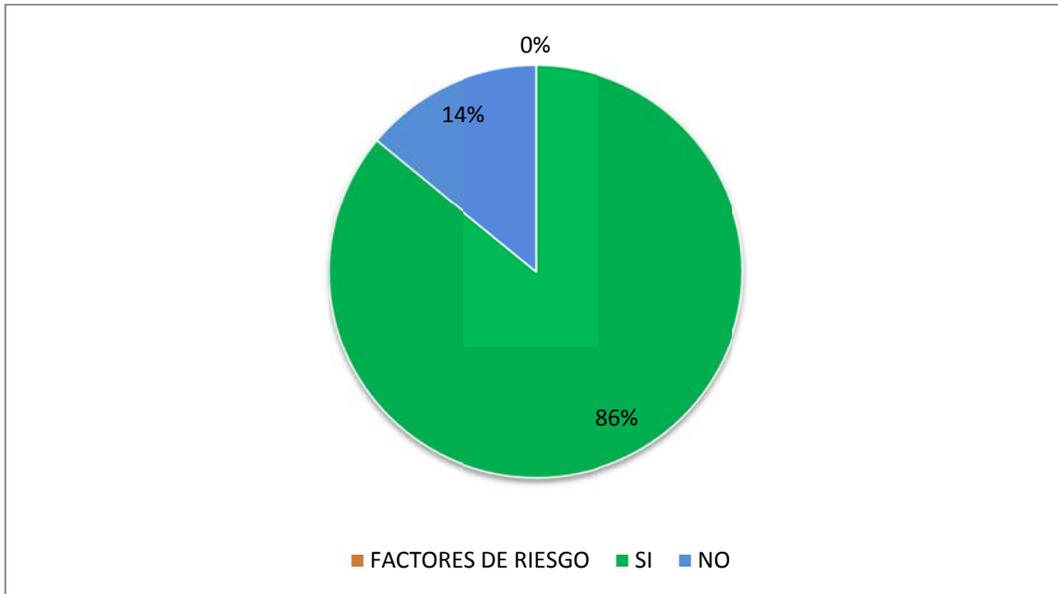


Figura 6: Frecuencia de presentación de factores de riesgo en pacientes con tumor testicular. (tabaquismo, alcoholismo)

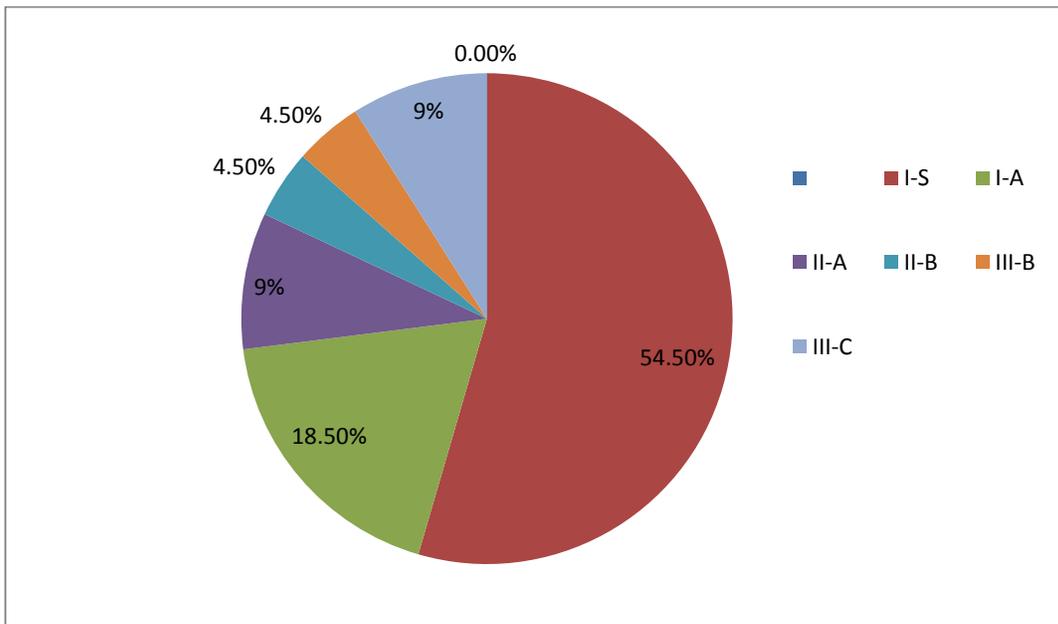
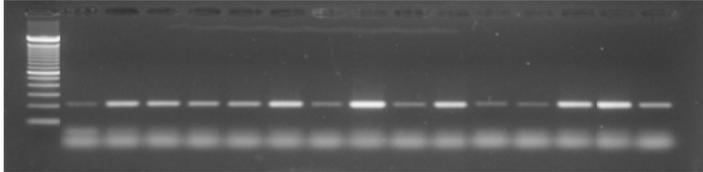


Figura 7: Frecuencia de presentación de la etapa clínica de pacientes con tumor testicular.

Se analizaron 22 muestras de sangre periférica de pacientes diagnosticados con Tumor Testicular y bajo consentimiento informado firmado, se realizó RT-PCR, para verificar la integridad del RNA con el gen constitutivo GAPDH (figura 8). Una vez corroborado que el gen control estaba presente se procedió a realizar la PCR para los genes de la familias *MAGE-A3*, *MAGE-A4*, *SSX-1* Y *PRAME* (tabla 5).

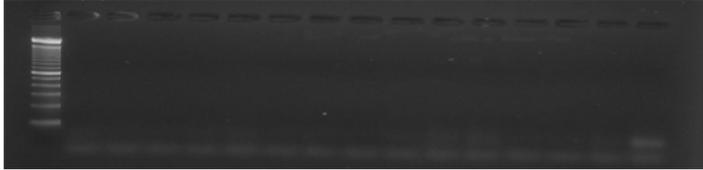
A) GAPDH

MP (+) R S1 S2 S3 S4 S5 S6 S7 S8 S9 S10



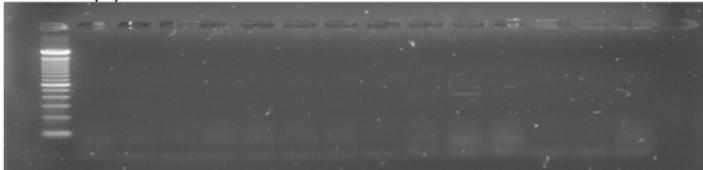
B) MAGE-A3

MP (+) R S1 S2 S3 S4 S5 S6 S7 S8 S9 S10



C) MAGE-A4

MP (+) R S1 S2 S3 S4 S5 S6 S7 S8 S9 S10



D) SSX-1

MP (+) R S1 S2 S3 S4 S5 S6 S7 S8 S9 S10



E) PRAME

MP (+) R S1 S2 S3 S4 S5 S6 S7 S8 S9 S10



Figura 8: mRNA GAPDH, MAGE-A3, MAGE-A4, SSX-1, PRAME.

Tabla 5: Expresión de los antígenos testiculares de cáncer en 22 pacientes con tumor testicular.

PACIENTE	MAGE-A3 n= 22	MAGE-A3 control	MAGE-A4 n= 22	MAGE-A4 control	SSX-1 n=22	SSX-1 control	PRAME n=22	PRAME control
M1	-	-	+	-	+	+	+	-
M2	-	-	-	-	+	-	-	-
M3	-	-	-	+	+	-	-	-
M4	-	-	+	+	+	+	-	-
M5	-	-	+	+	+	+	-	-
M6	-	-	+	+	+	-	-	-
M7	-	-	-	-	-	-	-	-
M8	-	-	-	-	-	-	-	-
M9	-	-	-	-	-	-	-	-
M10	-	-	-	-	+	-	-	-
M11	-	-	+	+	+	+	-	-
M12	-	-	+	+	+	-	-	-
M13	-	-	-	-	-	-	-	-
M14	-	-	-	-	+	+	-	-
M15	-	-	+	+	+	-	-	-
M16	-	-	+	+	+	+	-	-
M17	-	-	+	+	+	+	-	-
M18	-	-	+	+	+	+	-	-
M19	-	-	-	+	+	+	-	-
M20	-	-	+	+	+	+	-	-
M21	-	-	-	-	+	+	-	-
M22	-	-	-	-	+	+	+	+

Se analizaron las muestras de sangre periférica para cada gen previas a tratamiento inicial con orquiectomía radical (realizado bajo consentimiento informado), tomando un control posoperatorio de 8 a 10 días a pacientes con diagnóstico de Cáncer de Testículo.

Como se ve en la tabla los genes de mayor expresión fueron *SSX-1* y *PRAME*, también se observa que en algunos casos existe co-expresión de los genes, por ejemplo en las muestras de *PRAME M1* y *M1* control y *PRAME M22* y *M22* control posoperatorio.

Tabla 6: Expresión de los antígenos testiculares de cáncer en muestras de sangre periférica de pacientes con tumor testicular (preoperatorio).

	MAGE-A3		MAGE-A4		SSX-1		PRAME	
	PREOP	POSOP	PREOP	POSOP	PREOP	POSOP	PREOP	POSOP
N	22		22		22		22	
Positivos	0	0	11	12	18	12	2	2
Frecuencia	0	0	50%	55%	81.1%	55%	9.5%	9.50%

Los resultados de los pacientes analizados para los ATC se muestra en la tabla 6, se observa que el gen *SSX-1* fue el de mayor frecuencia correspondiendo al 81.1% continuando el gen *MAGE-A4* en una frecuencia del 50% previo a tratamiento primario con orquiectomía radical. Así como el gen *MAGE-A4* y el gen *SSX-1* tienen una frecuencia similar del 50% en pacientes posoperados de orquiectomía radical (figura 9). La disminución de la expresión del gen *SSX-1* en el posoperatorio representa una gran relevancia para el estudio ya que nos permite observar que representa la persistencia de la enfermedad y el pronóstico de la misma.

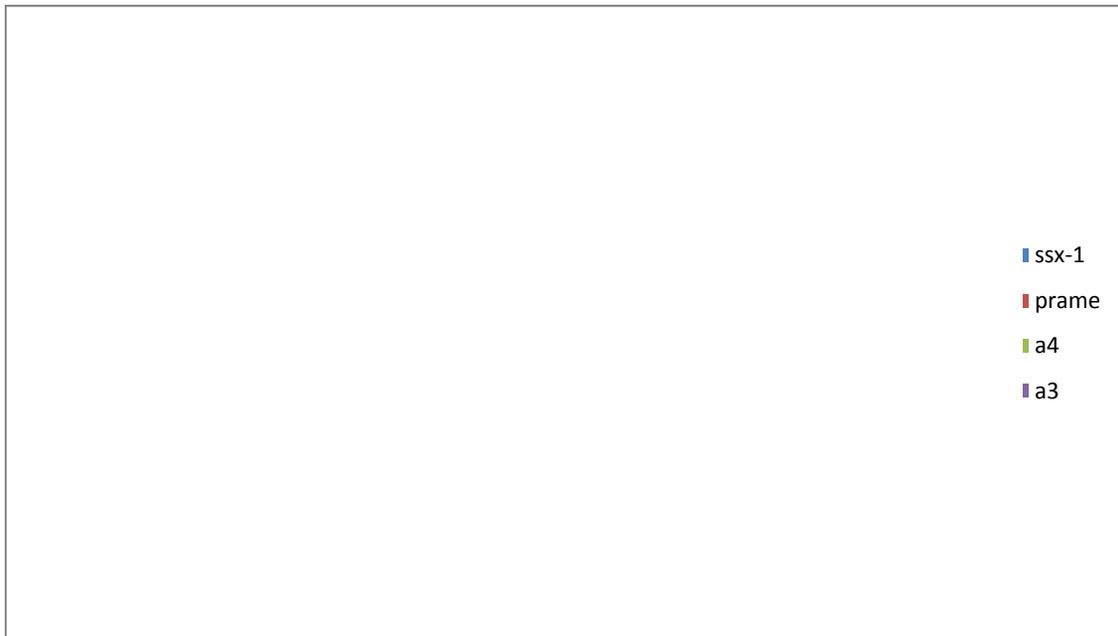


Figura 9: Porcentaje de expresión de los ATC

CORRELACIÓN CLÍNICA DEL LOS ATC EN TUMOR TESTICULAR.

La correlación clínica fue realizada en base al gen de mayor frecuencia *SSX-1* y *MAGE-A4*. Los genes *MAGE-A3* y *PRAME* fueron los genes de menor frecuencia, por este motivo no se consideraron para la elaboración de la correlación clínica de los pacientes. La correlación clínica nos permitirá identificar si la expresión de este gen influye en la progresión de la enfermedad en los pacientes.

Se realizó el análisis de distribución Chi cuadrado en donde se analizaron los siguientes parámetros seleccionados de los expedientes de los pacientes, todos contaban con expediente completo del cual se tomó los siguientes parámetros: marcadores tumorales serológicos Alfetoproteína, Gonadotropina coriónica fracción Beta y deshidrogenasa láctica preoperatorios y control posquirúrgico, tomografía toracoabdominopélvica, tele de tórax, TNM y Etapa clínica, reporte histopatológico, factores de riesgo pronostico los cuales relacionados con la progresión de la enfermedad según los criterios ya establecidos en la literatura. (Tabla 7).

PACIENTE	EXPEDIENTE	EDAD	LADO AFECTADO	EVOLUCION	TAC	RX TORAX	MT PREOP	AFP	FBHCG	DHL	MT POSOP	AFP	FBHCG	DHL	TNM	ETAPA CLINICA	FAC PRONOSTICO	ORQUIECTOMIA	HISTOPATOLOGICO
1	1902537	22	izquierdo	3 meses	Negativo	Negativo	21.03.12	44	11.84	203	18.04.12	11.8	0.45	166	T1N0M0S1	ETAPA IS	BUENO	10.04.12	T. Geminal Mixto
2	1733081	20	derecho	12 meses	Negativo	Negativo	22.03.12	93.2	46.4	210	11.04.12	31.92	1.39	176	T1N0M0S1	ETAPA IS	BUENO	04.04.12	T. Geminal Mixto
3	2269731	35	izquierdo	48 meses	Negativo	Negativo	12.04.12	6303	155.5	514	30.04.12	646	5.01	392	T1N0M0S2	ETAPA IS	BUENO	20.04.12	T. Geminal Mixto
4	2279465	20	derecho	6 meses	Negativo	Negativo	13.04.12	122.4	1.01	479	30.04.12	29.78	0.35	209	T1N0M0S1	ETAPA IS	BUENO	20.04.12	T. Geminal Mixto
5	2277336	26	derecho	6 meses	Positivo	Negativo	16.04.12	1001	480	273	30.04.12	214	14.65	165	T1N1M0S2	ETAPA IIB	INTERMEDIO	20.04.12	T. Geminal Mixto
6	2275360	25	izquierdo	8 meses	Positivo	Negativo	21.03.12	1.5	0	360	25.04.12	1.3	0.83	151	T1N1M0S1	ETAPA IIA	bueno	17.04.12	Seminoma Clasico
7	2267639	18	izquierdo	12 meses	Negativo	Negativo	10.04.12	2504	6.86	217	04.05.12	561.52	0.58	135	T1N0M0S2	ETAPA IS	BUENO	27.04.12	T. Geminal Mixto
8	2281160	29	izquierdo	6 meses	Negativo	Negativo	18.04.12	3.6	0.68	166	04.05.12	3.12	0.44	123	T1N0M0S0	ETAPA IA	BUENO	27.04.12	T. Geminal Mixto
9	2276477	44	izquierdo	6 meses	Negativo	Negativo	12.04.12	56	5.23	224	04.05.12	16.75	0.41	176	T1N0M0S1	ETAPA IS	BUENO	27.04.12	Seminoma Clasico
10	2280144	24	derecho	6 meses	Positivo	Positivo	10.05.12	1552	227.07	748	25.05.12	467	319	1060	T2N3M1bS2	ETAPA IIC	MALO	18.05.12	T. Geminal Mixto
11	2290858	33	izquierdo	6 meses	Negativo	Negativo	07.05.12	640.22	24897.18	323.17	23.05.12	35.29	94.79	142	T1N0M0S2	ETAPA IS	BUENO	30.05.12	T. Geminal Mixto
12	2291629	20	izquierdo	1 mes	Positivo	Negativo	18.05.12	1.12	4.08	681	01.06.12	1	3.2	320	T1N1M0S1	ETAPA IIA	BUENO	23.05.12	Seminoma Clasico
13	1830613	24	derecho	3 meses	Positivo	Negativo	24.05.12	1.54	0.26	134	08.06.12	1.53	0.35	132	T1N0M0S0	ETAPA IA	BUENO	29.05.12	T. Leucemoide
14	2293749	19	derecho	8 meses	Negativo	Negativo	25.05.12	1.22	0.52	134	08.06.12	1.92	0.86	144	T1N0M0S0	ETAPA IA	BUENO	29.05.12	T. Geminal Mixto
15	2289897	24	derecho	1 mes	Positivo	Negativo	08.05.12	7.7	1	597	05.06.12	6.18	1.53	185	T1N2M0S1	ETAPA IIB	INTERMEDIO	14.06.12	T. Senos Endodermicos
16	2296192	23	derecho	3 meses	Positivo	Positivo	04.06.12	6.33	3.02	234	21.06.12	5.9	1.08	300	T1N2M0S1	ETAPA IIB	INTERMEDIO	12.06.12	T. Senos Endodermicos
17	2290394	24	derecho	18 meses	Negativo	Negativo	01.06.12	2.56	3.1	263	20.06.12	2.35	0.51	139	T1N0M0S1	ETAPA IS	BUENO	12.06.12	Seminoma Clasico
18	2500815	21	derecho	18 meses	Negativo	Negativo	06.06.12	280	334.19	134	28.06.12	50.27	6.34	97	T1N0M0S1	ETAPA IS	BUENO	19.06.12	Seminoma Clasico
19	2277719	31	derecho	3 meses	Negativo	Negativo	17.06.12	2.18	0.39	189	25.06.12	2.38	0.74	170	T1N0M0S0	ETAPA IA	BUENO	19.06.12	T. Geminal Mixto
20	2265826	38	derecho	5 meses	Negativo	Negativo	03.04.12	5.38	5.28	265	03.07.12	5.24	0.2	185	T1N0M0S1	ETAPA IS	BUENO	19.06.12	T. Geminal Mixto
21	2295454	33	derecho	12 meses	Negativo	Negativo	12.06.12	1.3	77.58	211	12.07.12	1.17	0.81	160	T1N0M0S1	ETAPA IS	BUENO	26.06.12	T. Geminal Mixto
22	2506682	23	izquierdo	4 meses	Negativo	Negativo	29.06.12	1.5	0	1911	16.07.12	1.55	0.09	194	T1N0M0S1	ETAPA IS	BUENO	07.07.12	Seminoma Clasico

Tabla 7: parámetros de correlación clínica con ATC.

El análisis de distribución chi cuadrado se realizó correlacionando el rango de edad, lado afectado, tiempo de evolución de la enfermedad, relación con estudios de imagen como radiografía tele de torax, tomografía axial computada de abdomen y pélvis, marcadores tumorales serológicos para tumor testicular de forma preoperatoria y posoperatoria, reporte histopatológico, etapa clínica y factores pronósticos de la enfermedad obteniendo los siguientes resultados.

En la Tabla 8 de correlación clínica con *SSX-1* se observa que existe expresión de este gen con mayor frecuencia en pacientes menores de 26 años de edad (59.1%) afectando el lado derecho (54,5%), el tiempo de evolución de 3 a 12 meses en el momento de ser atendidos en el servicio de urología (45.5%), en un 54.5% con la presencia de ganglios retroperitoneales permaneciendo positivo en un 45.5% en el posoperatorio, pero también se expresó con mayor frecuencia en pacientes que no presentaban metastasis pulmonares (72.7%); se expresó cuando los marcadores serológicos se encontraban en S 1-2 según la clasificación de la etapa S, tuvo mayor expresión en Etapa Clínica I y en tumores testiculares germinales mixtos según el reporte histopatológico. Lo importante de este gen es que se mantiene expresando en sangre periférica posterior a orquiectomía radical, lo cual representa que esta persistencia puede estar relacionada con la presencia de neoplasia. En la Tabla 9, la expresión del gen *MAGE-A4* presenta la misma tendencia que el gen *SSX-1* en menor frecuencia que este, pero mantiene la expresión en el posoperatorio, en la tabla 10 aun que el gen *PRAME* solo se expresa en dos pacientes, persiste su expresión posterior a la cirugía en un 50%.

Tabla 8: Correlación clínica del SSX-1.

SSX-1		Preoperatorio		Postoperatorio	
		Negativo		positivo	
		N	%	N	%
Rango Edad	menos de 26	2 - (9.1%)	13 - (59.1%)	7 - (31.8%)	8 - (36.4%)
	más de 26	2 - (9.1%)	5 - (22.7%)	3 - (13.6%)	4 - (18.2%)
Lado afectado	Derecho	1 - (4.5%)	12 - (54.5%)	4 - (18.2%)	9 - (40.9%)
	izquierdo	3 - (13.6%)	6 - (27.3%)	6 - (27.3%)	3 - (13.6%)
Evolución	0-3 meses	1 - (4.5%)	5 - (22.7%)	3 - (13.6%)	3 - (13.6%)
	3-12 meses	3 - (3.6%)	10 - (45.5%)	6 - (27.3%)	7 - (31.8%)
	más de 12 meses	0 - (.0%)	3 - (13.6%)	1 - (4.5%)	2 - (9.1%)
TAC	con ganglios	3 - (13.6%)	12 - (54.5%)	5 - (22.7%)	10 - (45.5%)
	sin ganglios	1 - (4.5%)	6 - (27.3%)	5 - (22.7%)	2 - (9.1%)
Rx tórax	sin metástasis	4 - (18.2%)	16 - (72.7%)	9 - (40.9%)	11 - (50.0%)
	con metástasis	0 - (.0%)	2 - (9.1%)	1 - (4.5%)	1 - (4.5%)
Factores Pronósticos	Bueno	3 - (13.6%)	15 - (68.2%)	8 - (36.4%)	10 - (45.5%)
	Intermedio	1 - (4.5%)	2 - (9.1%)	1 - (4.5%)	2 - (9.1%)
	mal	0 - (.0%)	1 - (4.5%)	1 - (4.5%)	0 - (.0%)

SSX-1		Preoperatorio		Posoperatorio	
		Negativo		Positivo	
		N - %	N - %	N - %	N - %
AFP	< de 1000	3 - (13.6%)	15 - (68.2%)	10 - (45.5%)	12 - (54.5%)
	1000-10000	1 - (4.5%)	3 - (13.6%)	0 - (.0%)	0 - (.0%)
FBHCG	< 5000	4 - (18.2%)	17 - (77.3%)	10 - (45.5%)	12 - (54.5%)
	5000-50000	0 - (.0%)	1 - (4.5%)	0 - (.0%)	0 - (.0%)
DHL	< de 1.5xN	4 - (18.2%)	10 - (45.5%)	7 - (31.8%)	11 - (50.0%)
	Mayor a 1.5 a 10 x N	0 - (.0%)	8 - (36.4%)	3 - (13.6%)	1 - (4.5%)
SSX-1		Preoperatorio		Posoperatorio	
		Negativo		Positivo	
		N - %	N - %	N - %	N - %
TNM	Etapa I	4 - (18.2%)	12 - (54.5%)	6 - (27.3%)	10 - (45.5%)
	Etapa II	0 - (.0%)	4 - (18.2%)	3 - (13.6%)	1 - (4.5%)
	Etapa III	0 - (.0%)	2 - (9.1%)	1 - (4.5%)	1 - (4.5%)
RHP	Seminomatoso	1 - (4.5%)	5 - (22.7%)	3 - (13.6%)	3 - (13.6%)
	No seminomatoso	0 - (.0%)	2 - (9.1%)	1 - (4.5%)	1 - (4.5%)
	Mixto	2 - (9.1%)	10 - (45.5%)	5 - (22.7%)	7 - (31.8%)
	Otro	1 - (4.5%)	1 - (4.5%)	1 - (4.5%)	1 - (4.5%)

Tabla 9: correlación clínica del MAGE-A4, con datos clínicos.

MAGE-A4		Preoperatorio		Posoperatorio	
		Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
		N - %	N - %	N - %	N - %
Rango de Edad	menos de 26 años	6 - (27.3%)	9 - (40.9%)	8 - (36.4%)	7 - (31.8%)
	más de 26 años	3 - (13.6%)	4 - (18.2%)	3 - (13.6%)	4 - (18.2%)
Lado afectado	Derecho	5 - (22.7%)	8 - (36.4%)	6 - (27.3%)	7 - (31.8%)
	Izquierdo	4 - (18.2%)	5 - (22.7%)	5 - (22.7%)	4 - (18.2%)
Evolución	0-3 meses	1 - (4.5%)	5 - (22.7%)	3 - (13.6%)	3 - (13.6%)
	3-12 meses	8 - (36.4%)	5 - (22.7%)	8 - (36.4%)	5 - (22.7%)
	más de 12 meses	0 - (.0%)	3 - (13.6%)	0 - (.0%)	3 - (13.6%)
TAC	con ganglios	7 - (31.8%)	8 - (36.4%)	8 - (36.4%)	7 - (31.8%)
	sin ganglios	2 - (9.1%)	5 - (22.7%)	3 - (13.6%)	4 - (18.2%)
RX Tórax	sin metástasis	8 - (36.4%)	12 - (54.5%)	10 - (45.5%)	10 - (45.5%)
	con metástasis	1 - (4.5%)	1 - (4.5%)	1 - (4.5%)	1 - (4.5%)
Factores pronóstico	Bueno	7 - (31.8%)	11 - (50.0%)	9 - (40.9%)	9 - (40.9%)
	Intermedio	1 - (4.5%)	2 - (9.1%)	1 - (4.5%)	2 - (9.1%)
	Malo	1 - (4.5%)	0 - (.0%)	1 - (4.5%)	0 - (.0%)
MAGE-A4		Preoperatorio		Posoperatorio	
		Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
		N - %	N - %	N - %	N - %
AFP	< de 1000	7 - (31.8%)	11 - (50.0%)	11 - (50.0%)	11 - (50.0%)
	1000-10000	2 - (9.1%)	2 - (9.1%)	0 - (.0%)	0 - (.0%)
FBHCG	< 5000	9 - (40.9%)	12 - (54.5%)	11 - (50.0%)	11 - (50.0%)
	5000-50000	0 - (.0%)	1 - (4.5%)	0 - (.0%)	0 - (.0%)
DHL	< de 1.5xN	7 - (31.8%)	7 - (31.8%)	10 - (45.5%)	8 - (36.4%)
	> a 1.5 a 10 x N	2 - (9.1%)	6 - (27.3%)	1 - (4.5%)	3 - (13.6%)
MAGE-A4		Preoperatorio		Posoperatorio	
		Negativo	Positivo	Negativo	positivo
		N - %	N - %	N - %	N - %
TNM	Etapa I	8 - (36.4%)	8 - (36.4%)	9 - (40.9%)	7 - (31.8%)
	Etapa II	0 - (.0%)	4 - (18.2%)	1 - (4.5%)	3 - (13.6%)
	Etapa III	1 - (4.5%)	1 - (4.5%)	1 - (4.5%)	1 - (4.5%)
RHP	Seminomatoso	2 - (9.1%)	4 - (18.2%)	2 - (9.1%)	4 - (18.2%)
	No seminomatoso	0 - (.0%)	2 - (9.1%)	1 - (4.5%)	1 - (4.5%)
	Mixto	5 - (22.7%)	7 - (31.8%)	6 - (27.3%)	6 - (27.3%)
	Otro	2 - (9.1%)	0 - (.0%)	2 - (9.1%)	0 - (.0%)

Tabla 10: correlación clínica del PRAME, con datos clínicos.

PRAME		Preoperatorio		Postoperatorio	
		Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
		N - %	N - %	N - %	N - %
Rango de Edad	< de 26 años	13 - (59.1%)	2 - (9.1%)	14 - (63.6%)	1 - (4.5%)
	más de 26 años	7 - (31.8%)	0 - (.0%)	7 - (31.8%)	0 - (.0%)
Lado afectado	Derecho	13 - (59.1%)	0 - (.0%)	13 - (59.1%)	0 - (.0%)
	Izquierdo	7 - (31.8%)	2 - (9.1%)	8 - (36.4%)	1 - (4.5%)
Evolución	0-3 meses	5 - (22.7%)	1 - (4.5%)	6 - (27.3%)	0 - (.0%)
	3-12 meses	12 - (54.5%)	1 - (4.5%)	12 - (54.5%)	1 - (4.5%)
	> de 12 meses	3 - (13.6%)	0 - (.0%)	3 - (13.6%)	0 - (.0%)
TAC	Ganglios positivos	13 - (59.1%)	2 - (9.1%)	14 - (63.6%)	1 - (4.5%)
	Ganglios negativos	7 - (31.8%)	0 - (.0%)	7 - (31.8%)	0 - (.0%)
Rx tórax	Metástasis pulmonar	18 - (81.8%)	2 - (9.1%)	19 - (86.4%)	1 - (4.5%)
	Sin Metástasis pulmonar	2 - (9.1%)	0 - (.0%)	2 - (9.1%)	0 - (.0%)
Factores pronóstico	Bueno	16 - (72.7%)	2 - (9.1%)	17 - (77.3%)	1 - (4.5%)
	Intermedio	3 - (13.6%)	0 - (.0%)	3 - (13.6%)	0 - (.0%)
	Mal	1 - (4.5%)	0 - (.0%)	1 - (4.5%)	0 - (.0%)
PRAME		Preoperatorio		Postoperatorio	
		Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
		N - %	N - %	N - %	N - %
AFP	< de 1000	16 - (72.7%)	2 - (9.1%)	21 - (95.5%)	1 - (4.5%)
	1000-10000	4 - (18.2%)	0 - (.0%)	0 - (.0%)	0 - (.0%)
FBHCG	< de 5000	19 - (86.4%)	2 - (9.1%)	21 - (95.5%)	1 - (4.5%)
	Mayor de 5000-50000	1 - (4.5%)	0 - (.0%)	0 - (.0%)	0 - (.0%)
DHL	< de 1.5xN	13 - (59.1%)	1 - (4.5%)	17 - (77.3%)	1 - (4.5%)
	> a 1.5 a 10 x N	7 - (31.8%)	1 - (4.5%)	4 - (18.2%)	0 - (.0%)
TNM	Etapa I	14 - (63.6%)	2 - (9.1%)	15 - (68.2%)	1 - (4.5%)
	Etapa II	4 - (18.2%)	0 - (.0%)	4 - (18.2%)	0 - (.0%)
	Etapa III	2 - (9.1%)	0 - (.0%)	2 - (9.1%)	0 - (.0%)
RHP	Seminomatoso	5 - (22.7%)	1 - (4.5%)	5 - (22.7%)	1 - (4.5%)
	No seminomatoso	2 - (9.1%)	0 - (.0%)	2 - (9.1%)	0 - (.0%)
	Mixto	11 - (50.0%)	1 - (4.5%)	12 - (54.5%)	0 - (.0%)
	Otro	2 - (9.1%)	0 - (.0%)	2 - (9.1%)	0 - (.0%)

DISCUSION:

Existe muy poca información sobre los antígenos testiculares de cáncer y la su expresión en tumores testiculares, durante el transcurso del tiempo la investigación representa un pilar importante en desarrollo de nuevos tratamientos, pero sobre todo para la identificación de las enfermedades, en especial las neoplasias ya que su frecuencia de presentación en los últimos años es más representativa. Los antígenos testiculares de cáncer se han mencionados en algunos estudios que tienen una importancia clínico-inmunológica ya que son reconocidos por linfocitos T cito tóxicos, pero más aún porque dichos genes solo se encuentran de forma normal en tejido testicular sano, ovario y placenta; lo cual explicaría que encontrarlos en cualquier otro tejido que no sean los mencionado nos traduce una expresión neoplásica; (De Smet, 1996). También se sabe que comparten características con los denominados antígenos asociados a tumor. [16]

La función de los ATC no es del todo clara, pero se sabe que actúan regulando mecanismos de proliferación y apoptosis en las células tumorales, lo cual hace más importante su utilización como marcadores de tumor.[21]., aunque muchos no son específicos de tumor específico se han estudiado los genes pertenecientes a la familia *MAGE*, principalmente aquellos de la clase I (*MAGE-A*, *-B* y *-C*), que fueron los primeros en describirse y se les ha asociado con diferentes tipos de cáncer, tal es el caso de los genes de la familia A[22], los cuales se han encontrado en melanoma, carcinoma de esófago, cabeza y cuello, y en enfermedades hematológicas como linfoma, leucemia y mieloma. Esta información que se tiene sobre los ATC nos obliga a estudiar la utilidad que pueden tener estos genes en neoplasias.

Se ha estudiado que algunos antígenos como el *MAGE-C2* que está asociado a Melanoma ha sido identificado recientemente como un antígenos expresado en tejido testicular y placentario, lo cual llevo a realizar un estudio en tejido tumoral de testículo encontrando una expresión del mismo en un 94% en tumores seminomatosos, también fueron analizados los genes *SOX-2*, *KIT* y *POU5F1*. [17]

Estos antígenos también llamados CT-X son altamente expresados en testículos durante las fases tempranas de espermatogénesis, especialmente en espermatogonias y espermatocito primario pero no en espermatides. También han sido motivo de investigación los genes *MAGE-A1*, *MAGE-A2*, *MAGE-A3* Y *MAGE-A4* siendo identificados en líneas celulares germinales y hasta un 82% en seminomas. [17]

La pobre información sobre los ATC y su expresión en líneas celulares germinales de testículo, pero se han logrado analizar RNA en seminomas observando una expresión del gen *MAGE-A1*, *A3* y *A4*. Existe expresión en otras líneas celulares de los antígenos *MAGE-B1* Y *B2* específicas para seminoma, en donde describen que la expresión de estos es mayor en seminomas que en teratomas, haciendo mención interesante en la expresión de líneas de células germinales con alteración en el desarrollo y diferenciación gonadal y sub fertilidad masculina ya que representan un factor de riesgo para

tumor testicular. [18] También se encontró la expresión del gen *NY-ESO-1* y *SSX* en células testiculares espermatogonias y espermatoцитos primarios. [19]

Realizando el análisis en donde se decidió utilizar un estudio molecular con RT-PCR en muestras sanguíneas periféricas, estudio más específico en comparación con los estudios serológicos realizados a pacientes con tumor de testículo (marcadores tumorales AFP, β -hCG y DHL) diagnosticados en el servicio de Urología 105ª y analizadas en el laboratorio de biología molecular 204 del Hospital General de México O.D.; se reporto expresión de los antígenos testiculares de cáncer y se inició la observación del comportamiento de estos.

Los primeros ATC seleccionados, fueron los de la familia *MAGE-A3* y *MAGE-A4* debido a su importancia como antígenos asociados a tumor (Hofmann 2010) y a su importancia en otros cánceres y estudios realizados en tumor testicular. [18, 19]. Además de los ATC *SSX-1* por su asociación a estudios realizados en tumor testicular y *PRAME*.

El análisis de RT-PCR proporciono datos interesantes de los ATC en los pacientes con tumor de testículo, ya que a expresión de los antígenos testiculares de cáncer en sangre periférica debe ser negativa. La frecuencia de expresión en comparación con otros cánceres, es alta en algunos genes y baja para otros, siendo para *SSX-1* de 81.1% y *MAGE-A4* 50% *PRAME* 9.5% y sin expresión de *MAGE-A3* en el análisis preoperatorio y la frecuencia de expresión en pacientes posoperados de orquiectomía radical como tratamiento primario fue para *MAGE-A4* 55%, *SSX-1* 55% y *PRAME* 9.5% persistiendo sin expresión en el gen *MAGE-A3*.

Lo que permite comparar los resultados del estudio de Peter, K. Bode del 2011, donde presentaba expresión el gen *MAGE-A4* en 42 tumores testiculares en el 62 al 82% [17], en el caso contrario del *MAGE-A3* que tuvo una expresión del 17 a 42% en comparación con nuestro estudio que no hubo expresión. Sin embargo la mayor expresión es representada por *SSX-1* en 81.1% de 22 pacientes y lo más sobresaliente es que en nuestro estudio el análisis fue en sangre periférica previo a tratamiento primario con orquiectomía radical y posterior a este.

Se observo también que la co expresión de los antígenos testiculares de cáncer *MAGE-A3*, *MAGE-A4*, *SSX-1* y *PRAME* tubo una expresión positiva por lo menos en 1 gen en 4 pacientes en el preoperatorio y 6 pacientes en el posoperatorio, dos genes en 13 pacientes preoperatorios y 9 genes en el posoperatorio y finalmente tubieron una expresion más de dos genes 1 solo paciente y fue en el preoperatorio, en donde podemos deducir que el gen *SSX-1* puede ser considerado como gen de expresion en la linea celular de tumor testicular ya que se encuentra expresado en presencia de otro gen.

En el análisis estadístico se observa la expresión del gen de mayor frecuencia, *SSX-1* que esta positivo e pacientes menores de 26 años, con tumor testicular con escaso predominio de lado de afección siendo del 59% derecho, tiempo de evolución de la enfermedad 3-12 meses, marcadores serológicos tumorales S1

(AFP<1000, b-HCG<500 y DHL<1.5xN), en pacientes con actividad ganglionar retroperitoneal y sin metástasis pulmonar, etapa clínica I-II, factores de buen pronóstico, teniendo la misma tendencia en los ATC *MAGE-A4* y *PARAME*.

También en el estudio se realizó una correlación clínica de los pacientes con tumor de testículo y los ATC por medio del análisis estadístico de Chi cuadrado en el cual no se encontró significancia midiendo los diferentes parámetros de la enfermedad, sin embargo se observa una tendencia en la expresión de los antígenos testiculares de cáncer en pacientes en etapa clínica I, factores de riesgo pronóstico bueno, reporte histopatológico para tumor germinal mixto y marcadores tumorales serológicos normales o S1, lo cual podría representar que la expresión de los ATC en el paciente posoperado de orquiectomía radical con marcadores tumorales normales, etapa clínica I-II, factores de buen pronóstico y reporte histopatológico de tumor germinal mixto incluyendo seminoma puede estar cursando con enfermedad metastásica y ser candidato a tratamiento secundario, así como también realizar muestras de control sanguíneo posoperatorio tardío como control de la enfermedad con ATC como marcador molecular no específico pero sí como indicador de persistencia de la enfermedad.

CONCLUSIONES

- No existe expresión de los ATC en sangre periférica de individuos sanos.
- La línea testicular germinal expresa los antígenos testiculares.
- La frecuencia de expresión del gen *SSX-1* fue la más alta, seguida de *MAGE-A4*, *PRAME*.
- *MAGE-A3* no expresa en tumor de testículo.
- Existe coexpresión entre los antígenos testiculares de cáncer.
- Los ATC continúan con expresión posterior al primer tratamiento quirúrgico con orquiectomía radical.
- Los ATC presentan expresión posterior a orquiectomía radical en pacientes en etapa clínica I-II.
- El gen *SSX-1* puede ser añadido como un marcador molecular en esta patología.
- Debe tomarse una muestra sanguínea más tardía como control de la enfermedad y ser analizada por RT-PCR con la posible finalidad de disminuir recidiva de la enfermedad.
- Este es el primer análisis nacional de *SSX-1* y *MAGE-A4* en tumor testicular, el cual nos sugiere agregarlos como marcadores sensitivos de la enfermedad.

PERSPECTIVAS:

- Como objetivo a corto plazo, continuar con este trabajo y aumentar el número de la muestra.
- Continuar la vigilancia del paciente estudiado con control sanguíneos periféricos.
- Analizar los ATC incluidos en el estudio a nivel cuantitativo utilizando PCR en tiempo real (qRT-PCR), con la finalidad de determinar enfermedad mínima residual
- Agregar algún ATC al estudio como *MAGE-C2* y *NY-ESO-1*

PALABRAS CLAVE:

Cáncer de testículo
Antígenos Testiculares de Cáncer
Marcadores Tumorales.
MAGE, *SSX-1*, *PRAME*



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN MÉDICA

Título del protocolo: "Análisis de la expresión de los Antígenos Testiculares de Cáncer *MAGE-A3*, *MAGE-A4*, *SSX-1* y *PRAME*, en sangre periférica de pacientes con Tumor de Testículo "

Investigador principal: Dr. Adolfo Martínez Tovar.

Coordinador de la Investigación: Dr. José Fernando Gil García.

Investigador Asociado: Dr. Hugo Manzanilla García.

Sede donde se realizará el estudio: Hospital General de México, O.D.

Nombre del paciente: _____

Expediente:

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO. Este estudio se realiza debido a que deseamos saber si existe una expresión molecular de los Antígenos Testiculares de Cáncer *MAGE-A3*, *MAGE-A4*, *SSX-1* y *PRAME*, en sangre periférica de pacientes con Tumor de Testículo y realizar con estos el diagnóstico y relación clínica de la enfermedad. Esto beneficiara en el futuro a pacientes que como Ud. Diagnosticados con esta enfermedad.

OBJETIVO DEL ESTUDIO

A usted se le está invitando a participar en un estudio de investigación que tiene como objetivos:

- Analizar la expresión a nivel de RNA de los Antígenos Testiculares de Cáncer *MAGE-A3*, *MAGE-A4*, *SSX-1*, *PRAME*, en sangre periférica preoperatoria y posoperatoria de pacientes con diagnóstico de Tumor de Testículo.
- Realizar una correlación clínica entre la expresión de los Antígenos Testiculares de Cáncer *MAGE-A3*, *MAGE-A4*, *SSX-1*, *PRAME* en pacientes con diagnóstico de Tumor de Testículo.

BENEFICIOS DEL ESTUDIO

- Conocer la expresión de los Antígenos Testiculares de Cáncer *MAGE-A3*, *MAGE-A4*, *SSX-1*, *PRAME*, en sangre periférica en pacientes con diagnóstico de Tumor de Testículo y realizar una correlación clínica.

Este estudio permitirá que en un futuro otros pacientes puedan beneficiarse del conocimiento obtenido al analizar los resultados.

PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

En caso de aceptar participar en el estudio se le realizarán algunas preguntas sobre usted, sus hábitos y sus antecedentes médicos, se le tomaran muestras sanguíneas preoperatorias para completar el protocolo básico para el tratamiento primario (orquiectomía Radical) y se le pedirá que regrese a revisión médica posoperatoria y toma de muestras sanguíneas de control bioquímico para estadificación de la enfermedad, se realizara resumen clínico y referencia a Oncología Médica.

RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO

Aunque pueden existir riesgos impredecibles que escapan al conocimiento del investigador, no existe ningún riesgo ya que los estudios de rutina que se realizaran serán trabajados con tejidos del paciente (muestra sanguínea). En caso de que usted desarrolle algún efecto adverso secundario o requiera otro tipo de atención, ésta se le brindará en los términos que siempre se le ha ofrecido.

ACLARACIONES

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.
- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, y su decisión será respetada íntegramente.
- No recibirá pago por su participación.
- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador responsable, **Dr. Adolfo Martínez Tovar**, así como a los **Drs. Hugo Manzanilla García y José Fernando Gil García** al 55-34-955-933 y o a la Comisión de Ética encabezada por la **Dra. Hilda Hidalgo Loperena** al tel. 2789-20-00 ext. 1368.
- La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.
- En caso de que usted desarrolle algún efecto adverso secundario no previsto, tiene derecho a una indemnización, siempre que estos efectos sean consecuencia de su participación en el estudio.

Fecha:

Dr. Adolfo Martínez Tovar
 Dr. Balmis 148 Col. Doctores
 México, D.F.
 Tel. 27892000
 Investigador Principal

 Nombre del paciente
 Domicilio:
 Tel:

 Nombre del Testigo
 Relación con el paciente:
 Domicilio:
 Tel.

 Nombre del testigo
 Relación con el paciente:
 Domicilio:
 Tel.

BIBLIOGRAFÍA

1. P.Albers, W. Albercht, F. Algaba, C. Bokemeyer, G. Cohn-Cedemark, K.Fizazi, A. Horwich, M.P. Laguna; Guidelines on Testicular Cancer. European Association of Urology (2012): 1-56.
2. Flores N. G., Huerta G, Saucedo.S, Consuelo. A, Nolazcos. R, Ayala. H, Diagnóstico y Tratamiento del Tumor Maligno del Testículo en todas las Edades, Guía de Práctica Clínica del Sistema Nacional de Salud. (2011),1-45
3. Carballido. R, Franco. C, Gausa. Gascon, Robles. García, Sánchez. Ch., Server. Pastor, Zuloaga. G, Libro del Residente de Urología, (2007) 563-590.
4. Albala. M, F. Morey, G. Gomella, P. Stein. Practical Advice on Management of Common Urological Symptoms and disorders.Oxford University Press, Inc. 294-309.
5. Bost. G, Motzer. R, Testicular Germ Cell Cancer. New England Journal of Medicine(Nov,1997) 242-253
6. Kuczyk. MA, Serth. J, Bokemeyer. C, Jonassen. J, Machtens. S, Werner. M, Jonas. U, Alterations of the p53 Tumor Supresor Gene in Carcinoma in Situ of the Testis Cancer. (Nov 1996); 78(9); 1958-1966.
7. Looijenga. Lh, Gillis. AJ, Stoop. H, Hermus. R, Oosterhuis. JW; Relevance of Micro RNAs in Normal and Malignant Development, Including Human Testicular Germ Cells Tumor. Int. J. Androl (Aug-2007); 304-314.
8. WHO Histological Classification of Testis Tumours, In: Epstein. JL, Sesterhenn. IA, Eble. UN, Sauter. G; Pathology and Genetics Tumours of the Urinary Sistem and Male Genital Organs Lyons, IARC., (2004) 250-262
9. Guy. L, Védrine. N, Exploración Clínica y Laboratorio del Testiculo;(2008) Elsevier Masson, SAS. E-18-601-613.
10. Ultrasound of the Nonacute Scrotum, In: Raymond. HW et.al. Semonars in Ultrasound, CT and MRI, NY: NB Saunders (1991) 131-156.
11. Jhonson. JO, Mattren. RF, Phillipson J. Diferentiation of Seminomatous from no Seminomatous Testicular Tumours With MR Imaging; AJR. Am.J Roet Genol (1990), 154, 539-543.
12. Klein. EA, Tumour Markers in Testis Cancer. Urol. Clin. North Am. (Feb, 1993); 20(1), 67-73.
13. Javadpour. N, The Role of Biologic Markers in Testicular Cancer, (Apr-1980), 45, 1755-1761.
14. J. Motzer, Neeraj. A, Clair. B, Sam. B, Bolger,B, Buyyououski. M, NCCN, Clinical Practice Guidelines in Oncology, Inc (2012) 1-55.
15. Fratta. E, Coral. S, Covre. A, Parisi. G, Colizzi. F, Danielli. R, Hugues.JM, Sigalotti. L, Maio. M; The biology of cancer testis antigens: Putative function, regulation and therapeutic potential. Molecular Oncology;(Feb-2011); 164-182.
16. Linley AJ, Ahmad M, Rees RC. Tumour-associated antigens: considerations for their use in tumour immunotherapy. Int J Hematol. 2011, 93, 263-73.
17. K. Bode, Barghorn. A, Fritzsche. F, Riener. M, Kristiansen. G, Knuth. A, Moch. H; MAGEC2 is a Sensitive and Novel Marker for Seminoma: a Tissue Microrray Analysis of 325 Testicular Germ Cells Tumors. Modern Pathology. (2011); 829-835
18. Yuasa. T, Okamoto. K, Kawakami. T, Mishina. M, Ogawa. O, Okada.Y; Expression Patterns of Cancer Testis Antigens in Testicular Germ Cell Tumors and Adjacent Testicular Tissue; (May-2011); Vol 175, 1790-1794.

19. Pascale. S, Rajpert. E, C. Spagnoli, Hennes. S, Olivo. L, Krag. J, Rioux-Leclercq. N, Jegou. B, Samson. M; The Cancer-Testis Gene, NY-ESO-1, is Expressed in Normal Fetal and Adult Testes and Spermatocytic Seminomas and Testicular Carcinoma In Situ. *Laboratory Investigation*. (Jun-2002) Vol. 82, (6) 775-780.
20. Costa. F, Le Blanc. K, Brodin. B; Concise Review: Cancer/Testis Antigens, Stem Cells, and Cancer. *Stem Cells* (2007) (25), 707-711.
21. Yang B, O'Herrin S, Wu J. Select cancer testis antigens of the MAGE-A, -B and -C families are expressed in mast cell lines and promote cell viability *in vitro* and *in vivo*. *J invest Dermatol* 2007, 127, 267-275
22. Schultz E. S, Lethé B, Cambiaso C, Van Snick J, Chaux P, Corthals J, Heirman C, Rhiemans K, Boon T, van der Bruggen P. A MAGE Peptide Presented by HLA-DP4 Is Recognized on Tumor Cells by CD4+ Cytolytic T Lymphocytes. *CancerResearch*. 60 (2002):6272-6275.
23. Arrieta.O, Michel.R, Angeles.J, Villareal.C, Aviléz. A, Chanona. J, Arechaga. E, Luévano.A, Jimenez.M, Aguilar.J Serum human chorionic gonadotropin in associated with angiogenesis in germ cell testicular tumors. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. Biomed Central, July,2009, 1-17.
24. Wein. Kavoussi, Novik, Partin, Peters. *Campbell Walsh Urology*, 9a Ed. Genitales Masculinos Fisiología Reproductiva Masculina , Neoplasias Testiculares P:577-607, 893-957