



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

Detección de antígenos testiculares de cáncer *MAGE-A3/A6*, *MAGEA4*, *MAGE-B2*, *MAGE-C1/CT7*, *NY-ESO-1*, *LAGE-1* y *GAGE* en linfoma y su correlación clínico-pronóstico en la evolución de la enfermedad.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. IRMA OLARTE CARRILLO

DIRECTOR DE TESIS: DR. ENRIQUE ISABEL MIRANDA PERALTA

COMITÉ TUTORAL: DRA. GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZALEZ

DRA. LAILA GUTIERREZ KOBEH

MÉXICO, D. F.

SEPTIEMBRE, 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 18 de junio de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **OLARTE CARRILLO IRMA** con número de cuenta **92347001** con la tesis titulada: **"DETECCIÓN DE ANTÍGENOS TESTICULARES DE CÁNCER MAGE-A3/A6, MAGEA4, MAGE-B2, MAGE-C1/CT7, NY-ESO-1, LAGE-1 Y GAGE EN LINFOMA Y SU CORRELACIÓN CLÍNICO-PRONÓSTICO EN LA EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD"**. realizada bajo la dirección del: DR. ENRIQUE ISABEL MIRANDA PERALTA

Presidente:	DRA.	MARÍA ISABEL SOTO CRUZ
Vocal:	DR.	HÉCTOR MAYANI VIVEROS
Secretario:	DRA.	LAILA GUTIÉRREZ KOBEH
Suplente:	DR.	ALEJANDRO GARCÍA CARRANCÁ
Suplente:	DRA.	GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZÁLEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 16 de agosto de 2012



DRA. MARIA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas UNAM por la formación académica recibida

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología "CONACYT" durante la realización de la tesis goce la beca por cual hago patente mi agradecimiento

Al comité tutorial formando por el Dr. Enrique Miranda Peralta, la Dra. Laila Gutiérrez Kobeh y la Dra. Gladis Fragoso González por sus sugerencias y su apoyo durante el desarrollo del proyecto.

Al Jurado para el examen de grado conformado por: Dra. María Isabel Soto Cruz, Dr. Héctor Mayani Viveros, Dra. Laila Gutiérrez Kobeh, Dr. Alejandro García Carranca y la Dra. Gladis del Carmen Fragoso González por todos sus comentarios y propuestas para mejorar el trabajo de tesis.

Al Dr. Enrique Miranda Peralta que ha sido un gran ejemplo ya que con todas su enseñanzas a contribuido a mi formación académica.

A la Coordinación del Posgrado en Ciencias Biológicas y a la Entidad de la Facultad de Medicina en especial a Erika Rodríguez Reyes, Ernesto Armando Rodríguez Reyes, Patricia Oliva Estrella, Lilia Jiménez Solís

Al Dr. Adolfo Martínez Tovar por su gran apoyo a lo largo de mi formación académica, así como sus consejos, por su paciencia y sobre todo por su amistad.

Deseo agradecer al Dr. Efraín Garrido Guerrero y al Biol. Pedro Chávez Olmos del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV por sus consejos y aportaciones al proyecto.

A los integrantes del Laboratorio de Biología Molecular, Iveth, Carmen, Irlanda, Alejandro, Aline, Lupita, Brenda por su alegría, apoyo pero sobre todo por su cariño.

A Jorge Zamora Domínguez por su buen humor y gran compañerismo

Al Servicio de Hematología, en especial al brillante grupo de Hematólogos, Dr. Cristhian Ramos Peñafiel, Dr. Mario Gutiérrez Romero, Dra. Etta Rozen Fuller, Dr. Juan Julio Kassac y al Dr. Juan Collazo Jaloma

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Biología Molecular U-204 del Hospital General de México O.D., Secretaría de Salud, bajo la dirección del Dr. Enrique Isabel Miranda Peralta y la supervisión del comité tutorial conformado por la Dra. Laila Gutiérrez Kobeh y la Dra. Gladis del Carmen Fragoso González

Este trabajo fue apoyado por CONACYT con el número de proyecto 40895-M y 80085 así como por la Dirección de Investigación del HGM con los números de registro DI/08/204/04/017 y DI/12/204/05/01

I. Índice

I. ÍNDICE	I
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	V
II. RESUMEN	VI
III. ABSTRACT	VII
IV. ABREVIATURAS	VIII

1. INTRODUCCIÓN **1**

1. ANTÍGENOS TESTICULARES DE CÁNCER (CTA)	1
1.1. CLASIFICACIÓN DE LOS CTA	1
1.2. GENES MAGE	2
1.2.1. FAMILIA <i>MAGE A</i>	2
1.2.2. FAMILIA <i>MAGE B</i>	3
1.2.3. FAMILIA <i>MAGE C</i>	3
1.2.4. PROTEÍNAS <i>MAGE</i>	3
1.3. CONTROL DE LA EXPRESIÓN DE LOS CTA	4
1.4. FUNCIÓN DE LOS GENES CTA	7
1.4.1. FUNCIÓN DE LOS CTA EN CÉLULAS NORMALES	7
1.4.2. FUNCIÓN DE LOS CTA EN CÉLULAS TUMORALES	8
1.5. IMPORTANCIA CLÍNICA DE LOS CTA	11
1.5.1. IMPLICACIÓN DE LOS CTA EN LA HEMATOLOGÍA	13
2. LINFOMA	15
2.1. INCIDENCIA DEL LINFOMA A NIVEL MUNDIAL	16
2.1.1. INCIDENCIA DEL LINFOMA EN MÉXICO	17
2.2. FACTORES DE RIESGO DE LOS LINFOMAS	18
2.3. ORIGEN Y DIVERSIDADES EN LOS LINFOMAS	19
2.4. CLASIFICACIÓN DE LOS LINFOMAS	22
2.5. LINFOMA NO HODGKIN	23
2.5.1. VARIEDADES HISTOLÓGICAS DEL LNH	25
2.5.2. CLÍNICA DEL LNH	27
2.5.2.1. MANIFESTACIONES CLÍNICAS	27
2.5.2.2. DIAGNÓSTICO	27
2.5.3. FACTORES PRONÓSTICO	27
2.5.3.1. ESTADIO CLÍNICO	28
2.5.3.2. ESTADO FUNCIONAL (ECOG)	29
2.5.3.3. ÍNDICE INTERNACIONAL DE PRONÓSTICO (IPI)	29
2.6. LINFOMA DE HODGKIN	31
2.6.1. EVOLUCIÓN CLÍNICA DEL LH	33
2.7. TRATAMIENTO DEL LINFOMA	34

2. JUSTIFICACIÓN **36**

3. HIPÓTESIS	37
4. OBJETIVO	37
4.1. GENERAL	37
4.2. ESPECÍFICOS	37
5. DISEÑO EXPERIMENTAL	38
5.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN	38
5.2. CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN	38
5.3. CRITERIOS DE ELIMINACIÓN	38
5.4. VARIABLES	38
5.5. TAMAÑO DE LA MUESTRA.	38
6. METODOLOGÍA	39
6.1. MATERIAL BIOLÓGICO	39
6.1.1. TEJIDO DE PACIENTES CON LINFOMA	39
6.1.2. CÉLULAS DE DONADORES SANOS	39
6.1.3. TEJIDO TESTICULAR NORMAL	39
6.1.4. LÍNEAS CELULARES	40
6.2. SEPARACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES	40
6.3. EXTRACCIÓN DE RNA	40
6.3.1. AISLAMIENTO DEL RNA TOTAL EN CÉLULAS MONONUCLEADAS Y LÍNEAS CELULARES	40
6.3.2. AISLAMIENTO DE RNA TOTAL DE TEJIDOS	41
6.3.3. INTEGRIDAD Y CUANTIFICACIÓN DEL RNA	41
6.4. PCR EN PUNTO FINAL	42
6.5. SECUENCIACIÓN DE LOS CTA	43
6.6. qRT-PCR	43
6.7. SEGUIMIENTO CLÍNICO DE LOS PACIENTES	43
6.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	43
6.9. DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA <i>MAGE</i>	44
6.9.1. INMUNOHISTOQUÍMICA	44
6.9.2. WESTERN-BLOT	45
6.9.2.1. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	45
6.9.2.2. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA	45
6.9.2.3. TRANSFERENCIA	46
6.9.2.4. DETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS	46
7. RESULTADOS	47
7.1. EXPRESIÓN DE CTA A NIVEL DE MRNA EN TEJIDO TESTICULAR	47
7.2. EXPRESIÓN DE LOS GENES CTA A NIVEL DE MRNA EN LÍNEAS CELULARES HEMATOPOYÉTICAS	48
7.3. EXPRESIÓN DE LOS GENES CTA A NIVEL DE MRNA EN DONADORES SANOS	49

7.4. CARACTERIZACIÓN DE LA MUESTRA DE ESTUDIO	49
7.5. EXPRESIÓN DE LOS GENES CTA A NIVEL DE MRNA EN PACIENTES CON LINFOMA	52
7.6. EXPRESIÓN DE GENES CTA LAS VARIEDADES HISTOLÓGICAS DEL LINFOMA	52
7.7. EXPRESIÓN DEL GEN <i>MAGE A3</i> EN LDCGB	56
7.7.1. ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL GEN <i>MAGE A3</i>	57
7.7.2. ANÁLISIS DE LA PROTEÍNA <i>MAGE</i>	57
7.7.3. DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA POR WESTERN BLOT	59
7.7.4. ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO DE LA PROTEÍNA <i>MAGE</i>	60
7.7.5. CORRELACIÓN ENTRE FACTORES CLÍNICO- PRONÓSTICOS Y EL GEN <i>MAGE A3</i>	60
7.7.6. ANÁLISIS DE SOBREVIDA EN RELACIÓN AL GEN <i>MAGE A3</i>	62
7.8. EXPRESIÓN DE <i>NY-ESO1</i> EN LINFOMA DIFUSO DE CÉLULAS GRANDES B	63
7.8.1. CORRELACIÓN CLÍNICA DE <i>NY-ESO1</i> Y FACTORES CLÍNICOS EN LDCGB	64
7.8.2. ANÁLISIS DE SOBREVIDA EN LDCGB Y LA EXPRESIÓN DE <i>NY-ESO1</i>	66
7.9. FRECUENCIA DE COEXPRESIÓN DE LOS CTA EN LINFOMA	67
7.9.1. FRECUENCIA COEXPRESIÓN DE LOS CTA EN LDCGB	69
7.9.2. RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CTA Y LA SOBREVIDA EN PACIENTES CON LDCGB	69
7.9.3. CORRELACIÓN CLÍNICA DE LOS CTA Y FACTORES CLÍNICOS EN LDCGB	72
7.9.4. CO-EXPRESIÓN DE LOS CTA Y SU IMPACTO EN LA SOBREVIDA EN LDCGB	73
8. DISCUSIÓN	74
9. CONCLUSIONES	82
10. PERSPECTIVAS	83
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
12. ANEXO	97
SECUENCIAS DE PRIMERS	97
ELECTROFEROGRAMA DE LOS CTA	98

Índice de Figuras

<i>Figura 1. Dominios estructurales de las proteínas MAGE</i>	4
<i>Figura 2. Control de la expresión de los CTA</i>	5
<i>Figura 3. Participación del gen MAGE A3 en la inhibición de la apoptosis</i>	9
<i>Figura 4. MAGE A4 en la inhibición de la apoptosis</i>	10
<i>Figura 5. Linfoma en adultos en estadio clínico avanzado</i>	15
<i>Figura 6. Incidencia de cáncer a nivel mundial</i>	16
<i>Figura 7. Mortalidad en neoplasias hematológicas por grupos de edad</i>	17
<i>Figura 8. Linfopoyesis y las variantes de linfoma.</i>	21
<i>Figura 9. Variedades del LNH</i>	26
<i>Figura 10. Linfoma de Hodgkin</i>	31
<i>Figura 11. Expresión de genes CTA en tejido testicular</i>	47
<i>Figura 12. Ausencia de expresión de genes CTA en donadores sanos.</i>	49
<i>Figura 13. Expresión del mRNA de MAGE A3 en pacientes con LDCGB.</i>	56
<i>Figura 14. Relación directa entre la expresión del gen MAGE A3 y las etapas de la enfermedad</i>	57
<i>Figura 15. Inmunodetección de la proteína MAGE en LNH</i>	58
<i>Figura 16. Presencia de la proteína MAGE en pacientes con LDCGB en diferentes estadios clínicos</i>	59
<i>Figura 17. Aumento en la expresión de la proteína MAGE en los diversos estadios clínicos de LDCGB</i>	60
<i>Figura 18. Análisis de supervivencia en relación a MAGE A3.</i>	62
<i>Figura 19. Relación entre los niveles de expresión de NY-ESO y el estadio clínico</i>	63
<i>Figura 20. Análisis de sobrevida en relación NY-ESO1</i>	66
<i>Figura 21. Porcentaje de genes CTA co-expresados en linfoma.</i>	67
<i>Figura 22. Porcentaje de co-expresión de los CTA en LDCGB.</i>	68
<i>Figura 23. Análisis de sobrevida de los genes MAGE en pacientes con LDCGB</i>	70
<i>Figura 24. Análisis de sobrevida de los genes CTA en pacientes LDCGB</i>	71
<i>Figura 25. Presencia de CTA como factor de mal pronóstico</i>	73

Índice de tablas

<i>Tabla 1. Familias y localización cromosómica de los CTA</i>	2
<i>Tabla 2. Los CTA en diversos tipos de cánceres</i>	12
<i>Tabla 3. Clasificación de las enfermedades neoplásicas maduras de origen linfoide (OMS, 2008)</i>	22
<i>Tabla 4. Clasificación clínica de LNH</i>	24
<i>Tabla 5. Algunas variedades del LNH</i>	25
<i>Tabla 6. Estadios clínicos de los Linfomas</i>	28
<i>Tabla 7. Estado de la actividad de los pacientes con cáncer de acuerdo a la escala ECOG</i>	29
<i>Tabla 8. Índice Internacional de pronóstico para LNH</i>	30
<i>Tabla 9. Sobrevida según el IPI</i>	30
<i>Tabla 10. Clasificación histopatológica de la enfermedad de Hodgkin (OMS 1997)</i>	32
<i>Tabla 11. Tratamiento farmacológico en linfoma</i>	34
<i>Tabla 11. Condiciones de amplificación de los genes CTA</i>	42
<i>Tabla 12. Condiciones de utilización de los anticuerpos</i>	46
<i>Tabla 13. Expresión de los CTA en líneas celulares</i>	48
<i>Tabla 14. Pacientes incluidos en el estudio para el análisis de los genes CTA</i>	51
<i>Tabla 15. Expresión de los genes CTA a nivel de mRNA en pacientes con linfoma</i>	52
<i>Tabla 16. Expresión de los CTA en pacientes con linfoma del HGM</i>	53
<i>Tabla 17. Correlación entre la expresión de MAGE A3 y factores clínico-pronósticos en LDCGB</i>	61
<i>Tabla 18. Correlación entre la expresión del gen NY-ESO1 y factores clínico-pronósticos en pacientes con LDCGB</i>	65
<i>Tabla 19. Frecuencia de coexpresión de CTA en Linfoma</i>	67
<i>Tabla 20. Frecuencia de coexpresión de CTA en LDCGB</i>	68
<i>Tabla 21. Asociación los genes CTA en LDCGB</i>	69
<i>Tabla 22. Correlación clínica entre MAGE A4, MAGE B2 y GAGE</i>	72

II. Resumen

Los antígenos testiculares de cáncer (CTA) han sido utilizados como biomarcadores tumorales. Se ha descrito que pueden estar implicados en la progresión tumoral y que aquellos pacientes que los expresan tienen una menor supervivencia. Lo anterior ha sido corroborado en cáncer de pulmón, melanoma, mieloma entre otros, sin embargo, en linfomas no se conoce aun la relevancia clínica y pronóstica. En este trabajo se incluyeron en el estudio 69 muestras de pacientes con linfoma y se analizó la expresión por qRT-PCR de los genes *MAGE-A3/A6*, *MAGEA4*, *MAGE-B2*, *MAGE-C1/CT7*, *NY-ESO1*, *LAGE-1* y *GAGE* y su correlación con parámetros clínicos y con la supervivencia. La variedad histológica de mayor frecuencia correspondió al LDCGB (linfoma difuso de células grandes B) con un 40.5% del total de linfomas. La frecuencia de expresión de cada CTA para todos los tipos de linfoma estudiados fueron: el gen *MAGE A3* con 44.9% (31/69), seguido de *NY-ESO1* con un 33.3% (23/69); *MAGE A4*, *MAGE B2* y *LAGE* que mostraron 27%, 21% y 20% respectivamente. Los genes *GAGE*, *BAGE* y *MAGE C1* tuvieron frecuencias menores al 20%. La correlación clínica-pronóstica se realizó con el gen *MAGE A3* y *NY-ESO1* en la variedad de LDCGB con 28 pacientes, éstos fueron tratados con ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona (CHOP), ninguno de estos pacientes recibió rituximab. Se encontró una correlación entre los niveles de expresión del gen a nivel de mRNA y el estadio clínico, niveles de LDH, e IPI. La supervivencia global a 3 años fue del 36.4% para pacientes positivos para *MAGE-A3* y del 82.4% en los pacientes negativos. En el caso del gen *NY-ESO1* fue del 23.1% para pacientes positivos y de 66.46% en los pacientes negativos, observando significancia estadística en ambos genes ($p \leq 0.05$). La presencia de los genes *MAGE A3* y *NY-ESO1* confiere al paciente una menor supervivencia. En LDCGB el 49.98% presentaron coexpresión; de ellos *NY-ESO1* se encontró presente en todos los casos. En el análisis de supervivencia se encontró que los pacientes que no tenían expresión de ningún CTA presentaron una media de 1175 días, mientras que los que expresaron 1 gen 977 días y los que tuvieron coexpresión 780 días ($p=0.016$). En este estudio se demostró la presencia de los CTA en linfoma, siendo los genes *MAGE A3* y *NY-ESO1* los de mayor frecuencia; además en LDCGB ambos genes presentan correlación con factores clínicos importantes como el IPI (Índice pronóstico internacional), estadio clínico y Lactato deshidrogenasa láctica (LDH) corroborando su importancia en la progresión de la enfermedad y en una menor supervivencia, demostrando que podrían ser utilizados como marcadores de mal pronóstico conjuntamente con otros CTA por la coexpresión encontrada y por su impacto en la supervivencia en este tipo de neoplasia.

III. Abstract

The cancer/testis antigens (CTA) have been used as tumor markers in different kinds of cancer. In other works it has been reported that these genes can be involved in tumor progression and that those patients who express them have a lower survival rate. This has been confirmed in different types of cancer such as: multiple myeloma, melanoma and lung cancer. However in lymphomas the clinical and prognostic relevance are unknown. In this work we analyzed the expression of *MAGE-A3/A6*, *MAGE-A4*, *MAGE-B2*, *MAGE-C1/CT7*, *NY-ESO1*, *LAGE-1* y *GAGE* genes by qRT-PCR and their possible relationship with clinical parameters and survival rate in patients with lymphoma. In this study 69 samples of patients with this disease were included. The most frequent histological type was DLBCL (Diffuse Large B-Cell Lymphoma) with 40.5% of all lymphomas. The expression frequencies of each CTA for all types of lymphomas were: *MAGE-A3* gene with 44.9% (31/69) followed by *NY-ESO1* with 33.3% (23/69); *MAGE-A4*, *MAGE-B2* and *LAGE* genes showed 27%, 21% and 20% respectively. The *GAGE*, *BAGE* and *MAGE-C1* showed frequencies less than 19.9%, 13% and 7.2% respectively. The clinical/prognostic relationship was done in 28 patients with DLBCL. They were treated with CHOP (Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone). However none of these patients received Rituximab therapy. We found a relationship between the *MAGE-A3* gene expression at mRNA level and the clinical stage, LDH levels and IPI. The overall survival rate at 3 years was 36.4% for positive *MAGE-A3* patients and 82.4% for negative patients. In the case of *NY-ESO1* gene was 23.1% for positive patients and 66.46% for negative patients showing statistical significance in both genes ($p < 0.005$). The presence of *MAGE-A3* and *NY-ESO1* genes gives a shorter survival rate to the patients compared with negative patients. We found genes co-expression in 49.98% of patients with DLBCL. In those patients *NY-ESO1* was present in all cases. In the survival analysis we found that patients without expression of any CTA showed a mean of 1175 days, while those that expressed one gen (977 days) and those that showed genes co-expression (780 days) with significant differences ($p = 0.016$). This study showed the presence of CTA in lymphoma being *MAGE-A3* and *NY-ESO1* genes those with higher frequency. In addition, in DLBCL both genes had relationship with important clinical factors, such as: IPI, disease stage and LDH confirming its importance in disease progression and a lower survival rate, showing that CTA could be used as poor prognostic markers together with other CTA considering the co-expression that was found and its impact on the survival rate in this neoplasm type.

IV. Abreviaturas

CTA	Cancer testis antigens
cDNA	Ácido desoxiribonucleico complementario
CPH	Complejo Principal de Histocompatibilidad
CTL	Linfocito T citotóxico
DEPC	dietilpirocarbonato
dNTP	desoxinucleotido trifosfato
EC	Estadio clínico
EDTA	Ácido etildiaminotetrácetico
KDa	Kilodaltones
LH	Linfoma de Hodgkin
LLCP	Linfoma de linfocitos pequeños
LDCGB	Linfoma difuso de células grandes b
LNH	Linfoma no Hodgkin
MAGE	Antígenos asociados a melanoma
$\mu\gamma$	Microgramos
$\mu\lambda$	Microlitros
μM	Micromoles
mRNA	Acido ribonucleico mensajero
pb	Pares de bases
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
RS	Célula de Reed-Sternberg
qRT-PCR	Quantitative- Reverse transcription polymerase chain reaction
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SLE	Sobrevida libre de enfermedad
TNF	Factor de Necrosis tumoral
VEB	Virus de Epstein-Barr

1. Introducción

1. Antígenos Testiculares de Cáncer (CTA)

El término CTA (cancer testis antigens) fue utilizado por primera vez en 1997, se refiere a un grupo de genes que codifican para antígenos reconocidos por los linfocitos T citotóxicos (CTL) y que se expresan en diversos tumores de diferentes orígenes histológicos (1,2). Los CTA están ausentes en células somáticas normales en humanos y se expresan solo en las células germinales masculinas tales como espermatogonias y espermatoцитos así como en células germinales fetales femeninas como ovogonias, ovocitos, trofoblastos y placenta éstas células carecen de MHC por lo que no son reconocidos por los CTL (3,4). Se sabe también que algunos CTA se expresan en células “stem cells” humanas del embrión y al diferenciarse su expresión se apaga, lo que sugiere una gran importancia en el desarrollo embrionario (5,6). Estos genes están considerados como moléculas blanco para vacunas contra el cáncer (7-10).

Los CTA comprenden 70 familias de genes, entre las que se encuentran *MAGE (melanoma antigen)*, *BAGE (melanoma antigen B)*, *GAGE (antigen G)*, *NY-ESO (melanoma antigen IB)*, *LAGE (antigen L)* etc. Cada una de ellas contiene múltiples miembros por ejemplo la familia *MAGE* contiene las subfamilias A,B,C y cada una contiene a diversos genes o miembros como A1, A2,A3, A4,A6,A7,A8, A10, A11 y A12. En total se han reportado 140 transcritos descritos en diferentes tumores y algunos de ellos son inmunogénicos (11,12).

1.1. Clasificación de los CTA

De forma general los CTA se dividen en dos grupos los que están localizados en el cromosoma X y los que no lo están, ubicándose en los cromosomas 1,6,22 etc. Alrededor del 50% de los CTA están localizados en el cromosoma X y se ha descrito que alrededor del 10% de todos los genes del cromosoma X corresponden a CTA (Tabla 1). Los CTA que no están en el cromosoma X están distribuidos en todo el genoma (13,14)

Tabla 1. Familias y localización cromosómica de los CTA

Familia	Miembros	Localización cromosómica
CTA -X		
MAGE A	<i>MAGE A1-A6</i> <i>MAGEA8-A12</i>	Xq 28
MAGE B	<i>MAGE B1-B4</i> <i>MAGE B5-B6</i>	Xp21.3 Xp22
MAGE C	<i>MAGE C1/CT7</i> <i>MAGE C2/CT10</i>	Xq26 Xq27
GAGE	<i>GAGE-1- GAGE-8</i> <i>PAGE-1-PAGE-4</i> <i>XAGE-1-XAGE-3</i>	Xp11.2-p11.4 Xp11.23
NY-ESO1	<i>LAGE-1</i> <i>NY-ESO1</i>	Xq28 Xq28
SSX	<i>SSX-1-SSX-5</i>	Xp11.2
CTA N-X		
BAGE	<i>BAGE</i>	21p11.1
SCP-1	<i>SCP-1</i> <i>(HOM-TES-14)</i>	1p13
PRAME	<i>PRAME</i>	22q11.2-q12
HAGE	<i>HAGE</i>	6q12-q13

* Old LJ, 2001. Scalán MJ, 2004

1.2. Genes MAGE

Los genes de la familia *MAGE* fueron los primeros CTA aislados en la línea celular MZ2-MEL de la que deriva el nombre de *MAGE* (melanoma antígeno). Al igual que los CTA se dividen en dos grupos, los presentes en el cromosoma X de los cuales se encuentran descritos las familias A, B y C y los genes de la familia *MAGE* que no están presentes en el cromosoma X que se encuentran en otros tejidos, pero solo a nivel génico.

1.2.1. Familia MAGE A

La familia *MAGE A* comparte una identidad del 60-98% en su secuencia codificante, tiene un tamaño génico de 3.5 Kb, presenta tres exones y los mensajeros son de aproximadamente de 1.7Kb, codifican para proteínas de 300 a 370 aminoácidos con un peso molecular de 46 kDa (15). Se localiza en el cromosoma X (Xq28). Esta familia consta de 12 miembros *A1-A12* y en la mayoría de los tumores solo se ha detectado expresión de *MAGE A1, A2, A3, A4, A6 y A12*. Se ha detectado en niveles bajos *A11, A10, A5, A8, A9*, a excepción de *MAGE A7*, que al parecer es un

pseudogen (16,17). La habilidad para presentar epitopes reconocidos por los linfocitos T citotóxicos está descrita para los genes *MAGE A1* (17), *MAGE A2* (18), *MAGE A3* (19-21), *MAGE A4* (22), *MAGE A6*, *MAGE A10* y *MAGE A12* (23-26).

1.2.2. Familia MAGE B

En la región Xp21.3 se localiza el segundo grupo o familia *MAGE-B* que comprende 6 genes (*MAGE B1*, *B2*, *B3*, *B4*, *B5*, *B6*). Esta familia de genes presenta 4 exones y comparte homología de alrededor del 65% con el *MAGE A* (27,28). Las proteínas de esta familia están formadas por 313 y 347 aminoácidos con una región ORF (open reading frame) en el último exón. El nivel de expresión de los genes *B3* y *B4* no es suficiente para generar péptidos inmunogénicos, a diferencia de los genes *B1*, *B2*, *B5*, *B6* que pueden generar respuestas inmunes. El gen *MAGE B2* fue aislado en pacientes con lupus eritematoso y de esta familia es el que tiene alrededor del 30% en varios tipos de cáncer (29).

1.2.3. Familia MAGE C

Los tres miembros de la familia *MAGE C* se localizan en la región Xq26-q27, a diferencia de las familias *MAGE A* y *B* que tienen 3 y 4 exones respectivamente, *MAGE C1* tiene 14 exones y 11 de éstos codifican para la proteína *MAGE C1* (15,16). En la región amino terminal presenta una región de 867 aminoácidos compuestos por regiones en tándem y 53% de todos los residuos de aminoácidos son regiones ricas en serina, prolina y glutamina. Esta región es de gran importancia en la inmunoterapia debido a que se generan péptidos que se unen al HLA clase I (29,30).

1.2.4. Proteínas MAGE

Las proteínas *MAGE A*, *B* y *C* presentan 3 dominios: d1 la parte amino terminal, d2 o dominio central muy conservado que contiene de 176-180 residuos de aminoácidos y tiene una homología entre todas las proteínas *MAGE* en un 60% y el dominio d3 que está ubicado en la parte carboxilo terminal (Figura 1). En las proteínas *MAGE A5*, *A8* el dominio d2 está truncado en la parte C-terminal (13).

Se han identificado algunas proteínas con semejanza en la secuencia de la proteína *MAGE*, de las cuales se han agrupado en dos familias: la *Necdin* y *MAGE-D*. Los genes de la familia de *Necdin* están localizados en el locus 15q11-q12, se han relacionado con el síndrome de Prader-Willi y se ha reportado que puede funcionar como un supresor de crecimiento neuronal (31). Los

genes de la familia *MAGE D* están codificados en el cromosoma X y se expresan en todos los tejidos y órganos. La estructura de *MAGE D2* es significativamente diferente a las estructura de los genes *MAGE A*, *B* y *C* se ha sugerido que *MAGE D2* mantiene la estructura del antecesor de todos los genes *MAGE* dando origen a los genes *MAGE-A*, *B* y *C* por retrotransposición del mRNA del gen ancestral (12,13).

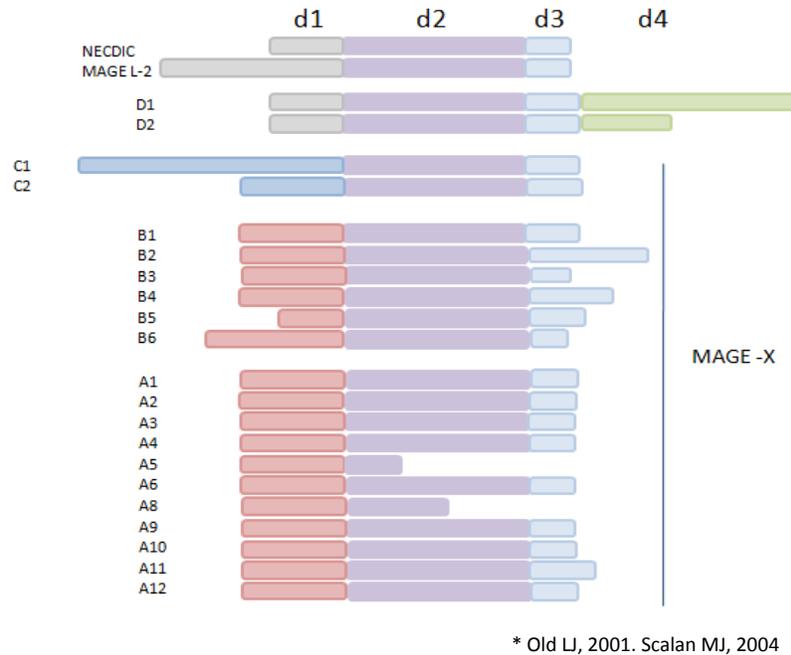


Figura 1. Dominios estructurales de las proteínas *MAGE*

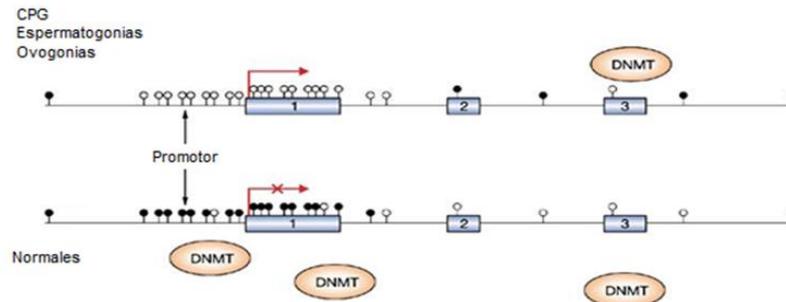
1.3. Control de la Expresión de los CTA

El control de la expresión de los genes CTA en células normales se realiza mediante el proceso de metilación/ desmetilación de la región promotora (32). La metilación es un mecanismo epigenético, tiene un papel importante en el silenciamiento de genes y la inactivación del cromosoma X. La metilación es llevada a cabo por la DNA metiltransferasa (DNMT1) que cataliza la adición covalente de un grupo metilo de la S-adenocilmetionina a la posición 5' del dinucleótido CpG que están localizadas frecuentemente en zonas promotoras del gen (33).

La pérdida de la metilación genómica (hipometilación o desmetilación) se asocia frecuentemente con el proceso neoplásico y es proporcional a la progresión de la enfermedad. En los genes de las células preneoplásicas y cancerosas comparten cambios importantes en los niveles de metilación (Figura 2).

La hipometilación conduce a una inestabilidad genómica e incrementa los eventos de recombinación por lo que existe sobreexpresión y alteración de las proteínas involucradas en los procesos de invasión y metástasis. La hipermetilación de genes está implicada con el silenciamiento de genes, como en los genes supresores de tumor y en la regulación génica durante el desarrollo embrionario (34).

En tejidos normales los promotores de los genes *MAGE* están hipermetilados



En células tumorales están hipometilados o desmetilados

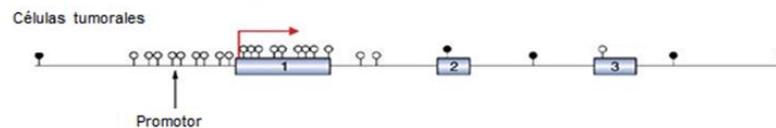


Figura 2. Control de la expresión de los CTA

* Jungbluth AA, 2000

En tejidos normales los promotores de los genes CTA están hipermetilados, excepto en tejido testicular donde los genes se expresan en las células que dan origen a la serie espermatogénica, principalmente la espermatogonia y el espermatozoides donde se ha detectado la expresión de las proteínas *MAGE* (34). Se ha sugerido que durante la embriogénesis la expresión de los genes *MAGE* bloquea la apoptosis que no se presenta en las células embrionarias testiculares; al llevarse a cabo la diferenciación testicular permanecen encendidos únicamente en las células germinales primordiales (CGP) del tejido testicular (35). Los promotores

del resto de las células son metilados por lo que los genes son silenciados o inactivados. Se ha observado que el patrón de metilación de la región promotora de los genes *MAGE-A3* es transmitida de una generación a otra lo que corrobora la implicación de un mecanismo de control epigenético. Otros genes que codifican para CTA tales como *MAGE-A1*, *A2*, *GAGE*, *NY-ESO1* mantienen el mismo patrón de metilación (35,36).

Los primeros estudios sobre la activación de los CTA en las células tumorales se realizaron en líneas celulares de melanoma cuando eran tratadas con el agente desmetilante 5-aza-2-desoxicitidina (5-AZA-Cdr) y se describió que el promotor de *MAGE A1* contiene varias secuencias con sitios de unión al factor de transcripción ETS, cuando las regiones CpG están metiladas los factores de unión ETS no pueden unirse y por lo que la expresión del gen está inactiva (37-49). Este mecanismo de desmetilación de los promotores también se lleva a cabo en otros genes CTA tales como *MAGE-A3*, *NY-ESO1*, *LAGE* y *GAGE* (35). Se sabe también que la DNMT1 es la responsable en mantener metilada la región promotora del gen *MAGE-A1*; en la línea celular MZ2-MEL al inhibirla, el promotor se desmetila y el gen se expresa. Actualmente estos mecanismos han sido corroborados en otros modelos de diferentes tipos de cáncer (40). La hipometilación del DNA es un proceso que ocurre durante los estadios tempranos de la carcinogénesis y se cabe que existe una correlación entre la expresión de *MAGE-A1*, *MAGE-A3* y *MAGE-B2* y la desmetilación en Cáncer pulmón de células no pequeñas (CPCNP). En éste estudio se realizó una comparación entre pacientes e individuos fumadores sin cáncer y se observó que la hipometilación no solo era detectada en pacientes con cáncer sino en aquellos expuestos a un carcinógeno, se sugirió también que los genes están implicados en el desarrollo de la carcinogénesis de esta patología (41). Se ha descrito una relación directa entre el grado de tumor y la desmetilación de los genes *MAGE-A1* y *MAGE-A3* en líneas celulares y pacientes con cáncer gástrico, además los pacientes que mostraron desmetilación de ambos genes presentaron menor sobrevida (42). Lo anterior indica la importancia en el control de los genes por desmetilación del promotor y la implicación de los genes *MAGE* para el desarrollo del proceso tumoral.

La vía descrita del control de la expresión de los genes *MAGE* es a través de la expresión del gen KIT, (proteína transmembranal que funciona como un receptor con actividad de tirosina cinasa). En líneas celulares de mastocitos HMC1.1 (KIT y *MAGE* positivos) se observó que al inhibir KIT se produce la metilación de la región promotora de los genes *MAGE-A3* y *MAGE-C2* y por lo

tanto no se detecta expresión de los mismos después de la inhibición. Se ha sugerido que actividad de KIT funciona como un mecanismo que mantiene las regiones promotoras hipometiladas por lo que podría contribuir a un control en la expresión de los genes *MAGE*. Se ha descrito que las espermatogonias y los espermatoцитos primarios expresan KIT al igual que *MAGE* durante la meiosis (43). La expresión de KIT es necesaria para la diferenciación y proliferación de las células precursoras de los espermatozoides y la activación de KIT puede contribuir a la regulación normal tejido-específico de las proteínas *MAGE* (44,45).

1.4. Función de los genes CTA

1.4.1. Función de los CTA en células normales

A pesar de la gran cantidad de reportes acerca de la expresión de estos genes CTA en diversos cánceres, su función en las células normales y tumorales no ha sido determinada con exactitud. Se sabe que en tejido embrionario expresan en células germinales primordiales (CGP), gonocitos prenatales y preespermatoгонias. En tejido adulto se expresan solo en espermatogonia y espermatoцитo primario, los cuales proliferan durante toda la vida para mantener la reserva de células tallo o se diferencian para producir espermatozoides. Este proceso comprende dos divisiones meióticas de espermatoцитos primarios a espermatoцитos secundarios y de éstos a espermátides que se convierten en espermatozoides (46- 49).

Se ha descrito que en tejidos gonadales humanos *GAGE* se expresa en CGP, mientras que *MAGE A1* y *NY-ESO1* en células germinales en testículo y ovario después de iniciada la diferenciación sexual por lo que se ha sugerido que *MAGE-A1* y *NY-ESO1* podrían estar implicadas en el control de la proliferación de células germinales, mientras que las proteínas *GAGE* tienen una función más general en las CGP (48,49).

Se sabe que el gen *MAGE-b4* en ratón interviene en el desarrollo embrionario, este gen es homólogo al gen *MAGE B* en humano. Al parecer en el ratón se detecta en las células que dan origen a la espermatogénesis al igual que en el humano (50).

Por otra parte, se ha reportado que el gen *Necdin* aislado de la línea neural P19, forma parte de la familia *MAGE II* y tiene una homología del 30% con otras proteínas *MAGE*. La

sobreexpresión de este gen detiene al ciclo celular en líneas celulares NIH3T3 y SAOS2, lo que sugiere que puede tener funciones sobre el ciclo celular. In vivo Necdin puede interactuar con proteínas del ciclo celular como por ejemplo la proteína SV-40 big-T y el factor de transcripción E2F-1 que actúa como un regulador de ciclo celular por la tras-activación del gen Rb, al unirse con E2F-1 durante la fase G1 inactiva al gen. Necdin puede unirse a E2F-1 produciendo un cambio conformacional e inhibiendo el ciclo celular. Se ha observado también que Necdin puede unirse a p53 que normalmente induce el arresto y la muerte celular (50,51). La proteína Necdin humana se ha asociado al síndrome Prader-Willi (SPW) los pacientes con este síndrome muestran fallas generales respiratorias y en la adolescencia disfunción sexual y obesidad, en estos pacientes se ha detectado la proteína *MAGE L2*. En ratones knockout para Necdin se observan síntomas similares al SPW, por lo que se sugiere que Necdin está involucrada en el desarrollo de esta enfermedad (52).

La función de los genes CTA en células normales no es clara sin embargo se relaciona con el desarrollo embrionario, inhibiendo posiblemente la apoptosis y en el mantenimiento las CGP masculinas y femeninas.

1.4.2. Función de los CTA en células tumorales

En el caso de células tumorales los reportes indican que la función biológica de los genes *MAGE* es la inhibición de la apoptosis brindándole una ventaja a la célula tumoral por lo que se relacionan con un mal pronóstico en pacientes que los expresan. En líneas celulares se ha reportado un mecanismo en líneas celulares de melanoma, en donde las proteínas *MAGE* pueden actuar como un corepresor de p53 por unión de KAP1 y suprimiendo a p53. KAP1 se localiza en sitios donde el DNA presenta rompimientos, estableciendo una represión transcripcional y un reconocimiento del mecanismo de reparación (Figura 3). Debido a que las proteínas *MAGE* se unen a KAP1, éstas interfieren con la respuesta al daño mediada por p53 otorgando una ventaja a la célula tumoral (53).

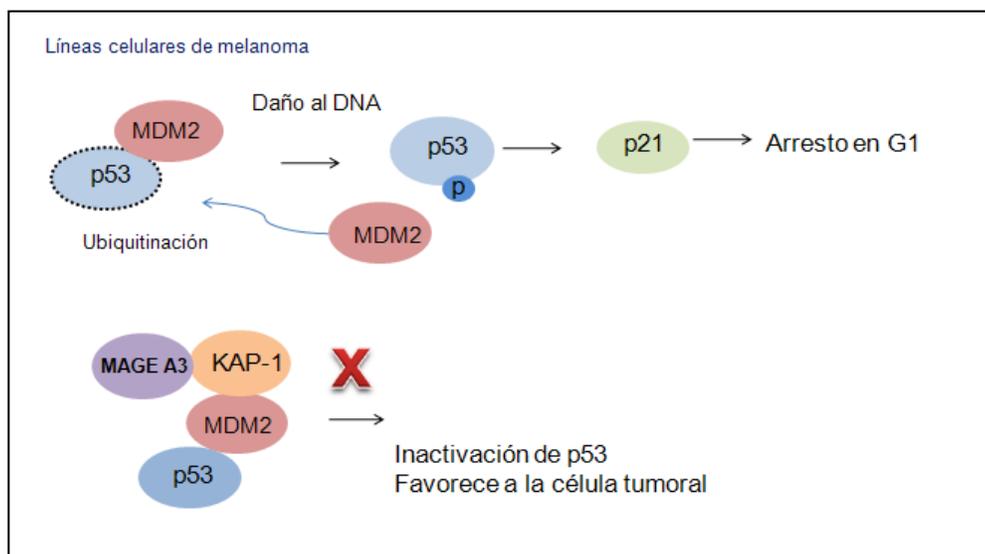


Figura 3. Participación del gen *MAGE A3* en la inhibición de la apoptosis

En estudio *in vitro* se demostró que en la línea celular murina C2C12, *MAGE A3* se une a la pro-caspasa-12, con lo que se bloquea la ruta de activación de la caspasa 12 y la caspasa 9, evitando la apoptosis (54). Por el contrario, se ha observado que el gen *MAGE-A4* induce apoptosis *in vitro* a través de vías dependientes e independientes de p53. En este caso el fragmento carboxilo-terminal de *MAGE-A4* se une al factor de transcripción Miz-1 y por lo tanto bloquea a p21 inhibiendo el ciclo celular (55,56) (Figura 4). Además, *MAGE-A4* puede unirse a la gankirina (implicada en la carcinogénesis del carcinoma hepatocelular), inhibiendo el desarrollo tumoral (57).

Se ha observado que otros CTA como por ejemplo *GAGE* presenta actividad anti-apoptótica y resistencia a agentes quimioterapéuticos como el Taxol, también se ha mostrado que la presencia de este gen se ha relacionado con un mal pronóstico (58).

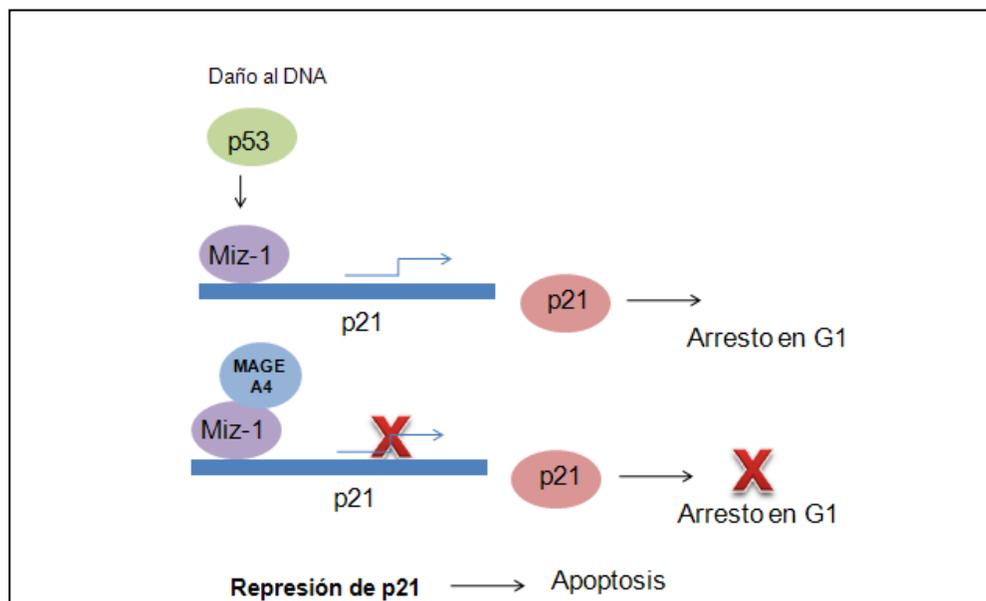


Figura 4. *MAGE A4* en la inhibición de la apoptosis

Existen evidencias de que los genes *MAGE A3* y *A4* participan en la inhibición e inducción de la apoptosis respectivamente, los dos mecanismos podrían ser posibles en el desarrollo embrionario y en la diferenciación de células embrionarias. En el caso de las células tumorales se ha demostrado que el patrón de expresión de éstos genes es heterogéneo y que en los tumores la presencia del gen *MAGE-A3* confiere a la célula tumoral ventajas por lo que los pacientes que lo expresan generalmente tienen una menor sobrevida, en el caso de *MAGE A4* su función asociada a la respuesta clínica aun no está clara.

En el caso de las células tumorales se sabe que la presencia de los genes CTA, está relacionada con el grado del desarrollo del tumor, curso clínico agresivo y resistencia a agentes quimioterapéuticos (59,60), generando ventajas a la célula tumoral. En diversos cánceres las frecuencias de coexpresión entre *MAGE-A*, *NY-ESO1* y *GAGE* están alrededor de un 40 al 60% su expresión se asocia a un mal pronóstico y sobrevida corta (61,62). Estos datos podrían sugerir la importancia terapéutica en la expresión de los CTA en diversos tipos de cáncer ya que posiblemente pueden ser usados en la inmunoterapia como vacunas multiantígenos, generando respuestas específicas no solo hacia un antígeno sino hacia la amplia variedad de CTA detectados en el tumor.

1.5. Importancia clínica de los CTA

Debido a que los genes *MAGE* se expresan únicamente en las células tumorales y no en células normales, su importancia en la clínica ha sido objeto de estudio y el conocimiento su importancia diagnóstica y pronóstica en diversos tipos de cáncer ha iniciado diversas controversias (Tabla 2).

La mayoría de éstos estudios sobre la importancia de estos genes en la clínica se han realizado en cáncer de pulmón en el que la frecuencia de expresión es mayor al 50% tanto en su variedad de CPCNP como de carcinoma de células escamosas (CCE) (63,64 ,65) y por lo tanto es de suma importancia la detección temprana de estas neoplasias. La relación en cuanto a la presencia de los genes *MAGE* y el estadio clínico se ha realizado en pacientes con CPCNP observándose mayor frecuencia en la expresión en estadios III y IV, asociado con los niveles de mRNA y proteína. Además, se han realizado los seguimientos clínicos para valorar la sobrevida en aquellos pacientes que expresan alguno de los genes *MAGE* reportando una menor sobrevida y un pronóstico adverso (66, 67,68). Cabe mencionar que los genes específicos relacionados con la sobrevida fueron *MAGE A3* y *MAGE A4*. Contrariamente existe un estudio en el que no encuentran importancia pronóstica realizado en pacientes con CCE (69).

Seguido del cáncer de pulmón, el melanoma es el tipo de cáncer con mayor número de estudios clínicos para este grupo de genes. Se sabe que la frecuencia de expresión de los genes *MAGE A3*, *MAGE A4*, *MAGE C1* son 54%, 73%, 61%, respectivamente (70). Sin embargo, los estudios acerca de valor pronóstico de éstos genes son controversiales, ya que en algunos trabajos se menciona que no existe significado pronóstico debido a que no existe correlación entre la progresión de la enfermedad (71,72). Otros estudios han comparado la expresión de *MAGE* a nivel de proteína con los factores pronóstico así como el tipo histológico en pacientes con melanoma y detectan que aproximadamente el 50% de los melanomas primarios cutáneos expresan alguno de los genes *MAGE-A*, además reportan que la frecuencia en la expresión aumenta a un 83% en tumores metastásicos, por lo que sugieren que la expresión de *MAGE* se asocia a un estado avanzado de la enfermedad (72). También se ha reportado que existe relación entre la expresión de los genes *MAGE* y la infiltración de linfocitos (73).

Tabla 2. Los CTA en diversos tipos de cánceres

Neoplasia	Gen implicado	Datos específicos	Referencia
Ca Pulmón	<i>MAGE A1, A2, A3, B2, GAGE</i>	Expresión >50% en CPCNP, solo <i>GAGE</i> fue marcador de sobrevida en CPCNP, (Cáncer de pulmón de células no pequeñas)	Melloni, 2004
	<i>MAGE A4, NY-ESO 1</i>	Expresión del 28 y 8 % respectivamente, <i>MAGE A4</i> se relaciona con una menor sobrevida.	Yoshida, 2006
	<i>MAGE A3, NY-ESO1</i>	<i>NY-ESO1</i> Asociado con una menor sobrevida, <i>MAGE A3</i> frecuencia > al 50%, en CCE (Carcinoma de células escamosas) importancia al diagnostico y posible terapia.	Kim, 2009
	<i>MAGE A3, NY-ESO1</i>	<i>MAGE A3/A4</i> y <i>NY-ESO1</i> asociado con factores de mal pronóstico para LSCC.	Grah, 2008
	<i>MAGE A3, A4, NY-ESO1,</i>	Expresión de los genes >25%. <i>MAGE A4</i> mayor frecuencia en estadios clínicos III y IV, relación con una menor sobrevida de CPCNP.	Shigematsu, 2010
	<i>MAGE A3</i>	Mal pronóstico menor sobrevida en pacientes con CPCNP.	Sienel, 2004
	<i>MAGE- A, NY-ESO1</i>	No se encuentra importancia pronóstico, solo podrían emplearse en detección temprana en CCE.	Sugita, 2002
Melanoma	<i>MAGE A4, C1, NY-ESO1</i>	Expresión > 80% el de mayor frecuencia <i>MAGE A4</i> .	Prasad, 2004
	<i>MAGE A1, A4, NY-ESO1</i>	Encontraron una frecuencia menor al 25%.	Lüftl, 2004
	<i>MAGE A1, A4, NY-ESO1</i>	<i>MAGE A1</i> Y <i>A4</i> tuvieron relación con el estadio de la enfermedad.	Barrow, 2006
	<i>MAGE A</i>	Encontraron relación entre la expresión de los genes y la infiltración de linfocitos.	Busam, 2000
Mieloma múltiple	<i>MAGE C1, A3</i>	Frecuencias de <i>C1</i> (77%) y <i>A3</i> (41%) lo proponen como marcador diagnóstico, solo <i>MAGE C1</i> lo relacionaron como factor pronóstico.	Andrade, 2008
	<i>MAGE C1, A3</i>	Asociado con mal pronóstico y sobrevida.	Andrade, 2009
	<i>MAGE C1, A3, SSX</i>	<i>MAGE C1</i> indicador de recaída temprana y una sobrevida reducida.	Atanackovic, 2009
	<i>MAGE A3, A6, A1, A2, BAGE, GAGE</i>	El 98% expresan al menos un gen, todos tuvieron relación con una menor sobrevida	Condomines, 2007
	<i>MAGE C1, MAGE A3</i>	<i>MAGE C1</i> se incrementa en estadios clínicos avanzados, <i>A3</i> se correlacionan con la proliferación avanzada de células plasmáticas.	Jungbluth, 2005
Faringe	<i>MAGE A, NY-ESO1</i>	Asociados a una sobrevida menor a 5 años, pero con correlaciones estadísticamente no significativas.	Pastorcic-Grgic, 2009
Tiroides	<i>MAGE</i>	Relación con la progresión de la enfermedad	Chen, 2009

Gástrico	<i>MAGE A1, A3, A4, C1</i>	Presento valor pronóstico con el riesgo de recurrencia en tumores estromales gastrointestinales.	Perez,2008
	<i>MAGE A10</i>	Fue detectado en mayor frecuencia en pacientes con metástasis en hígado y estadio IV de cáncer de estomago, asociado a una sobrevida reducida.	Suzuki, 2008
Hepatocelular	<i>MAGE A1, A3, GAGE, BAGE.</i>	No hay correlación entre la expresión de los genes y el estado de diferenciación o tamaño en Ca Hepatocelular.	Kobayashi, 2000
Ca. Pancreático	<i>MAGE A3</i>	Expresión > 40% asociado con una menor sobrevida, así como con el grado del tumor en cáncer pancreático.	Kim, 2006
Colon	<i>MAGE A3, NY-ESO</i>	Marcador molecular en cáncer de colon.	Scalan MJ, 2002
Ovario	<i>MAGE A1, A3, GAGE</i>	Usado como marcador molecular.	Hoffman, 2002
	<i>MAGE A4, NY-ESO</i>	Expresión >50% Correlación entre <i>MAGE A4</i> la sobrevida y el grado de malignidad.	Yakirevich,2003
Ca Vulvar	<i>MAGE A1, A4, NY-ESO 1</i>	<i>MAGE A4</i> se relaciono con nódulos linfoides metastásicos y en tumores recurrentes.	Bellati, 2007
Cérvico Uterino	<i>MAGE A</i>	Se correlaciono con estadios tempranos, con el tamaño del tumor y con los nódulos linfoides metastásicos.	Napoletano, 2008
Ca mama	<i>MAGE A4, NY-ESO, HER-2</i>	<i>MAGE A4</i> , se relaciono una mayor sobrevida.	Bandic,2006
	<i>MAGE C1</i>	Frecuencia > al 50% de <i>MAGE C1</i> , correlación con el grado del tumor.	Krüger, 2007
Ca urotelial	<i>MAGE 1, A3,A4,A10, GAGE, NY-ESO1, LAGE-1</i>	El 77% expresan al menos un gen, <i>A10</i> fue relacionado con una mayor sobrevida.	Sharma, 2006
Vejiga	<i>MAGE A4, MAGE A9</i>	Asociados con alto grado de malignidad, <i>MAGE A9</i> presento un valor predictivo.	Bergeron , 2009
Neuroblastoma	<i>MAGE A1</i>	Lo proponen como marcador de enfermedad mínima residual.	Grau,2009

En diversos tipos de canceres como faríngeo (74), tiroideo (75), gástrico (76,77) hepatocelular (78) pancreático (79), colon (80), ovario (81,82) vulvar (83), cérvico uterino (84), de mama (85,86), urotelial (87), Vejiga (88), neuroblastoma (89) etc., se ha iniciado la relación de la presencia de alguno de los CTA y la progresión de la enfermedad, enfermedad mínima residual, grado de malignidad y sobrevida.

1.5.1. Implicación de los CTA en la hematología

Otro de los cánceres con varios estudios en el área hematológica es el mieloma múltiple; en el que las frecuencias encontradas en este tipo de neoplasia son mayores para el caso de *MAGE C1* en un 70% (90). Se ha observado también que *MAGE C1* se relaciona con estadios avanzados y el gen *MAGE A3* con una correlación con la proliferación avanzada de las células plasmáticas.

(91,92). En relación a utilizarlo como marcador de mal pronóstico y de sobrevida se han realizado seguimientos, observando que puede ser un indicador de recaída temprana (93). Actualmente se sabe que los genes *MAGE A3* y *C1* en líneas celulares de mieloma, tienen un efecto antiapoptótico en células de mieloma promoviendo la sobrevida de las células de mieloma múltiple (94).

En leucemias los estudios se han enfocado a la detección de los CTA en LAM (leucemia aguda mieloblástica) y LMC (leucemia mieloide crónica) incluyendo los genes *MAGE A3*, *PRAME*, *ROPN1*, *SCP-1*, *SPO11*, *NY-ESO1* (95); después del uso de agentes desmetilantes DAC (5-azacitidina) se ha demostrado tanto en células en cultivo como en pacientes, un incremento o síntesis de novo de los CTA, en especial de *PRAME*, con una expresión del 30-64%, en LAL (leucemia aguda linfoblástica), LMC, mieloma y linfoma (96,97); en las LAL se ha utilizado como marcador de enfermedad mínima residual, mientras que en LMC se ha encontrado correlación con la sobrevida y con parámetros clínicos (97). Por lo que además de la relación clínica de los CTA (en especial de *PRAME*) durante la enfermedad, se ha propuesto la combinación de DAC y la inmunoterapia específica de LTC [linfocitos T citotóxicos] (98,99).

En el caso de linfomas los reportes son escasos y en su mayoría se han realizado en linfoma de Hodgkin (LH), en linfoma difuso de célula grandes b (LDCGB) y en linfoma de células T del adulto. Estos estudios han detectado a nivel de mRNA y las de expresión son variables *NY-ESO1* (5-25%), *MAGE A* (4-12%) y *PRAME* (12-35%), en su mayoría solo se detecta la proteína; en algunos reportes se determina la respuesta inmune humoral y celular (100,101). En cuanto a su relevancia clínica Han, 2010 reporta que existe mayor positividad CTA en fase avanzada (28,6%) en comparación con la fase inicial (11,8%) en LH, pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa (102). El análisis de subgrupos clínico-patológico del LH clásico, incluyendo subtipos histológicos, el estado de EBV (virus de Epstein-Barr) y respuesta al tratamiento no demostró diferencias estadísticamente significativas en la expresión de la CTA.

Por lo anterior siendo el linfoma uno de los cánceres de mayor incidencia en nuestro país es necesario conocer la frecuencia de expresión de los CTA, así como realizar un estudio de correlación para determinar su posible asociación con los factores clínicos pronósticos y la sobrevida del paciente.

2. Linfoma

El término linfoma se refiere a un conjunto de neoplasias que se originan en el tejido linfoide y se caracteriza por la presencia de células malignas en cualquier zona del sistema linfático en una etapa específica de maduración y diferenciación hacia las estirpes B o T.

El diagnóstico clínico se basa en la presencia de fiebre, diaforesis, pérdida de peso, síndrome infiltrativo (adenopatías, esplenomegalia, hepatomegalia). El 95% de los casos presenta adenopatías con crecimiento progresivo, indoloras, que pueden ser cervicales, axilares o inguinales (Figura 5). Puede existir un compromiso primario o secundario de otros órganos extranodales como piel, vía aérea alta, amígdalas, tiroides o bien a Sistema Nervioso Central (SNC) o a Sistema Óseo. En caso de afectación al SNC pueden existir síntomas neurológicos o bien datos clínicos por compresión medular. Debido a la falta de dolor la mayor parte de los pacientes no acuden a revisión médica oportuna por lo que la neoplasia avanza. El tratamiento médico y la sobrevida depende de tres consideraciones principales: la clasificación, el origen del linfoma y las condiciones de salud del paciente (103, 104).

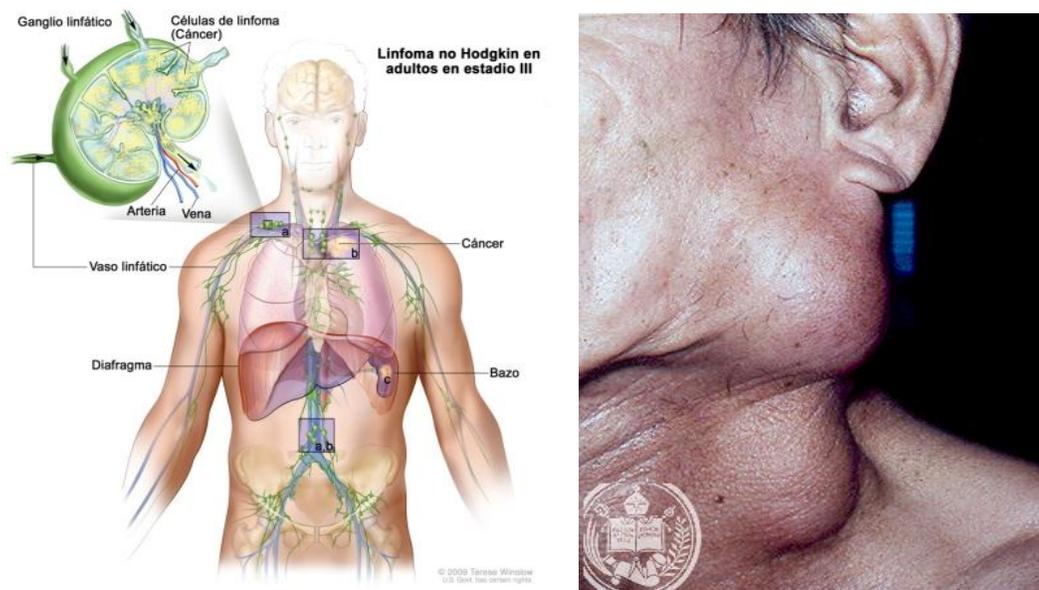


Figura 5. Linfoma en adultos en estadio clínico avanzado

* <http://www.cancer.gov/espanol/> y Facultad de Medicina Universidad de Los Andes
Mérica - Venezuela

2.1. Incidencia del Linfoma a nivel mundial

Con base en el registro de la Organización Mundial de la Salud (OMS) Globocan 2002, el linfoma no-Hodgkin y la leucemia linfocítica se ubicaron dentro de las primeras 15 causas de neoplasias malignas y representaron alrededor del 8% del total de casos nuevos registrados (105).

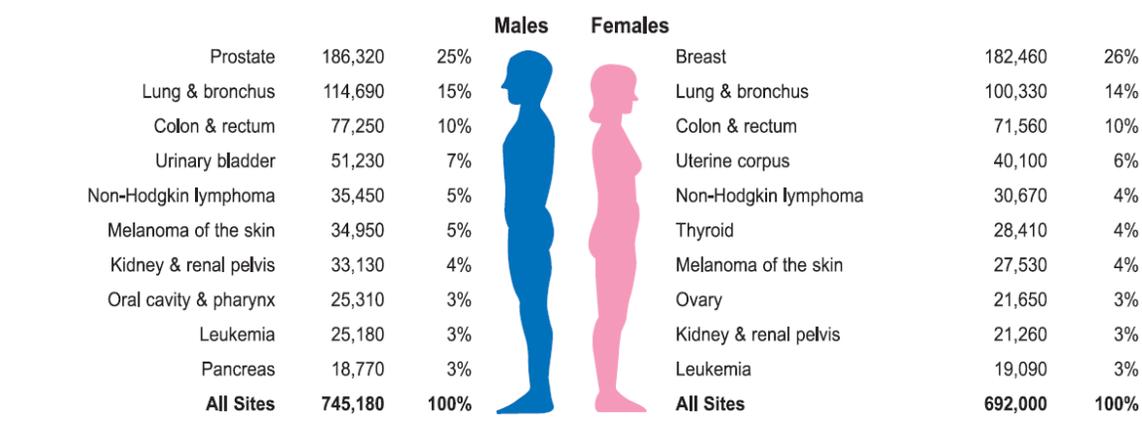


Figura 6. Incidencia de cáncer a nivel mundial

*Globocan 2002, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization.

La mortalidad a nivel mundial en las enfermedades hemato-oncológicas que se presentan con mayor frecuencia en la población por grupo de edad y tanto en hombres como en mujeres, fueron las leucemias y el LNH. En el grupo de los menores de 14 años, independientemente al género, las leucemias ocuparon el primer lugar dentro de este grupo de enfermedades; en el caso de las mujeres, dicha posición se mantuvo hasta el grupo de 15 a 44 años y posteriormente se ubicaron por debajo del LNH. El comportamiento fue similar en la población masculina, aunque cabe aclarar que la inversión de la frecuencia se observó a partir de los 15 años, (Figura 7). La tendencia observada de acuerdo con el grupo de edad fue ascendente, alcanzando la tasa más alta en la población de 65 años (104, 105).

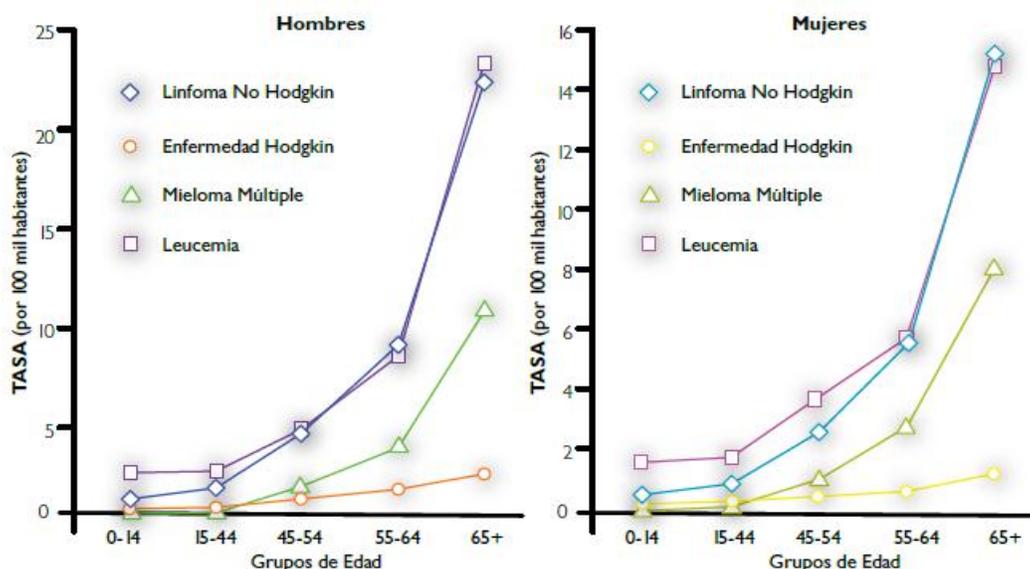


Figura 7. Mortalidad en neoplasias hematológicas por grupos de edad

*Globocan 2002, International Agency for Research on Cancer, World , Health Organization.

Tirado y Mohar, Cancerología 2 (2007): 109-120

2.1.1. Incidencia del linfoma en México

En la actualidad no se cuenta con información sobre las tasas de incidencia de estas enfermedades en México; sin embargo, se cuenta con el número de casos nuevos notificados por los patólogos y médicos oncólogos incorporados al Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas (RHNM) (106-108).

En una revisión del año 2000 al 2005 en el Hospital General de México, los LNH ocuparon el primer sitio de las neoplasias diagnosticadas en el servicio de Hematología, con un total de 616; que corresponde a 32.5% y a 82.6% de todos los linfomas. El promedio es de 102.6 casos nuevos por año, con edades en el rango de 15 a 87 años y una mediana de 48 (109). En relación a la variedad histológica, el linfoma difuso de células grandes B, (LDCGB) fue el más frecuente de los LNH (62.9%), seguido por el de linfocitos pequeños (4%) y los anaplásicos, T periféricos y foliculares (2% cada uno). El grupo de edad más afectado fue el de 70 años y mayores y el de menor incidencia el de 25 a 29 años (110). En el 2011, durante el periodo de enero a septiembre, el LNH fue la segunda causa de atención en el servicio de hematología con un total de 669 casos en este periodo. En cuanto a mortalidad es la tercera causa de defunción después de la leucemia aguda linfoide y mieloide (111).

2.2. Factores de riesgo de los linfomas

La etiología de la mayoría de los linfomas es desconocida algunos de los factores de riesgo asociados al linfoma son la edad y el sexo; de hecho la probabilidad de desarrollar esta enfermedad aumenta con la edad y es mayor en hombres que en mujeres (112, 127).

Factores ambientales: La exposición a derivados del benceno como pesticidas, herbicidas, solventes, pueden estar asociados con un mayor riesgo de linfoma no Hodgkin. Algunos medicamentos de quimioterapia que se utilizan para tratar otros cánceres pudieran aumentar el riesgo de linfoma no Hodgkin muchos años después (112, 127).

Enfermedades autoinmunes: La artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, enteropatía por sensibilidad al gluten, entre otras, están asociadas con una tasa aumentada de LNH. Un sistema inmunológico hiperactivo en enfermedades autoinmunes puede causar que los linfocitos crezcan y se dividan con más frecuencia de lo normal (113,114).

Agentes infecciosos: El virus del Epstein Barr (VEB), el virus de la hepatitis C, el virus del leucemia de células T humanas (HTLV-1) , el virus de la inmunodeficiencia adquirida (VIH), así como la infección con *Helicobacter pylori* son factores de riesgo importantes que incrementan las posibilidades de desarrollar linfoma (114).

Exposición a la radiación: Los estudios de sobrevivientes de las bombas atómicas y de los accidentes de reactores nucleares muestran que tienen un riesgo aumentado de diversos tipos de cáncer, incluyendo leucemia, cáncer de tiroides y LNH. Los pacientes que hayan recibido radioterapia contra algunos otros cánceres, tal como LH, tienen un riesgo ligeramente aumentado de padecer el LNH en etapas posteriores de sus vidas. Este riesgo es mayor en los pacientes que reciben tanto radioterapia como quimioterapia (112-114).

2.3. Origen y diversidades en los linfomas

Los distintos fenotipos de LNH tienen un paralelismo con las diferentes fases del proceso de maduración de las células linfoides B normales (linfopoyesis), en la mayoría de las entidades es posible encontrar una explicación de los hallazgos clínicos, inmunofenotípicos y morfológicos. Determinadas alteraciones citogenéticas como por ejemplo en los linfomas de células B comparten con frecuencia alteraciones que implican a los genes codificantes para la cadena pesada de las inmunoglobulinas. En las células linfoides esta zona está sujeta de forma constitutiva a un alto índice de modificaciones de la secuencia genética (reordenamientos y mutaciones) que conlleva a la obtención de diferentes grados de afinidad de las moléculas de anticuerpos por el antígeno. Probablemente su alto nivel de “actividad” confiere un grado importante de inestabilidad que se traduce en un mayor riesgo de errores, los cuales pueden derivar en la adquisición de características neoplasias en los linfocitos que lo presentan (103, 104, 124).

Desde los tres meses de vida fetal aparecen en los órganos linfoides secundarios acumulaciones de linfocitos pequeños unidos a las células reticulares denominados folículos primarios. Estas células se activan en la vida posnatal y por acción de un antígeno estas células se estimulan a dividirse y se transforman en células linfoides grandes de carácter blástico que se acumulan en el centro del folículo. La estructura resultante se denomina folículo secundario. En este tipo de folículos se distingue una zona periférica denominada mantofolicular integrada en su mayor parte por los linfocitos pequeños que todavía no han sufrido la transformación blástica, y una zona central denominada centro germinal caracterizada por la presencia de blastos grandes. En una etapa posterior, dentro del centro germinal se distinguen una zona clara con células pequeñas y dispersas llamadas centrocitos y una zona oscura integrada por células más grandes y apiñadas llamadas centroblastos. En algunos órganos linfoides como en el bazo, los ganglios mesentéricos y las placas de Peyer puede existir una segunda capa integrada por células linfoides de tamaño intermedio denominada zona marginal que representa la acumulación de células de memoria (103, 104, 124).

El linfocito pequeño B llega a los folículos procedente de la médula ósea (su origen es el linfocito pre-B medular, presenta BCL-2, BCL-6⁻ y Ki67⁻ existen tamaños intermedios como la célula pequeña no hendida (Figura 8). Al ser activado por el antígeno, entra al centro germinal formando al centroblasto. Esta célula presenta CD20⁺, CD79⁺, CD10⁺, BCL6⁺, BCL-2⁻ y Ki67 en altos niveles. Al diferenciarse se convierte en centrocito también llamada célula pequeña hendida con citoplasma escaso y una invaginación profunda con CD20⁺, CD79^{low}, CD10⁺, BCL-6⁺, BCL-2⁻ y Ki67^{low}. La siguiente célula en este proceso se conoce como célula plasmática con citoplasma basófilo y con alta producción de anticuerpos de alta afinidad presenta CD79a⁺, CD30⁺, BCL-2⁺, BCL-6⁻, Ki67⁻, CD138⁺ y CD43⁺. Posterior a este proceso existen células de la zona marginal como el inmunoblasto y la célula plasmocitoide que generalmente suelen ser de memoria (103,124)

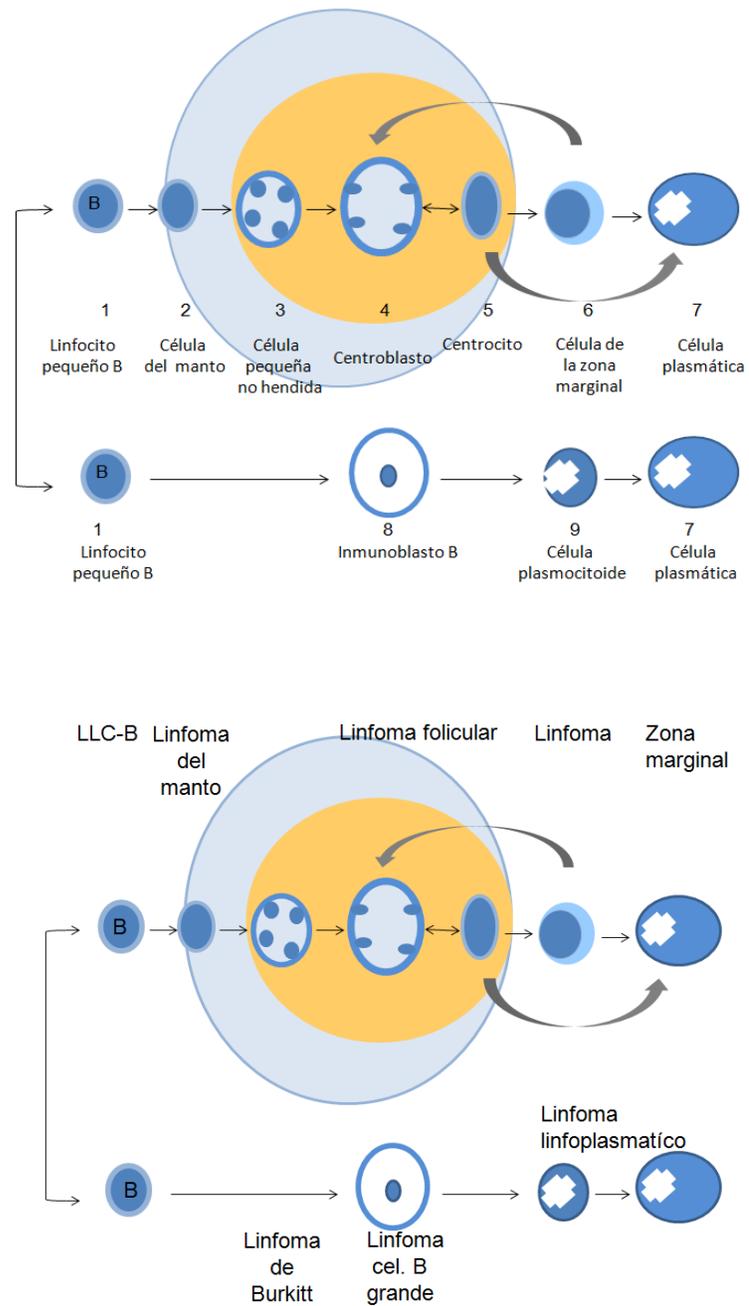


Figura 8. Linfopoyesis y las variantes de linfoma.
 En la parte superior la activación del linfocito B en los foliculos.
 En la parte inferior las variedades del linfoma

*Hematología Clínica, Sans-Sabrafen , 2006

2.4. Clasificación de los linfomas

Esta clasificación ha sido modificada varias veces. La primera clasificación fue la de Liag y Mallory en 1941, siendo modificada por Rappaport en 1966, seguida por la clasificación de Kiel y Lukes y Collins. La clasificación más reciente es la de la Organización Mundial de la Salud en 2008 (OMS), (119) en la cual se incluyen las neoplasias hematológicas estratificándolas según el linaje: Neoplasias de células maduras B, T y Linfoma de Hodgkin o Enfermedad de Hodgkin (Tabla3).

Tabla 3. Clasificación de las enfermedades neoplásicas maduras de origen linfoide (OMS, 2008)

Neoplasias de Células B maduras	Linfoma de Hodgkin (Enfermedad de Hodgkin)
Leucemia linfocítica crónica/Linfoma de linfocitos pequeños Leucemia Promielocítica de células B Linfoma de Zona Marginal Esplénica Leucemia de células peludas Macroglobulemia de Waldenstrom Enfermedad de las cadenas pesadas Mieloma de células Plasmáticas Linfoma del centro Folicular Cutáneo Primario Linfoma de zona Marginal Nodal Linfoma Folicular Pediátrica Linfoma de Células del Manto Linfoma de Burkitt Linfoma de células B Grandes Intravascular Linfoma de B Grande ALK+ Linfoma Plasmablástico Linfoma de Efusión Primaria Linfoma difuso de Células Grandes B (LDCGB) Linfoma largo de células B rico en células T Linfoma de Células Grandes Anaplásico ALK negativo Linfoma de células B, no clasificable	Linfoma clásico, celularidad mixta Linfoma Hodgkin Clásico Linfoma de Hodgkin predominante Linfocitos Nodular Linfoma de Hodgkin clásico con depleción de linfocitos Linfoma de Hodgkin clásico rico en Linfocitos Linfoma clásico, esclerosis nodular Linfoma Hodgkin clásico depletado de Linfocitos
Neoplasias de células T maduras	Desordenes linfoproliferativos Postransplante
Linfoma Periférico de células T Leucemia Promielocítica de células T Leucemia Linfocítica Granular Grande Desordenes Linfoproliferativos Crónicos de células T Leucemia de Células T agresiva Enfermedades Linfoproliferativas de células T EVB+ Linfoma de Células T Hepatoesplénico Síndrome de Sézary Linfoma de células T delta-gamma cutáneo primario Linfoma de Células T asociado a enteropatía Linfoma de Células T periféricas Linfoma de Células T Angioinmunoblástica Linfoma de Células Grandes Anaplásicas Linfoma/leucemia de células T del adulto	Lesiones Temprana Hiperplasia Plasmática Mononucleosis Infecciosa semejante a PTLD Polimorfo, Linfoma de Hodgkin clásico tipo PTLD Monomorfo PTLD (células tipo T/NK y B)

2.5. Linfoma No Hodgkin

El hematólogo en el diagnóstico previo al estudio histológico distingue en general dos variedades los Linfomas no Hodgkin (LNH) de células B o T y los Linfomas de Hodgkin (LH). En el Linfoma de Hodgkin (LH), suelen ser afectados los ganglios cervicales o por encima de las clavículas. Sin embargo, en los no Hodgkin (LNH), son los ganglios por encima y por debajo del diafragma, además de otros tejidos linfoides. En el caso de los LNH se pueden distinguir lesiones extraganglionares (fuera de los ganglios linfáticos) (120, 121).

Los linfomas no Hodgkin (LNH) constituyen un grupo de neoplasias que se originan en el tejido linfoide como ganglios linfáticos, bazo y médula ósea, pero pueden iniciarse en cualquier tejido. Según el origen de los linfocitos pueden ser B o T y morfológicamente pequeñas, intermedias o grandes con patrones de crecimiento folicular o difuso. Tienen a diseminarse a otros órganos y con predilección a sitios extraganglionares. Los LNH representan aproximadamente el 10% de las neoplasias de niños en países desarrollados y corresponden a la tercera causa de enfermedades malignas, solo detrás de la leucemia linfoblástica aguda y de los tumores cerebrales. Son más frecuentes en adultos que en niños y tienen un incremento gradual con la edad, sobre todo a partir de los 50 años. La edad en la que más se presenta esta enfermedad es de 45 a 55 años (120,121).

La clasificación de los LNH ha sido problemática y confusa debido a la gran variabilidad en la secuencia de maduración de los linfocitos, con su correspondiente traducción morfológica e inmunofenotípica a nivel celular, (Tabla 4). Las características de cada tipo de linfoma dependiendo su evolución indolente, agresivo o muy agresivo (122,123).

Tabla 4. Clasificación clínica de LNH

Neoplasias B	Neoplasias T
I. Leucemias/linfomas indolentes	
LLC/L Linfocito bien diferenciado L. Linfoplasmocito L. de tricoleucocitos L. de zona marginal esplénica L. B de la zona marginal: extragangliolar (MALT) gangliolar monocitoide L. Folicular grado I y II	LLC T Leucemia de células grandes T y NK Micosis fungoide Leucemia/linfoma crónica T del adulto
II. Linfomas agresivos	
Leucemia pro linfocítica B Mieloma múltiple L. del manto L. folicular grado III L. difuso de célula grande B L. mediastínico de células B del timo L. Burkitt like	Leucemia prolinfocítica T L. periférico inespecífico T L. angioinmunoblástico L. angiocentrico L. intestinal T L. anaplástico de células grandes (tipo T y nulo)
III. Leucemias/linfomas muy agresivos	
Leucemia /linfoma de precursores B linfoblásticos L. Burkitt like Leucemia de células plasmáticas	Leucemia /linfoma de precursores T linfoblásticos Leucemia /linfoma T del adulto (HTLV+)

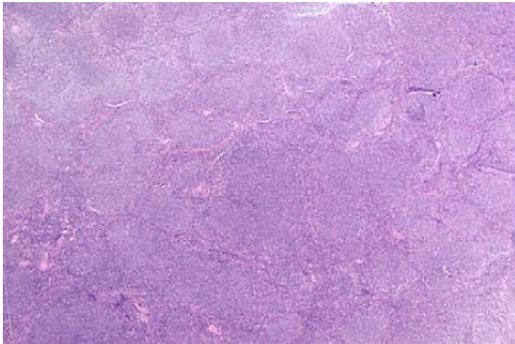
2.5.1 Variedades histológicas del LNH

En relación a la variedad histológica, en nuestro país y en la población del Hospital General de México, el linfoma difuso de células grandes (LDCGB) es el más frecuente de los LNH (62.9%), seguido por el de linfocitos pequeños (7%) y los anaplásicos T periféricos y foliculares (2% cada uno) (Tabla 5, figura 9). El grupo de edad más afectado son los adultos mayores y el de menor incidencia el de 25 a 29 años (107-111,124).

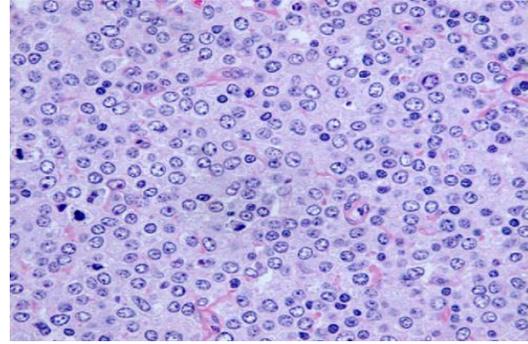
Tabla 5. Algunas variedades del LNH

Variedades	Morfología	Epidemiología en México	Sitios Involucrados	Inmunofenotipo	Citogenética y Biología molecular
INDOLENTES					
<i>Folicular</i>	<i>Folicular, mitosis reducidas, Centrocitos, centroblastos</i>	20-35% adultos	Predominio nodal Infiltración en 20%	CD10 ⁺ , BCL-6 ⁺ , CD20 ⁺ , CD22 ⁺ , CD79a ⁺ CD10	t (14,18), BCL-2 sobreexpresado
Linfoma de linfocitos pequeños/linfoma linfocítica crónica	Difuso pro-linfocito Sin arquitectura ganglionar	5% adultos de edad avanzada	<i>Infiltración a medula ósea y sangre periférica</i>	CD19 ⁺ , CD20 ⁺ , CD22 ⁺ , CD5 ⁺ CD79a CD23 ⁺ IgM/IgD	del 13q14 trisomía 12 del11q
LNH MALT	linfocitos pequeños, inmunoblastos, centroblastos, con diferenciación plasmácica en 33%	7 al 8%, adultos jóvenes 50% de los linfomas gástricos	Infiltración medular oscila entre 2 y 20%.	CD20, CD79a, CD11c (débil), CD43, CD21, CD35 (asociados a la zona marginal) IgM>IgA>IgG, restricción de cadenas ligeras	t(11;18)(q21;q21) (API2/MLT) t(1;14)(p22;q32) (BCL10) t(14;18)(q32;q21) (MALT1) t(3;14)(p14.1;q32) (FOXP1)
AGRESIVOS					
Linfoma de células del Manto	Difuso, Centrocitos de la zona del manto o folicular.	3 al 10%, adultos mayores	Sitios extralinfoideos se diagnostican en estadios clínicos III o IV.	CD5 ⁺ y CD23 ⁻ , CD43 IgM, IgD Restricción lambda>kappa Negativo a CD10 y Bcl-6	t(11,14), ciclina D1
Linfoma difuso de células grandes B	Difuso, mitosis abundantes Inmunoblastos, centroblastos	30 al 60% adultos jóvenes	crecimiento tumoral rápido a nivel nodal o extranodal 40%	CD20 ⁺ , CD20 ⁺ , CD22 y CD79 IgM>IgG>IgA. CD10 ⁺ (30-60%)	t(14;18) (20-30%) del3q27 (30%) BCL-6 (60-90%) Alteraciones de BCL-2
MUY AGRESIVOS					
Linfoma de Burkitt	crecimiento extremadamente rápido, centroblasto	México < del 3% África 25 -40%	Infiltración extranodal	CD19, CD20, CD79a	t(8;14),myc, puede coexpresar BCL-6

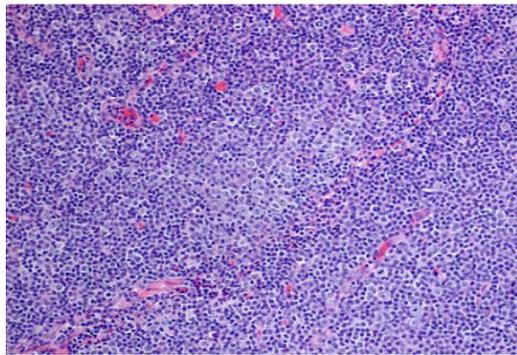
*Hematología Clínica, Sans-Sabrafen ,2006



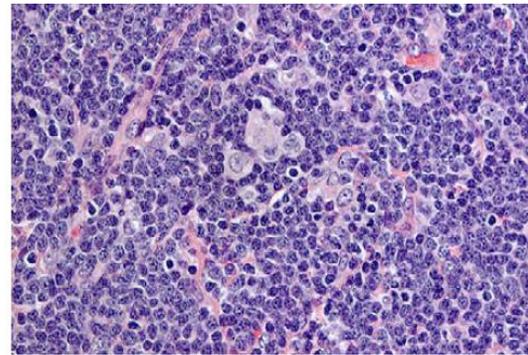
Linfoma folicular



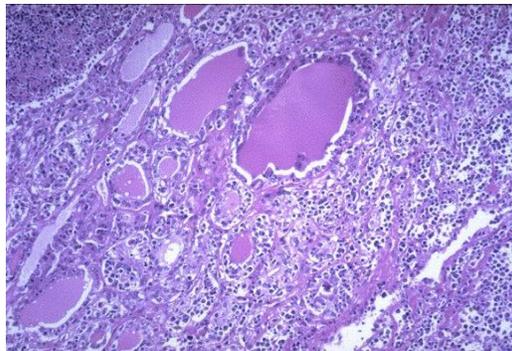
Linfoma difuso de células grandes B



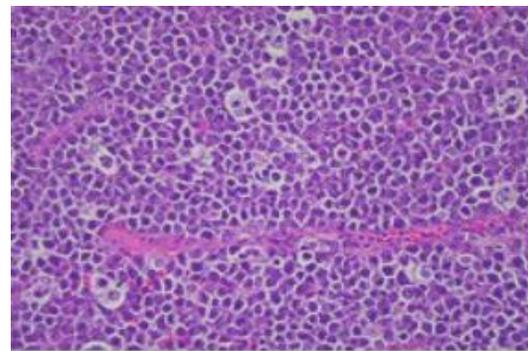
Linfoma linfocítico de células pequeñas



Linfoma de células del manto



Linfoma MALT gástrico



Linfoma de Burkitt.

Figura 9. Variedades del LNH

**Hematology Oncology Clinics of North America 2008*

2.5.2. Clínica del LNH

2.5.2.1. Manifestaciones clínicas

La manifestación más importante de este tipo de linfoma es el agrandamiento no doloroso de los ganglios periféricos (adenomegalias); predominantemente en la región cervical, aun cuando cada tipo de LNH tiene elementos particulares. Existen LNH con componentes extraganglionares como única manifestación. El cuadro clínico muestra que el 95% de los casos presenta adenomegalia sintomática, así como en cuello, axila, ingle y mediastino. También se presenta de fiebre, debilidad, pérdida del apetito, dolor de huesos y sudoraciones nocturnas (123, 124)

2.5.2.2. Diagnóstico

El diagnóstico se lleva a cabo mediante un estudio histopatológico de una muestra de tejido obtenida de forma incisional o escisional y un estudio de inmunofenotipo, además de los exámenes de laboratorio tales como biometría hemática completa, química sanguínea, pruebas de función hepática, deshidrogenasa láctica (LDH), fosfatasa alcalina, β_2 microglobulina, electrolitos séricos (124, 125, 126). Se realizan también aspirado de medula ósea y biopsia de hueso, así como exámenes de gabinete tales como radiografía y tomografía axial computarizada (TAC) de tórax, abdomen, pelvis, y PET. Este último como parámetro para evaluar la respuesta al tratamiento. En caso de sospecha y/o infiltración de SNC se recomienda realizar punción lumbar, citoquímico con LDH, citológico y citometría de flujo; además tomografía computarizada de cráneo y/o resonancia magnética nuclear (127, 128).

2.5.3. Factores pronóstico

El conocimiento de los factores pronóstico es de suma importancia ya que de esta manera se puede realizar un tratamiento individualizado utilizando regímenes atenuados para aquellos pacientes de bajo riesgo y seleccionando otros más intensivos o experimentales para los que presenten características de peor pronóstico. Frente a esta realidad investigadores y grupos clínicos han intentado ahondar en los factores o parámetros clínicos, histológicos, biológicos, que

puedan predecir una recaída o una larga sobrevida. Los factores pronósticos en los pacientes con LNH proporcionan un método de evaluación del curso probable de la enfermedad y ayudan a la toma de decisión sobre el tratamiento. Una vez efectuado el diagnóstico se debe proceder a estadificar la neoplasia. Los factores que se utilizan en el linfoma son: el estadio clínico, el estado funcional (ECOG), Índice pronóstico internacional (IPI); éste último agrupa varios factores importantes, en conjunto el hematólogo estadifica al paciente y determina el tratamiento (123,128).

2.5.3.1. Estadio clínico

La extensión del linfoma se determina por la clasificación Ann Arbor, se basa en el concepto de origen unifocal de la enfermedad y en su propagación progresiva, es utilizado en el LH y en el LNH (123,128).

Tabla 6. Estadios clínicos de los Linfomas

Estadio I. Una sola región ganglionar o un solo sitio extralinfático localizado.

Estadio II. Dos o más regiones ganglionares del mismo lado del diafragma.

Estadio III. Regiones ganglionares a ambos lados del diafragma.

Estadio IV. Infiltración difusa o diseminada de uno o más órganos extranodales con o sin involucro de ganglios linfáticos.

Síntomas

A. Sin síntomas sistémicos

B. Con síntomas sistémicos (fiebre > 38°, diaforesis, pérdida de peso de > 10% en los últimos 6 meses)

X. Enfermedad voluminosa. Ganglio > 10 cm en el diámetro máximo o tumor mediastinal > de una tercera parte del diámetro interno del tórax en la radiografía, medido entre T5/T6.

2.5.3.2. Estado funcional (ECOG)

La Escala ECOG fue desarrollada por el Grupo Cooperativo de Oncólogos del Este (ECOG es la abreviación de este nombre en Inglés) en 1955. El Grupo Cooperativo de Oncólogos del Este fue uno de los primeros grupos cooperativos que realizó pruebas clínicas multicéntricas para estudiar nuevas formas de tratamiento de cáncer (Tabla 7). Fue diseñada para mejor evaluación de eficacia de tratamiento en pruebas clínicas, basándose principalmente en la libertad de ejercer actividades de un paciente después del tratamiento. Es utilizado en todos los tipos de cáncer. (123,128).

Tabla 7. Estado de la actividad de los pacientes con cáncer de acuerdo a la escala ECOG

0	Completamente activo, capaz de realizar toda actividad previa a la enfermedad sin restricciones.
1	Restringido en la actividad física enérgica, pero está en régimen ambulatorio y es capaz de realizar el trabajo de naturaleza ligera o sedentaria (como trabajo de la casa ligero, o trabajo de oficina).
2	En régimen ambulatorio y capaz de cuidar de sí mismo, pero incapaz de realizar ninguna actividad de trabajo. Tiene que quedarse encamado durante < 50% de las horas de vigilia.
3	Capacidad limitada de cuidar de sí mismo, confinado a la cama o una silla durante más del 50% de las horas de vigilia.
4	Totalmente incapaz. No puede cuidar de sí mismo. Totalmente confinado a la cama o una silla.
5	Muerto.

2.5.3.3. Índice internacional de pronóstico (IPI)

El IPI es el índice pronóstico para linfomas agresivos. Fue desarrollado a partir 2031 pacientes de todas las edades con LNH agresivo que recibían tratamiento con doxorubicina. El estudio identificó 5 características clínicas que fueron asociadas con sobrevida: edad, estadio, número de lugares extraganglionares, estado funcional (ECOG) y nivel sérico de LDH.

El riesgo relativo de muerte en los pacientes con cada número posible de factores pronósticos adversos se determinó y se elaboró un índice de riesgo (128,129). En la tabla 8 se muestran los factores de riesgo que se incluyen en el IPI y su relación con el pronóstico ya sea favorable o desfavorable. La sobrevida según el IPI se realiza tomando el número de factores pronóstico que tenga cada paciente, finalmente el pronóstico del IPI los agrupa en pacientes con bajo riesgo, riesgo intermedio-bajo, riesgo intermedio-alto y alto riesgo; la sobrevida para cada uno de éstos grupos se detalla en la Tabla 9.

Tabla 8. Índice Internacional de pronóstico para LNH

	Favorable	Desfavorable
Edad (años)	≤ 60	>60
Estadio Clínico	1 ó 2	3 ó 4
Sitios extranodales	≤ 1	> 1
Estado funcional (ECOG)	0 ó 1	≥2
LDH (lactato deshidrogenasa)	Normal	Elevado

Tabla 9. Sobrevida según el IPI

<i>Pronóstico IPI</i>	<i>No. de factores</i>	<i>Sobrevida a 5 años (%)</i>
Bajo Riesgo	1 ó 2	73
Riesgo Intermedio-bajo	2	51
Riesgo intermedio-alto	3	43
Alto riesgo	4 o 5	26

2.6. Linfoma de Hodgkin

El LH se considera actualmente como una proliferación clonal maligna de células B (OMS, 2008) también es correcto llamarle enfermedad de Hodgkin (EH). Desde su descripción ha sido esta enfermedad ha sido muy controvertida en cuanto a su origen se demostró que se semejaba mucho a los casos de tuberculosis ganglionar considerándose ésta durante el siglo XIX como la base de su etiología, incluyendo las observaciones del médico alemán Sternberg en 1898, quién describió que la célula gigante que es característica de la patología. Fue hasta 1902 que la Dra. Dorothy Reed en EE.UU. realizó nuevos estudios separándola definitivamente de la tuberculosis y en la comunidad científica se le reconoce como célula de Reed-Sternberg (RS). Sin embargo, hasta la fecha algunos la consideran como respuesta inflamatoria crónica a algunos agentes patógenos como los virus, el más relacionado y estudiado es el virus de Epstein-Barr (VEB). Las personas con EH tienen títulos más elevados de Ac contra c1 VEB y en los estudios histopatológicos de las biopsias ganglionares en el interior de las células de RS se han encontrado proteínas del genoma del VEB (123, 124).

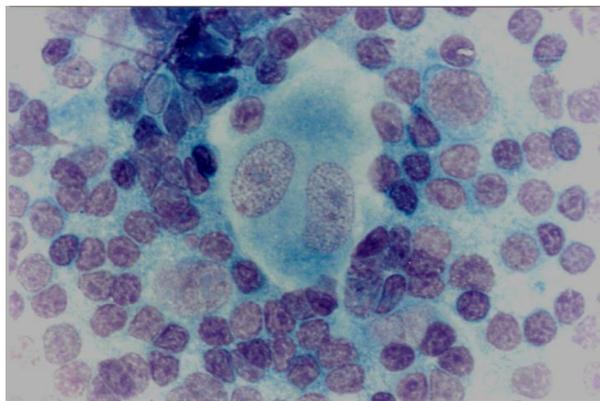


Figura 10. Linfoma de Hodgkin

*HGM, Servicio de Hematología

A la fecha la célula de RS es la célula característica para establecer el diagnóstico de esta neoplasia, mide entre 15 a 45 μm de diámetro, citoplasma abundante, ligeramente eosinofílico, núcleo bi o multilobulado, generalmente presenta 2 nucleólos, eosinofílicos y prominentes dando la impresión de una cara de buho (figura 10).

La incidencia de la EH en EE. UU. y países industrializados incluyendo los latinoamericanos, se ha encontrado en 6 casos por 100,000 habitantes. En relación a la edad hay variaciones importantes en EE.UU. se observa una curva bimodal con un pico en los 20 años y otra en los 50, en el Hospital General de México también ha sido bimodal pero los picos están a los 8 y a los 20 años de edad respectivamente. En cuanto al sexo, predomina en los varones adultos 2:1, pero en los niños es de 3: 1 y en algunos países latinoamericanos incluyendo el nuestro hasta de 10: 1.

La clasificación del LH se basa principalmente en la presencia de células RS y la proporción de linfocitos y otras células infiltradas. Existen dos categorías de la Enfermedad de Hodgkin (Tabla 10): La EH con predominio linfocítico (EHNPL) y las formas clásicas de la EH que se dividen en cuatro, de forma general se dividen en el tipo de celularidad, el tipo de sintomatología y los estadios clínicos en que se presentan. El tipo de LH con mayor frecuencia en nuestro país es el de celularidad mixta en un 61% de los casos (123, 124).

Tabla 10. Clasificación histopatológica de la enfermedad de Hodgkin (OMS 1997)

I. Nodular de predominio linfocítico
II. Formas clásicas:
Rico en linfocitos
Esclerosis nodular
Celularidad mixta
Depleción linfocitaria

2.6.1. Evolución clínica del LH

Este tipo de linfoma inicialmente se presenta con un crecimiento ganglionar asintomático en más de 90% de los casos las localizaciones cervicales y supraclaviculares (60%) son las más frecuentes, predominan del lado izquierdo en 60 a 70%, axilares 11 %, inguinales 9%, retroperitoneales 4%. El tiempo de evolución inicial es lento dura años o meses como lesión única y posteriormente van apareciendo otras adenomegalias en el mismo sitio formando conglomerados, si el tamaño sobrepasa los 10 cm de diámetro estamos ante la presencia de "masa voluminosa" de pronóstico adverso.

En EH comparada con los LNH su evolución es más lenta de meses o años. Dependiendo del tamaño de las masas y el sitio, pueden dar datos por compresión, como en el mediastino o el retroperitoneo. Muy rara vez se rompe la cápsula con infiltración a tejidos vecinos. La presencia de masa mediastinal es más frecuente en la variedad de LH nodular esclerosante.

Cuando la enfermedad deja de ser localizada y empieza a diseminarse van apareciendo los síntomas generales debido a la liberación de diversos factores como Interleucina 2 (IL-2), factor de necrosis tumoral (TNF), interferón gamma (IF γ), etc. El paciente empieza con hiporexia, adelgazamiento, fiebre sin proceso infeccioso, la cual se presenta característicamente por las tardes o noches llega a 38 °C o más y es seguida de diaforesis nocturna muy intensa, tanto que los pacientes refieren dejar mojadas las sabanas, esta viene por periodos variables y después remite por unos días y vuelve a aparecer. Finalmente en los casos avanzados por infiltración a diversos órganos viene la falla orgánica múltiple y la muerte (130).

2.7. Tratamiento del Linfoma

Las opciones terapéuticas para un paciente se basan en el tipo de linfoma y en la presencia o ausencia de factores pronósticos adversos, el grupo de riesgo al que se haya asignado y las condiciones especiales del paciente (Tabla 11). Estas opciones van, desde "observar y esperar" para los linfomas indolentes, hasta las dosis altas de quimioterapia para los más agresivos.

Tabla 11. Tratamiento farmacológico en linfoma

Linfomas indolentes
Pacientes con estadios I-II, sin enfermedad voluminosa y si factores de riesgo, se da radioterapia localizada o únicamente observación.
Pacientes con factores de riesgo se les proporciona quimioterapia más radioterapia
Pacientes con enfermedad voluminosa o estadios III-IV, se administra R-CHOP o R-CVP o FR
Linfomas Agresivos
Pacientes en estadios I-II sin enfermedad voluminosa y sin otros factores de riesgo: Inducción R-CHOP x 3 ciclos, mas radioterapia (30-36 Gy)
Pacientes III y IV + IPI ajustado a edad: R-CHOP 6-8 ciclos o esquemas intensificados

El esquema de poliquimioterapia CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona) se ha utilizado por más de 20 años para el tratamiento del LNH. El tratamiento de primera línea por ejemplo en el LDCGB está relacionado con la extensión de la enfermedad; los estadios iniciales I y II (Rituximab-CHOP 6 ciclos), III y IV (R-CHOP 6 a 8 ciclos). En el caso de tumores voluminosos se utiliza radioterapia. Para el mantenimiento posterior al tratamiento se utiliza Rituximab 4 dosis cada 6 semanas. En caso de recaída se utiliza 2 ciclos del esquema R-ICE (rituximab, ifosfamida, carboplatino y etopósido) o bien 4 ciclos del esquema DEP (dexametasona, etopósido y cisplatino) (129, 130, 131). El anticuerpo monoclonal quimérico contra CD20 (rituximab) mostró actividad significativa en pacientes previamente tratados, con respuestas hasta de 48% y una mediana de tiempo de progresión de 13 meses, se ha informado de su utilidad como terapia de mantenimiento y el tiempo de recaída ha sido significativamente mayor en un grupo de pacientes con terapia de mantenimiento.

El esquema de tratamiento estándar en el LH, es el ABVD (adriamicina, bleomicina, vinblastina y dacarbazina) tiene resultados de una supervivencia libre de enfermedad (SLE) a 5 años del 70 a 80%, la radioterapia a masas residuales después de quimioterapia se recomienda a dosis de 15 a 20 Gy aumentan los porcentajes de SLE (130, 131,132).

Habitualmente los estadios iniciales I y II tienen un buen pronóstico, la radioterapia tiene una SLE a 5 años de 80 a 90%; en etapas III a IV los reportes son desfavorables con una SLE no mayor a dos años (132). Desafortunadamente 30 al 40% de los pacientes con LH y del 60 al 90% con LNH recaen después del primer tratamiento y posteriormente desarrollan resistencia a los quimioterapéuticos quedando fuera de las posibilidades de curación. Si bien, se tiene como alternativa el trasplante de médula ósea (MO) autólogo después de dosis altas de quimioterapia, los resultados obtenidos en algunos centros son remisiones completas en 34% de los casos y SLE a tres años entre 30 a 40% (132). Estos datos indican la necesidad de contar con marcadores moleculares como los CTA que puedan contribuir al diagnóstico y pronóstico así como el poder utilizarlos para encontrar nuevas formas de tratamiento para mejorar la expectativa de curación en este padecimiento.

2. Justificación

El linfoma es la neoplasia linfoide de mayor incidencia con un 30 al 60% de casos diagnosticados en el caso de México el mayor numero corresponde a LDCGB. Este tipo de linfoma muestra un curso clínico agresivo y las cifras de curación son de tan solo el 40%. A pesar de los avances moleculares en el diagnóstico y la caracterización de esta enfermedad, no se cuenta con marcadores moleculares que puedan, no solo predecir la sobrevida, sino estar relacionados con factores clínicos y con la progresión del tumor. Los CTA son genes que solo se expresan durante el desarrollo embrionario y se sabe participan en la proliferación celular e inactivación de la apoptosis y en la etapa adulta se encuentran inactivos. En las células tumorales se activan debido a cambios epigenéticos y participan activamente en la progresión y desarrollo del proceso neoplásicos. Se ha descrito que los CTA se expresan en varios tipos de cáncer y que pueden no solo ser utilizados como marcadores tumorales sino también como factores predictivos en la sobrevida, sin dejar de lado su uso en inmunoterapias. En el caso de linfoma los trabajos internacionales son escasos y no existen hasta el momento marcadores moleculares que puedan ser predictivos y que estén relacionados con factores pronósticos ya conocidos. Es por eso la necesidad de conocer la frecuencia de los CTA, así como si pueden ser marcadores moleculares de pronóstico en esta neoplasia.

3. Hipótesis

Los pacientes con linfoma que expresan alguno de los CTA tendrán un pronóstico desfavorable reflejándose en una menor sobrevida

4. Objetivo

4.1. General

Analizar la expresión de los genes CTA y su posible correlación con diferentes parámetros clínicos y la sobrevida en pacientes con linfoma.

4.2. Específicos

- Analizar la expresión del mRNA de los genes *MAGE-A3 /A6*, *MAGEA4*, *MAGE-B2*, *MAGE - C1/CT7*, *NY-ESO1*, *LAGE-1* y *GAGE* en pacientes con linfoma
- Determinar la frecuencia en la expresión de los genes CTA analizados
- Realizar una correlación clínica entre la expresión de los genes CTA y los parámetros clínicos
- Analizar la sobrevida de los pacientes en relación a la presencia o ausencia de los genes CTA

5. Diseño Experimental

Estudio de tipo prospectivo y transversal.

5.1. Criterios de inclusión

Pacientes con diagnóstico de linfoma, sin tratamiento de quimioterapia, hombres y mujeres, mayores de 18 años, que se les haya realizado biopsia de ganglio y que cuenten con carta de consentimiento informado firmada.

5.2. Criterios de no inclusión

Pacientes sin diagnóstico de linfoma, que hayan recibido tratamiento anti-neoplásico, menores de 16 años, o que no acepten el consentimiento informado.

5.3. Criterios de eliminación

Aquellos pacientes que abandonen el tratamiento y/o aquellos pacientes que no cuenten con expediente clínico.

5.4. Variables

Dependiente: La sobrevida del paciente y el pronóstico.

Independiente: Presencia o ausencia de la expresión de los genes CTA.

5.5. Tamaño de la muestra.

El tamaño de muestra se determinó utilizando el programa de cómputo gPLINK desarrollado por el Broad Institute of Harvard, considerando que la prevalencia del LCBDG es de 0.010 respectivamente, un poder estadístico del 80% y un nivel de significancia (α de 0.05). El tamaño de la muestra calculada fue de 45 pacientes.

6. Metodología

6.1. Material biológico

6.1.1. Tejido de pacientes con linfoma

A cada paciente con probable diagnóstico de linfoma se le realizó una biopsia de nódulo linfático para el análisis histopatológico e inmunológico para su clasificación y procedimiento terapéutico. Inmediatamente después de la cirugía, el tejido se colectó en Solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) con antibióticos, se disgregó y se obtuvieron alícuotas para la extracción de mRNA y proteína y se almacenaron a -80°C .

Se incluyeron en el estudio pacientes con diagnóstico de linfoma del Servicio de Hematología del Hospital General de México durante un periodo de 3 años a los que se les dio un seguimiento clínico de 5.5 años.

6.1.2. Células de donadores sanos

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de donadores sanos para la obtención de células mononucleares mediante el método de gradiente de ficoll-hypaque, para ser utilizados como controles negativos en los ensayos de RT-PCR.

6.1.3. Tejido testicular normal

Se obtuvieron biopsias de tejido testicular normal de pacientes masculinos con diagnóstico de hiperplasia prostática, como parte del tratamiento de su patología se les realizó una extirpación testicular de la que se obtuvo un fragmento. El procedimiento fue realizado en la unidad de Urología del Hospital General de México.

6.1.4. Líneas celulares

Se usó la línea celular K562 derivada de una paciente con Leucemia Mieloide Crónica (LMC) como control positivo para valorar la expresión del mRNA de los CTA (Serrano 1995). La línea celular se cultivo en medio RPMI-1640 (Invitrogen, Life Technologies Carlsbad, CA suplementado con 10% de suero fetal bovino (Invitrogen, Life Technologies Carlsbad, CA) y L- glutamina 2mM, piruvato de sodio 1mM (Hyclone Laboratories), penicilina/estreptomicina 1% y 2-mercaptoetanol 50M (Invitrogen, Life Technologies Carlsbad, CA). Las células crecieron en condiciones de CO₂ al 5% y 37° C. Adicional a la línea K562, se realizó un análisis para valorar la expresión de CTA en las líneas celulares hematopoyéticas REH, (Leucemia Linfocítica Aguda no T, no B), Jurkat (Leucemia Aguda de Células T), HL60 (Leucemia Promielocítica Aguda), Molt-4 (Leucemia Linfoblástica Aguda -T), U-937 (Leucemia aguda mieloblástica), Raji (Linfoma de Burkitt), Ramos (Linfoma de Burkitt).

6.2. Separación de células mononucleares

Se colectaron muestras de sangre periférica de donadores sanos, usando una jeringa previamente heparinizada para evitar la coagulación. Las muestras obtenidas se mezclaron a una proporción 1:1 suavemente con solución de fosfatos (PBS 1X). Una vez homogenizada se empleo Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Nycomed Pharmacia AS Oslo, Norway) utilizando aproximadamente 1/3 del volumen total de sangre. Las muestras se centrifugaron a 1500 g por 30 minutos a una temperatura de 4°C. Posteriormente se observaron las interfases de sangre, ficoll, mononucleares y plasma y se separaron las células mononucleares con pipeta Pasteur. Se centrifugaron a 2500 g durante 10 minutos. Las células fueron almacenadas a -85 °C hasta su uso.

6.3. Extracción de RNA

6.3.1. Aislamiento del RNA total en células mononucleadas y líneas celulares

El RNA total fue aislado de las células mononucleares obtenidas de los donadores sanos así como de las líneas celulares mediante el uso de Trizol[®] (Invitrogen, Life Technologies Carlsbad, CA) de acuerdo a las recomendaciones del proveedor. Se homogenizó el paquete celular con 1ml de Trizol[®] y se incubó la muestra durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se le adicionaron 0.2 ml de cloroformo y se agitó durante 15 segundos centrifugando a 12,000 g durante 15 minutos a

4° C. Después de la centrifugación se observaron tres fases: En la parte inferior rojo (Trizol); en la intermedia blanco (DNA y proteínas) y en la superior (RNA). Se recuperó esta última y se procedió a la precipitación con isopropanol incubando a -20°C durante 15 minutos, repitiendo las condiciones de centrifugación. El pellet se lavó con etanol al 75% y se resuspendió en agua con DPEC. Para linealizar el RNA se incubó a 70°C durante 10 minutos.

6.3.2. Aislamiento de RNA total de tejidos

En el caso de las biopsias de los pacientes con linfoma y el tejido testicular normal se disgregaron (aún congelados) colocándolas en un tubo eppendorf con 1 mL de Trizol por cada 50 a 100 mg de tejido. Ambos tejidos se homogenizaron con ayuda del vortex con el fin de disgregar por completo el tejido; se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos y se centrifugó a 12 000 g durante 10 minutos a 4°C con la finalidad de eliminar el exceso de grasa, proteínas y otro material extracelular. El sobrenadante se recuperó y se transfirió a un tubo limpio al que se le adicionó cloroformo y se centrifugó a 10000 g durante 10 minutos a 4°C. Después de la centrifugación se recuperó la última fase, se precipitó con isopropanol incubando a -20°C durante 15 minutos y repitiendo las condiciones de centrifugación. El pellet se lavó con etanol, se resuspendió y alineó a 70°C por 10 minutos. La integridad se verificó en la forma descrita anteriormente.

6.3.3. Integridad y Cuantificación del RNA

La concentración y pureza se determinó midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm respectivamente en un espectrofotómetro (JENWAY 6105 U.V). La calidad e integridad del RNA se corroboró mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio con 2 µg de RNA de cada muestra, durante 35 minutos a 70 volts. El gel fue visualizado en el transiluminador Foto/UV21, Fotodyne; observándose las bandas RNA ribosomal 18 y 28 S. Se almacenó a -85° C hasta su uso.

6.4. PCR en punto final

El cDNA de los donadores normales, los pacientes con linfoma y los controles se sintetizó a partir de 2µg de RNA total, el volumen final de cDNA fue de 20 µl. El RNA se mezcló con 1 µl de oligo dT 12-18 (INVITROGEN, Carlsbad, CA) y 1 µl de dNTPs 10mM (Applied Biosystems, Roche) la mezcla se incubó a 65°C durante 5 minutos y se colocó en hielo. Se adicionaron 4 µl de Buffer 5X (Tris- HCl 250mM, KCl 375 mM MgCl₂ 15mM), 2 µl de DTT (0.1M) el volumen correspondiente de H₂O y se incubó a 37°C durante 2 minutos posteriormente se adicionó 1 µl de M-MLV RT (200U) (INVITROGEN, Carlsbad, CA) y se incubó a 37°C durante 50 minutos, la enzima se inactivó incubando a 70°C por 15 minutos. La amplificación de los genes CTA se realizó con primers (Anexo1) previamente reportados (90) en un volumen final de 10µL en los que se mezclaron 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 100 µM dNTPs, 0.2 U Taq DNA polimerasa, (INVITROGEN, Carlsbad, CA) 0.5µM primer sentido, 0.5 µM primer antisentido y 1 µL de cDNA, en la tabla 11 se detalla el gen, los exones y las condiciones de amplificación a continuación:

Tabla 11. Condiciones de amplificación de los genes CTA

CTA	Fragmento (pb)	Exones amplificados	Condiciones de amplificación
MAGE A3	725	1 Y 3	94°C 5', 94°C 1', 67°C 1', 72°C 1' 35 ciclos y 72°C 10'
MAGE B2	230	3 Y 4	
MAGE C1	631	1 Y 2	
NY-ESO 1	307	2 y 3	
MAGE A4	523	3 Y 4	94°C 5', 94°C 1', 62°C 1', 72°C 1' 30 ciclos y 72°C 10'
GAGE	198	1 Y 2	
BAGE4	294	2 Y 3	94°C 5', 94°C 1', 57°C 1', 72°C 1' 30 ciclos y 72°C 10'
LAGE 1	332	2 Y 3	94°C 5', 94°C 1', 69 °C 1', 72°C 1' 30 ciclos y 72°C 10'
GAPDH	397	3 y 4	94°C 5', 94°C 1', 55°C 1', 72°C 1' 30 ciclos y 72°C 10'

6.5. Secuenciación de los CTA

Los fragmentos amplificados por RT-PCR se secuenciaron con el kit de secuencia (ABI Prism Dye Terminator Cycle sequencing). La secuencia fue alineada en el programa BLASTN del Gene-Bank por medio de alineamientos de la secuencia problema ya reportada.

6.6. qRT-PCR

Para la cuantificación de los CTA, se utilizó el cDNA a una concentración de 2 µg/µl, a éste se le adicionaron 10 µl de SYBR Green PCR Master Mix, (Applied Biosystems, Life Technologies) 0.2 µl de primer forward (10 pM/µL) y 0.2 µl primer reverse (10 pM/µL) en un volumen final de 20 µl. Las condiciones de amplificación fueron las utilizadas en PCR en punto final y las muestras se corrieron por triplicado. Se hizo una cuantificación relativa por medio de $\Delta\Delta C_t$ en el equipo StepOne™, (Applied Biosystems® Life Technologies).

6.7. Seguimiento clínico de los pacientes

El seguimiento clínico de los pacientes se realizó en las consultas subsecuentes con el apoyo del médico de base y con la consulta continua de los expedientes. Se creó una base de datos con el registro y folio de cada paciente, incluyendo parámetros clínicos relevantes tales como edad, sexo, LDH, exposición a mielotóxicos, tipo y respuesta al tratamiento, fecha de inicio y fecha de última consulta.

6.8. Análisis Estadístico

Se realizaron pruebas estadísticas para comprobar la normalidad de los datos con variables continuas, así como los estadísticos descriptivos de cada una (media, mediana, rango etc.). Posterior a esto, se aplicaron pruebas de T para los datos paramétricos y la U- de Mann Whitney para los no paramétricos. La correlación entre la expresión de los CTA y los datos clínicos se realizó con la prueba de Chi- cuadrada y/ o Prueba de Pearson para aquellas con datos menores de 5. Para el análisis de sobrevida se tomó en cuenta la fecha de inicio y término del estudio para obtener el tiempo de sobrevida, el estado del paciente (vivo o muerto) y la positividad de cada gen, se aplicó curva de sobrevida de Kaplan-Meier y de Long-Rank. Se utilizó el programa estadístico S.P.S.S. versión 15 (Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, USA).

6.9. Detección de la proteína *MAGE*

La detección de la proteína se realizó por medio de inmunohistoquímica y Western blot. El control positivo fue una biopsia de tejido testicular normal de un paciente con alteraciones prostáticas donado por el Servicio de Urología del Hospital General de México.

6.9.1. Inmunohistoquímica

El tejido testicular se fijo en paraformaldehído al 4% durante 48 horas, posteriormente se realizó la deshidratación del tejido por medio de graduaciones de alcohol desde el 70% hasta el 100% cada uno durante una hora hasta llegar a xilol y parafina. Una vez terminado el proceso de deshidratación, el tejido se incluyó en bloques de parafina dejando secar durante toda la noche. Los cortes realizados fueron de 5 micras comprobando su integridad con una tinción de hematoxilina-eosina. Las laminillas fueron desparafinadas y rehidratadas por medio de pasos en xilol, alcohol del 100% y hasta el 70% cada paso durante 15 min. Una vez hidratado el tejido se permeabilizó con PBS- Triton durante 30 minutos, se realizaron 3 lavados de 10 min con PBS-tween 20 al 0.2%.

Para inhibir la peroxidasa endógena se utilizó una incubación durante 30 seg con metanol- H_2O_2 al 3%; Se lavó para quitar el exceso en la forma antes mencionada. Para el bloqueo de sitios inespecíficos se utiliza BSA al 10% durante 1 hora a temperatura ambiente, posteriormente se incubó con el anticuerpo primario *MAGE 6C1* (Zymed)) en una dilución 1: 200 a 4°C durante toda la noche. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se realizaron lavados con PBS-tween 20 al 0.2% para quitar el exceso de anticuerpo no unido y se incubó con el segundo anticuerpo anti-biotina (Zymed) en una dilución 1:250 durante 1 hora a temperatura ambiente, después de 3 lavados; se adicionó el complejo estreptavidina-peroxidasa incubando durante 30 min, posteriormente se repitieron los lavados y se realizó el revelado con diaminobencidina (DAB) y se realizó la contratinción con hematoxilina-eosina.

6.9.2. Western-blot

Las proteínas fueron extraídas de la línea celular K562 descrita como positiva para el gen *MAGE*. Por cada 10×10^6 de células se adicionaron en frío 500 μ l de buffer RIPA con NaF 25mM y ortovanadato 1mM, 100mg/ml de RIPA e inhibidores de proteasas. Para romper las células se pasaron por una jeringa 10 veces con aguja calibre 21 o 22, Posteriormente se centrifugaron a 10000 g x 10 min a 4°C. El sobrenadante se recuperó, alícuotó y se procedió a cuantificar. El resto se almacena a -80°C.

En el caso del tejido se utilizó una solución amortiguadora que contenía: Tris-HCL pH 8 50mM, EDTA 5mM, NaCl 150mM, 0.5% NP40, PMSF 1mM; la cantidad utilizada fue de 1mL / gramo de tejido. Una vez adicionado el buffer se incubó en hielo durante 20 min y se disgregó utilizando un homogenizador, para evitar la degradación de las proteínas. Cuando la muestra se observó sin restos de tejido se centrifugó a 10000 rpm x 10 min a 4°C. El sobrenadante se recuperó y se repitieron las centrifugaciones en las mismas condiciones.

6.9.2.1. Cuantificación de proteínas

La cuantificación se realizó utilizando un Kit de Bio Rad DC Protein Assay. Una vez efectuada la lectura en el espectrofotómetro a 650nm se realizó la curva patrón y se realizaron alícuotas a 30 μ g.

6.9.2.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida

La electroforesis se realizó en el equipo Miniprotean 3 (Bio-Rad Laboratorios). El gel separador se preparó a una concentración al 10% y contenía: 12.5ml H₂O, 15 ml de acrilamida al 30%, 9.5 ml Resolving gel buffer (RGB) [Tris-HCl 1.5M, pH 8.8]; 560 μ l de APS (Persulfato de amonio) al 10% (Bio-Rad Laboratorios) y 2.5 μ l TEMED (GIBCO- BLR). Una vez polimerizado se procedió a la preparación del gel concentrador el cual contenía 10ml H₂O, 3ml acrilamida al 30%, 4.44ml Stacking gel buffer (SGB) [Tris-HCl 0.5M, pH 6.8 4x], 280 μ l APS al 10% (Bio-Rad Laboratorios) y 50 μ l TEMED (GIBCO- BLR), se utilizó un peine de 10 pozos de 0.75 mm, una vez polimerizado se retiró el peine y se adicionó el Running buffer (Tris- base 0.25 M, Glicina 2M, SDS al 10 % en agua desionizada) a la cámara. Se cargaron las muestras previamente hervidas durante 5 minutos y mezcladas con 2X Sample buffer (Buffer reductor SDS) en una proporción 1:1. Se utilizó marcador de peso Precision Plus Protein Standards (Bio- Rad Laboratorios) para

referencia del peso molecular de las proteínas. Las condiciones de corrida fueron 25 mA durante 40 minutos.

6.9.2.3. Transferencia

Una vez terminada la electroforesis el gel fue equilibrado durante 1 hora con buffer de transferencia frío, (Tris 20mM, Glicina 0.2M, Metanol al 20% y agua desionizada H₂O). La transferencia se realizó en una cámara semi-seca, (Bio- Rad Laboratorios) colocando una capa de papel filtro, la membrana de nitrocelulosa, el gel y otra capa de papel filtro. Se conectó y se transfirió a 100 mA durante 45 minutos. La transferencia se verificó tiñendo la membrana con rojo de Ponceau y observando el patrón de bandeo. Se destiñó con PBS pH7.3 y se dejó bloqueando con PBS-leche (Svelty) 5% durante 1 hora a temperatura ambiente.

6.9.2.4. Detección de las proteínas

La membrana se incubó con el anticuerpo primario (anti-*MAGE* o anti-actina) toda la noche a 4°C, al día siguiente se realizan 3 lavados con PBS-tween al 0.2% cada uno de 10 min. Se adiciono el anticuerpo secundario y se incubó durante 1 hora (Tabla 12). Se realizaron lavados bajo las mismas condiciones mencionadas y se procedió a efectuar el revelado de tipo cromogénico.

Tabla 12. Condiciones de utilización de los anticuerpos

Anticuerpos	Dilución	Proteína detectada	Peso esperado
<i>MAGE</i> 6C1 (ZYMED), monoclonal	1:500	<i>MAGE</i> 1,2,3,4,6,10,12	45-50 KDa
		<i>MAGE</i> 10	72 KDa
<i>MAGE</i> FL-309 (SANTA CRUZ) polyclonal	1:500	<i>MAGE</i> A	46 KDa
Tubulina (SANTA CRUZ), monoclonal	1:1000	Tubulina	56 KDa
Anti-mouse- HRP (Amersham)	1: 1000		
Anti-rabbit- HRP (Amersham)	1: 1000		

7. Resultados

7.1. Expresión de CTA a nivel de mRNA en tejido testicular

Se realizó la extracción de RNA total, síntesis de cDNA y RT-PCR, según lo descrito en la metodología tanto del control positivo (tejido testicular) y negativo (células mononucleares de donadores sanos) así como de las muestras de pacientes con linfoma.

La expresión de los CTA se demostró a partir del cDNA del tejido testicular y los productos amplificados se muestran en la figura 11, se analizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% el orden de las muestras fue el siguiente (M) corresponde al marcador de 100pb, en el carril 1 el gen constitutivo β_2 microglobulina (β_2M), en el carril 2 el control de reacción (CN), del carril 3 al 9, los genes *MAGE A3* (725pb), 4, *MAGE A4* (523pb); 5, *MAGE B2*(230pb); 6, *MAGE C1* (631); 7, *BAGE* (294 pb), 8, *GAGE* (198pb) y 9, *LAGE* (332/561 pb).

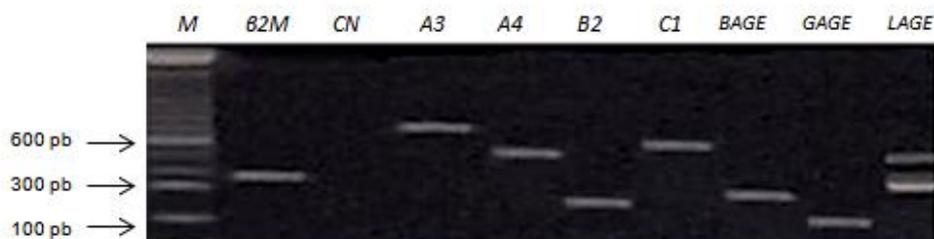


Figura 11. Expresión de genes CTA en tejido testicular

Se muestra la expresión de los CTA en tejido testicular normal. M. Marcador de peso molecular, β_2M ; el gen constitutivo β_2 microglobulina, CN, control de reacción

7.2. Expresión de los genes CTA a nivel de mRNA en líneas celulares hematopoyéticas

Se analizaron 8 líneas celulares hematopoyéticas, (Tabla 13), incluyendo el tejido testicular como control positivo y la línea celular K562 previamente reportada como positiva para los genes de la familia *MAGE* (5). Después del análisis con RT-PCR en punto final se encontró que la línea K562 expresó todo el panel de los CTA. La línea celular HL-60 expresó los genes *MAGE B2* y *GAGE*. Las líneas celulares Jurkat y U937 solo expresaron el gen *GAGE*. Se analizaron también la línea REH (leucemia aguda linfocítica no T, no B); MOLT-4 (leucemia aguda linfocítica de tipo T) y RAJI (linfoma de Burkitt) y RAMOS (linfoma de Burkitt) sin embargo, no mostraron expresión para ningún CTA.

Tabla 13. Expresión de los CTA en líneas celulares

Líneas celulares	MAGE A3	MAGE A4	MAGE B2	MAGE C1	BAGE1	GAGE2	LAGE1	NY ESO1
Tejido testicular	+	+	+	+	+	+	+	+
K562 <i>Leucemia mieloide crónica</i>	+	-	+	+	+	+	+	+
Reh <i>Leucemia aguda no T, no B</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
Jurkat <i>Leucemia aguda -T</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
MOLT-4 <i>Leucemia aguda -T</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
HL-60 <i>Leucemia aguda mieloblástica, M3</i>	+	-	+	-	-	+	-	-
U-937 <i>Leucemia mieloide</i>	-	-	-	-	-	+	-	-
Raji <i>Linfoma de Burkitt</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
Ramos <i>Linfoma de Burkitt</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

7.3. Expresión de los genes CTA a nivel de mRNA en donadores sanos

Para demostrar que los CTA no se expresan en células normales se amplificaron cada uno de los genes CTA en un total de 20 donadores sanos; como control positivo se utilizó el tejido testicular. Como se muestra en la Figura 12, no existe expresión de los genes CTA en ningún donador sano; lo anterior concuerda con lo reportado previamente () y corrobora la especificidad de este grupo de genes en la detección de células neoplásicas.

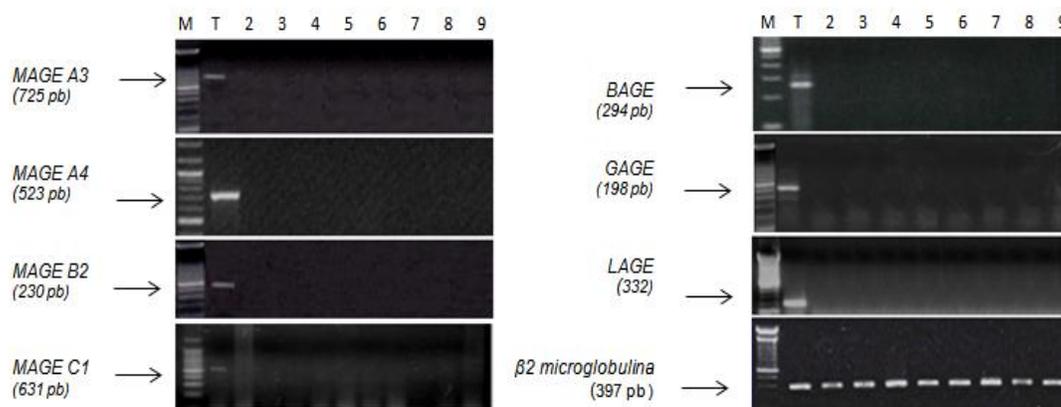


Figura 12. Ausencia de expresión de genes CTA en donadores sanos.

M. Marcador de peso molecular, T control positivo (Tejido testicular), 2-9 control negativo (donadores sanos). Imagen representativa de los 20 donadores

7.4. Caracterización de la muestra de estudio

El diagnóstico de los pacientes incluidos en el estudio, fue realizado en el Servicio de Hematología del HGM en base a estudios que incluyeron; estudio histológico del tumor mediante biopsia, hemograma, LDH, albumina, fosfatasa alcalina, β_2 -microglobulina, rayos X de tórax, TAC de tórax, abdomen y pelvis. Los pacientes fueron diagnosticados y estadificados de acuerdo a la enfermedad localizada (estadio I o II) o diseminada (estadio III o IV) así como el tipo de riesgo, posterior a esto se decide el tratamiento por parte del médico especialista.

A cada paciente se le informó acerca de su participación en el estudio y se procedió a la firma del consentimiento informado. Una vez que el diagnóstico fue definitivo, se descongelaron las biopsias (obtenidas al inicio de sus estudios) y se analizó la de expresión de los CTA.

El periodo de seguimiento fue de 5 años y comprendió de enero del 2005 a diciembre del 2010. Cada uno de los expedientes fue revisado cada tres meses y/o bien en cada consulta hematológica, se obtuvieron los datos clínicos que incluyeron: edad, sexo, estadio clínico, sintomatología B, localización del tumor, agresividad tumoral, exposición a mielotóxicos, neoplasias familiares, ECOG, IPI, LDH, fecha de inicio de tratamiento, tipo de respuesta, estado clínico de la última consulta. Se captaron un total de 136 biopsias de ganglios; cumplieron con los criterios de inclusión 95 de éstas, fueron eliminadas 26 por no contar con el expediente clínico. Se incluyeron en el estudio 69 muestras con diagnóstico de linfoma que contaban con expediente y seguimiento clínico. La media de edad fue de 43 con un rango de 16-72 y una mediana de 47; en relación al sexo un 53.6% (37) correspondió a masculino, mientras el 46.4% (32) a pacientes femeninos.

Las muestras de linfoma se clasificaron según la OMS 2008 y se agruparon en: Neoplasias de células B (n= 46) y Neoplasias de células T (n=13); y Linfoma de Hodgkin, (n=10). La tabla 14 muestra las variedades de linfoma obtenidas así como los subtipos de acuerdo al diagnóstico clínico, morfológico e histopatológico.

Tabla 14. Pacientes incluidos en el estudio para el análisis de los genes CTA

*Neoplasias de Tejidos Linfoides	n= 69	n
Neoplasias de Células B maduras n= 46		
Leucemia linfocítica crónica/Linfoma de linfocitos pequeños		3
Linfoma del centro Folicular		4
Linfoma difuso de Células Grandes B (LDCGB)		28
Linfoma largo de células B rico en células T		5
Linfoma de Células Grandes Anaplásico ALK negativo		3
Linfoma de células B, no clasificable		1
Neoplasias de células T maduras n= 10		
Linfoma periférico de células T		4
Linfoma/leucemia de células T del adulto		6
Linfoma de Hodgkin n= 13		
Linfoma clásico, celularidad mixta		10
Linfoma clásico, esclerosis nodular		3

*Clasificación World Health Organization, 2008

En estudios previos realizados en diferentes instituciones nacionales (INCAN, IMSS, ISSSTE) se ha reportado que los LNH ocuparon el primer sitio de las neoplasias hematológicas diagnosticadas siendo la variedad histológica más frecuente el linfoma difuso de células grandes.

Nuestros resultados mostraron un 81.15% en el grupo de Linfoma No Hodgkin, incluidas las neoplasias de células B con un 66.66% y de neoplasias de células T con un 14.49%. Por otro lado, se obtuvo un 18.84% de Linfoma de Hodgkin. La variedad histológica de mayor frecuencia correspondió al LDCGB con un 40.57% del total de linfomas.

7.5. Expresión de los genes CTA a nivel de mRNA en pacientes con linfoma

Los 69 pacientes con linfoma incluidos en el estudio fueron analizados para detectar la expresión de los genes CTA por medio de RT-PCR. La tabla 15 muestra el resumen de los resultados de cada gen analizado.

Tabla 15. Expresión de los genes CTA a nivel de mRNA en pacientes con linfoma

CTA analizado	Positivo (%)	Negativo (%)
<i>MAGE A3</i>	31 (44.9)	38 (55.1)
<i>MAGE A4</i>	19 (27.5)	50 (72.5)
<i>MAGE B2</i>	15 (21.7)	54 (78.3)
<i>MAGE C1</i>	5 (7.2)	64 (92.8)
<i>GAGE</i>	11 (15.9)	58 (84.1)
<i>BAGE</i>	9 (13.0)	60 (87.0)
<i>LAGE</i>	14 (20.3)	55 (79.7)
<i>NY-ESO1</i>	23 (33.3)	46 (66.7)

Las frecuencias de expresión de cada CTA en todos los linfomas, fueron el gen *MAGE A3* del 44.9% (31/69), seguido de *NY-ESO1* con un 33.3% (23/69); *MAGE A4*, *MAGE B2* y *LAGE* mostraron 27%, 21% y 20% respectivamente. Los genes *GAGE*, *BAGE* y *MAGE C1* tuvieron frecuencias menores del 20% (15.9%, 13.0% y 7.2%).

7.6. Expresión de genes CTA las variedades histológicas del linfoma

En cuanto a la expresión de los genes de acuerdo a las variedades histológicas, los genes de mayor frecuencia fueron *MAGE A3* Y *NY-ESO*. El detalle según el tipo histológico de linfoma y cada uno de los genes CTA se muestra en la tabla 16. La frecuencia del gen *MAGE A3* según la clasificación histológica de los linfomas muestra en la variedad de neoplasias de células B un 45.65%, (21/46) subdivido en; Linfoma de linfocitos pequeños 3/46 (6.5%); Linfoma del centro Folicular (2.1%) 1 /46, Linfoma difuso de Células Grandes B (LDCGB) 11/46 (23.91%), Linfoma

largo de células B rico en células T 4/46 (8.6%), Linfoma de Células Grandes Anaplásico ALK negativo 2/46 (4.3%) y en Linfoma de células B, no clasificable no existió expresión del gen *MAGE A3*. En las neoplasias de células T se obtuvo una frecuencia del 40% (4/10), tanto el Linfoma periférico de células T y el Linfoma/leucemia de células T del adulto presentaron la misma frecuencia 2/10 (20%). En los linfomas de Hodgkin se encontró una frecuencia de 46.15% (6/13), presentado un 30% (4/13) el linfoma clásico de celularidad mixta y un 15.38% (2/13) el linfoma clásico esclerosis nodular.

Tabla 16. Expresión de los CTA en pacientes con linfoma del HGM

Neoplasias de Tejidos Linfoides	n= 69	MAGE							
		A3	A4	B2	C1	GAGE	BAGE	LAGE	NY-ESO
Neoplasias de Células B maduras	n= 46								
Leucemia linfocítica crónica/Linfoma de linfocitos pequeños		3	0	0	0	1	1	0	0
Linfoma del centro Folicular		1	1	1	1	1	2	1	2
Linfoma difuso de Células Grandes B (LDCGB)		11	8	4	2	5	2	6	13
Linfoma largo de células B rico en células T		4	1	3	0	1	1	0	1
Linfoma de Células Grandes Anaplásico ALK ⁺		2	1	1	0	1	1	1	0
Linfoma de células B, no clasificable		0	0	1	0	1	0	1	1
Neoplasias de células T maduras	n= 10								
Linfoma periférico de células T		2	2	2	0	0	1	2	0
Linfoma/leucemia de células T del adulto		2	2	1	0	1	0	1	0
Linfoma de Hodgkin	n= 13								
Linfoma clásico, celularidad mixta		4	3	2	1	0	1	1	6
Linfoma clásico, esclerosis nodular		2	1	0	1	0	0	1	0
Total		31	19	15	5	11	9	14	23

En el caso del gen *NY-ESO1* las frecuencias en el grupo de neoplasias de células B fue de 17/46 (36.95%), la distribución en las variedades histológicas fue mayor en el Linfoma difuso de Células Grandes B 28.26% (13/46), seguido del Linfoma del centro Folicular (4.3%) 2/46; el Linfoma largo de células B rico en células T y Linfoma de células B no clasificable presentaron la misma frecuencia del 2.1% (1/46). En las neoplasias de células T no hubo expresión de éstos genes. La frecuencia en el Linfoma de Hodgkin fue de 6/13 (46.15%) observándose expresión en los de tipo de celularidad mixta.

Los genes con una frecuencia entre el 30 y 20% fueron *MAGE A4*, *MAGE B2* y *LAGE*; en el caso de *MAGE A4* su expresión en el grupo de las neoplasias de células B maduras fue del 17.39 (8/46) para el Linfoma difuso de Células Grandes B; del 2.1% (1/46) para tres tipos; Linfoma del centro Folicular, Linfoma largo de células B rico en células T y Linfoma de Células Grandes Anaplásico ALK negativo.

En el grupo de neoplasias de células T maduras tuvo la misma frecuencia tanto para el Linfoma periférico de células T como para el Linfoma/leucemia de células T del adulto 2/10 (20%). En el Linfoma de Hodgkin la expresión de *MAGE A4* fue del 23% (3/13) en LH de celularidad mixta y del 7.6 % (1/13) para el tipo de esclerosis nodular.

En el detalle de frecuencias en el gen *MAGE B2* se encontró, dentro del grupo de neoplasias de células B maduras una frecuencia del 21.73% (10/46); dentro de este grupo el Linfoma difuso de Células Grandes B con 8.6% (4/46), seguido del 65% en Linfoma largo de células B rico en células T; los linfomas del centro Folicular, de Células Grandes Anaplásico ALK negativo y de células B, no clasificable compartieron la misma frecuencia del 2.1 % respectivamente (1/46). En las neoplasias de células T se encontró una frecuencia del 30% (3/10), distribuidos en 20% (2/10) de Linfoma periférico de células T y el 10% (1/10) en Linfoma/leucemia de células T del adulto. En el LH se encontró un 15.8% (2/13) en el tipo de celularidad mixta.

En el caso del gen *LAGE*, las frecuencias se distribuyeron dentro del grupo de Neoplasias de células B en un 19.56 (9/46); un 13.04% (6/46) del grupo el Linfoma difuso de Células Grandes B; los subtipos del centro folicular, de Células Grandes Anaplásico ALK negativo y Linfoma de células B, no clasificable presentaron un 2.17% (1/46) cada uno. En el Linfoma periférico de células T se encontró un 10% (1/10) y en el Linfoma de Hodgkin de celularidad mixta un 7.6% (1/13)

Para el gen *GAGE* se observó una tendencia en el grupo de neoplasias de células B maduras con una frecuencia del 21.73% (10/46), distribuidos en el 10.86 % (5/46) en el LDCGB y en las frecuencias restantes distribuidos en 2.17% para cada subtipo restante. En el Linfoma/leucemia de células T del adulto presentó el 10% (1/10) siendo este el único grupo que presentó expresión para este gen.

Dentro de las neoplasias de células B, los genes *BAGE* y *MAGE C1* tuvieron una frecuencia del 15.21% (7/46) y 6.52% (3/46) respectivamente. En los de tipo T solo *BAGE* se expresó en un 10% (1/10) en el tipo periférico de células T. En el linfoma de Hodgkin se encontraron las mismas frecuencias para ambos genes 2/13 (15.38%).

Se puede observar que dentro de las neoplasias de células B maduras; el linfoma donde se encontró mayor expresión de los CTA fue el linfoma difuso de células B. Como se detalla en la literatura, este tipo de linfoma es el de mayor frecuencia en nuestra población (111,124). Se obtuvo un total de 28 pacientes lo que representa el 40.47% (28/69) del total de nuestras muestras incluidas en el estudio.

Las variedades y pronósticos en cada linfoma son diversos por lo que se decidió realizar los estudios de correlación clínica y de supervivencia en los pacientes con Linfoma de células B grande difuso, por ser el de mayor frecuencia en nuestra población. El primero en analizarse fue el gen *MAGE A3*, se incluyó en el análisis la expresión de mRNA mediante RT-PCR en punto final y tiempo real; el análisis de la proteína por medio de inmunohistoquímica y Western Blot, los parámetros clínicos fueron comparados con la expresión del gen *MAGE A3* y se realizó el seguimiento de los pacientes a 4 años. El trabajo fue publicado en la Revista Hematology.

7.7. Expresión del gen *MAGE A3* en LDCGB

Se incluyeron 28 pacientes con LDCGB, se encontró una media de edad de 45 años en un rango de 18 a 69 años. Los pacientes fueron tratados con CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona). Ninguno de estos pacientes recibió rituximab. Los pacientes que mostraron respuesta parcial fueron tratados con dexametasona, etopósido, y cisplatino como quimioterapia de segunda línea a la discreción del médico tratante. El análisis de supervivencia fue a 4.5 años; la media de supervivencia para los pacientes que no expresaron *MAGE A3* fue de 3.5 años (77%) mientras que para los positivos fue de 1.2 años, (26.6%) con un IC del 95%.

La expresión del gen *MAGE A3* nivel de mensajero fue analizada por medio de RT-PCR en punto final y mediante qRT-PCR. En el análisis en punto final se encontró una expresión del 39.28 % 11/28. En la Figura 13, se muestra una imagen representativa de la expresión de los genes *MAGE A3* y β_2 microglobulina, este último utilizado como control interno.

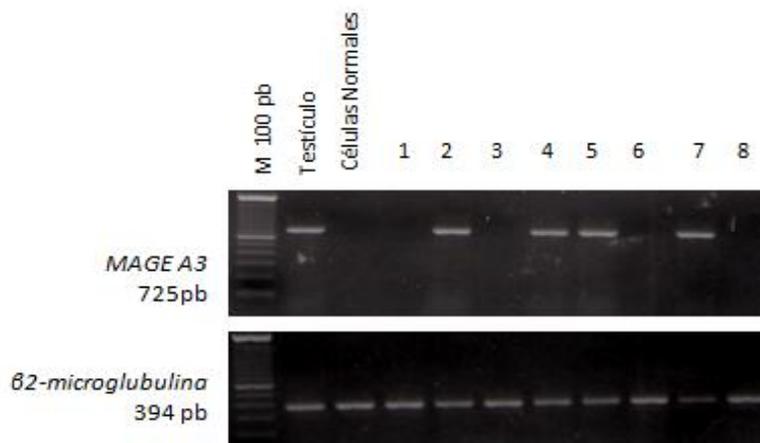


Figura 13. Expresión del mRNA de *MAGE A3* en pacientes con LDCGB.

Existe expresión de los CTA en LDCGB. En la parte superior se muestra la expresión del gen *MAGE A3* (725 pb), como control positivo tejido testicular, y negativo células normales. En los carriles 1-8, pacientes con LDCGB en diversos estadios clínicos. El gen β_2 microglobulina, (parte inferior) utilizado como control interno se aprecia en todas las muestras.

7.7.1. Análisis cuantitativo del gen *MAGE A3*

En el análisis cuantitativo de la expresión del mRNA del gen *MAGE A3* mediante qRT-PCR se encontró que el número de copias del gen tenía relación con el estadio clínico del paciente. Como se observa en la figura 14, los pacientes en estadios avanzados III y IV presentaron niveles de expresión mayor que en el estadio II; se encontraron diferencias significativas entre los grupos $p \leq 0.05$.

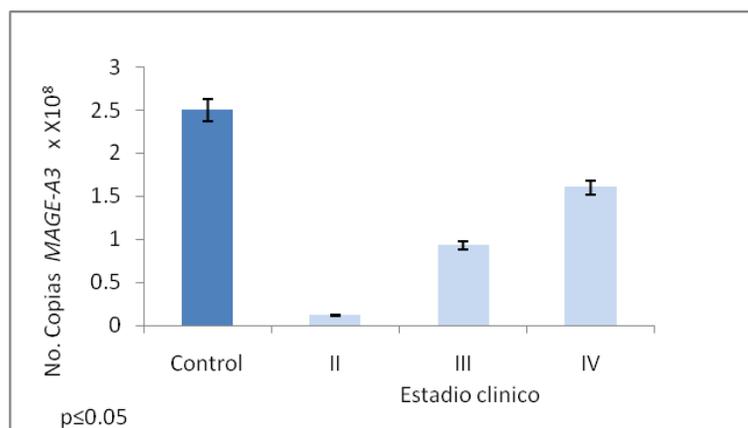


Figura 14. Relación directa entre la expresión del gen *MAGE A3* y las etapas de la enfermedad

Los resultados del qRT-PCR muestran que conforme avanza la enfermedad el número de transcritos del gen *MAGE A3* aumenta. Se muestra el control positivo (tejido testicular) y los diferentes estadios clínicos.

7.7.2. Análisis de la proteína *MAGE*

La detección de las proteínas *MAGE* fue realizada en las biopsias de ganglios de pacientes con linfoma que fueron positivos a nivel de mRNA utilizando inmunohistoquímica (IHQ) y Western Blot (WB).

En la detección por IHQ el control positivo utilizado fue tejido testicular normal, como control negativo se obtuvo tejido gangliolar (angina) sin ninguna patología, así como controles sin anticuerpo primario. El anticuerpo utilizado fue mouse anti-*MAGE A* (Zymed® Laboratories) (los detalles se describen en la metodología). Posteriormente a la detección de la proteína se realizó una contra-tinción con hematoxilina-eosina. La descripción histológica fue realizada en el Servicio de Patología del HGM.

En la figura 15, se muestra la inmunodetección de la proteína *MAGE*. En A) Tejido linfoide amigdalario difuso con nódulos secundarios sin positividad observada en ningún campo. En B) se muestra de tejido testicular en grado avanzado de maduración, se observan células de Leyding en la periferia, túbulos seminíferos irregulares con ausencia de espermátides en la luz del mismo y positividad para el antígeno *MAGE* en espermatogonias ubicadas cerca de la membrana basal de cada túbulo. La detección de las proteínas se aprecia a nivel citoplasmático y en algunas células a nivel nuclear. En C) la histología refiere un LNH con células grandes homogéneas, disgregado y linfocitos no hendidos. Se observa la detección de la proteína *MAGE* por la tinción positiva (células color café), solo en algunas zonas cercanas a la periferia de los folículos linfoides, la muestra corresponde a un paciente en estadio II. En D) se observa tejido linfoide difuso con infiltración difusa extensa en nódulos, la positividad es clara en la mayor parte de las células; la muestra corresponde a un paciente con estadio IV.

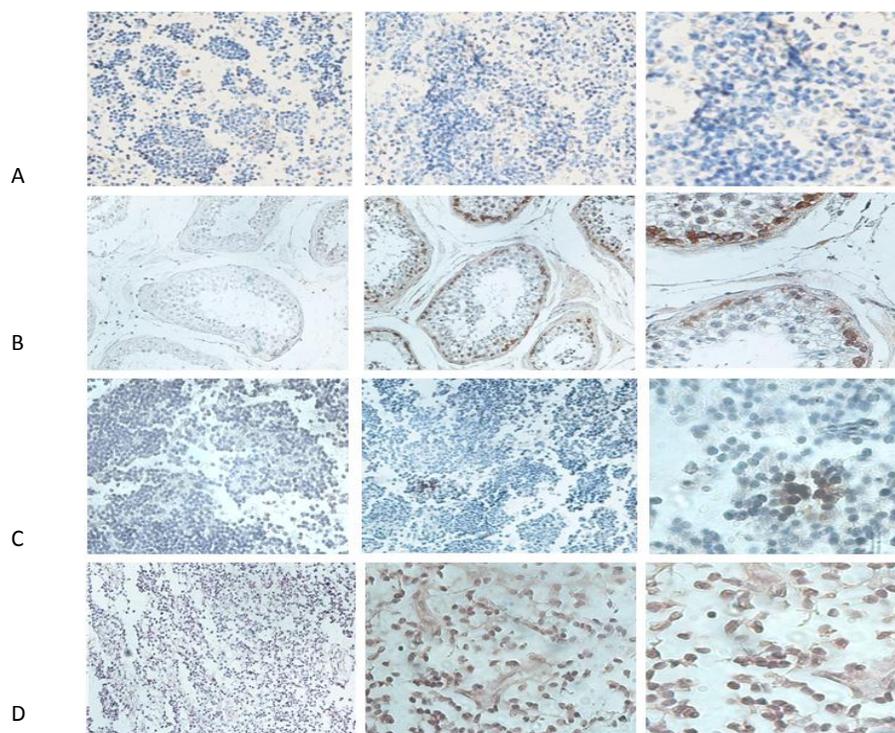


Figura 15. Inmunodetección de la proteína *MAGE* en LNH

Se observa un aumento de la proteína *MAGE* conforme avanza el estadio clínico. A) Tejido ganglionar normal. B) Tejido testicular normal. C) LNH estadio II. D) LNH estadio IV. La tinción café indica positividad. De izquierda a derecha 20X; 40X ; 100X

7.7.3. Detección de la proteína por Western Blot

Para analizar la presencia de la proteína MAGE se utilizaron para la estandarización células mononucleares de sangre periférica de un donador sano, tejido testicular y biopsia de ganglio de un paciente positivo. Una vez cuantificados las proteínas, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y una tinción con azul de coomasie para observar el patrón de las proteínas. Estas fueron transferidas a la membrana de nitrocelulosa para detectar la proteína β -actina gen constitutivo y utilizado para corroborar la integridad de las proteínas. Una vez con verificada la integridad, la detección de la proteína MAGE se realizó con el anticuerpo MAGE A (FL 309) rabbit polyclonal IgG (Santa cruz Biotechnology, Santa cruz, CA, USA. Los controles utilizados se muestran en la Figura 16. Como control negativo se utilizaron células mononucleares de donador sano; como control positivo se empleo tejido testicular. Se aprecia el control de β -actina con un peso de 43kDa, como puede apreciarse es positiva en todas las muestras. La intensidad de la proteína MAGE 46kDa en pacientes está relacionada con el estadio clínico; el paciente 2 presentó una intensidad menor que el paciente 6, el estadio corresponde a II y IV respectivamente.

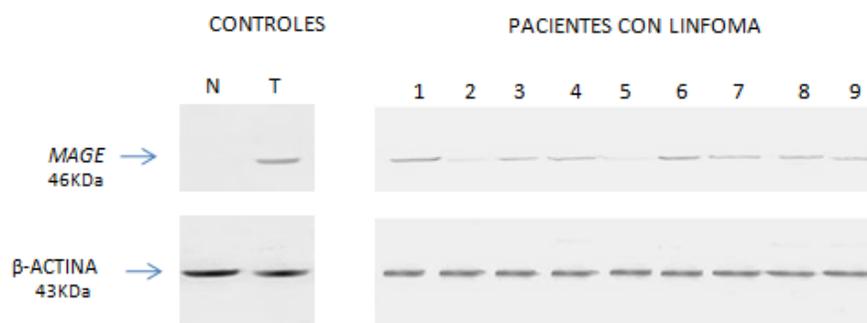


Figura 16. Presencia de la proteína MAGE en pacientes con LDCGB en diferentes estadios clínicos

La intensidad de la proteína es directamente proporcional al estadio clínico de la enfermedad. A la izquierda los controles normal (N) y tejido testicular (T). A la derecha pacientes con linfoma. Se observa además en la parte inferior el gen β -actina que corrobora la integridad de las proteínas.

7.7.4. Análisis densitométrico de la proteína MAGE

Se realizó una densitometría para poder observar diferencias entre el grado de malignidad y la expresión de la proteína. El análisis fue realizado con el software Quantity One (Bio Rad Laboratorios) para la proteína *MAGE* y β -actina.

En la figura 17, se puede apreciar el ratio de β actina/ proteína *MAGE* y su relación con el estadio clínico de los pacientes. Se realizó una prueba de T para comparar la cada uno de los estadios clínicos con respecto al control. El análisis estadístico mostro diferencias ($p \leq 0.05$) entre cada uno de los estadios clínicos y el tejido testicular (control).

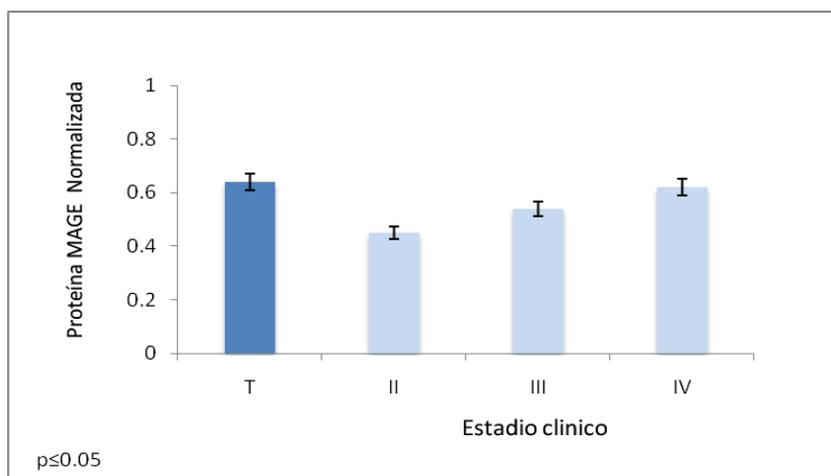


Figura 17. Aumento en la expresión de la proteína *MAGE* en los diversos estadios clínicos de LDCGB

Se muestra que el ratio de la proteína *MAGE* y β -actina tiene una relación directa con el estadio clínico. El análisis estadístico mostro diferencias significativas al comparar $p \leq 0.05$ los estadios clínicos con el control (T).

7.7.5. Correlación entre factores clínico- pronósticos y el gen *MAGE A3*

Desde la captación de la muestra, se realizó el seguimiento clínico en cada consulta hematológica de cada paciente. Los datos que analizaron usando SPSS versión 15 (Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, USA).

Las variables continuas fueron probadas para la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. Los valores de DHL se presentan como media \pm desviación estándar. En el caso la edad que presentó una distribución no-normal, se muestra la mediana y el rango.

La comparación de los porcentajes entre los pacientes positivos y negativos se realizó con una prueba de Chi- cuadrada y en aquellos datos menores a 5 con una prueba exacta de Pearson. En la tabla 17 se detalla la comparación de cada parámetro clínico con la expresión del gen *MAGE A3*. Del total de 28 pacientes el 39.3 % fue positivo a nivel de mRNA para este gen.

La edad mostró una distribución no paramétrica, los pacientes positivos mostraron una mediana de 37 años y un rango de 19-69, en tanto; los pacientes negativos tuvieron una mediana de 51 años un rango de 18-65. Se encontraron 3 pacientes mayores de 60 años en cada uno de los grupos. Después del análisis estadístico (Prueba U de Mann-Whitney) no se encontraron diferencias significativas entre pacientes que expresan el gen y los que no lo expresan.

Tabla 17. Correlación entre la expresión de *MAGE A3* y factores clínico-pronósticos en LDCGB

LDH: Lactato deshidrogena serica

*Prueba exacta de Fisher

Características	<i>MAGE-A3</i>		Valor de p
	Positivo n (%)	Negativo n (%)	
Pacientes (n = 28)	11 (39.3)	17 (60.7)	
Edad			
Mediana	37	51	
Rango	19-69	18-65	
Mayores de 60 años	3 (27.3)	3 (17.6)	
Sexo			
Masculino	5 (45.5)	8 (47.1)	
Femenino	6 (54.5)	9 (52.9)	
Estado funcional	0 (0)	0 (0)	
Nivel LDH en suero > normal	8 (72.7)	5 (29.4)	0.025*
Sitios extranodales >1	4 (36.4)	3 (17.6)	
	10 (90.9)	7 (41.2)	
Estadio clinico III/IV			0.008*
IPI			0.004*
Bajo	1 (9.1)	7 (41.2)	
Bajo- Intermedio	1 (9.1)	7 (41.2)	
Intermedio	0 (0)	0 (0)	
Alto	9 (81.8)	3 (17.6)	

7.7.6. Análisis de sobrevida en relación al gen *MAGE A3*

Para el análisis de sobrevida se tomo en cuenta la fecha del diagnóstico con la biopsia de ganglio hasta la muerte del paciente con un tiempo de seguimiento de 4.7 años. El análisis de sobrevida se realizó con una gráfica de Kaplan Meier y una prueba de Long- Rank considerándose significativo un valor de $p \leq 0.05$ (Figura 18).

La sobrevida a 3 años fue de 36.4% para pacientes positivos y de 82.4% en los pacientes negativos. En este periodo se observó que el 63% (7/11) de los pacientes que expresaban *MAGE A3* murieron. En contraste, en el grupo de pacientes negativos murió un 17.6% (3/17). Se encontró una asociación estadísticamente significativa (Long-Rank; $p=0.001$).

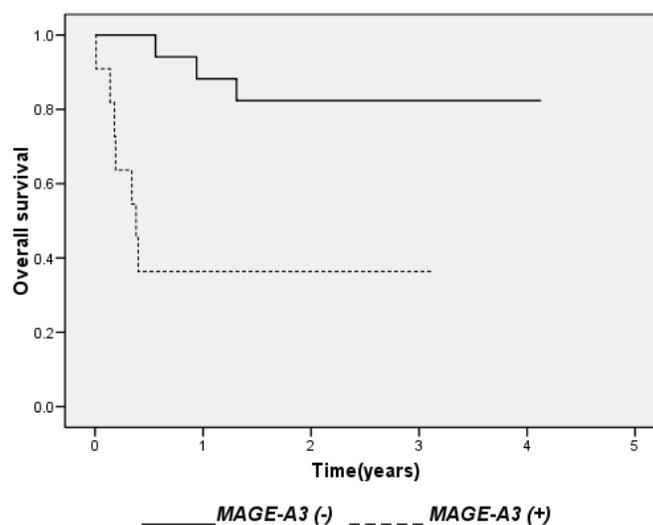


Figura 18. Análisis de supervivencia en relación a *MAGE A3*.

La expresión de *MAGE A3* es de mal pronóstico ($p = 0.001$). Se realizó un seguimiento a 5.3 años en donde se observa una menor sobrevida en aquellos pacientes que expresaron el gen *MAGEA3*.

7.8. Expresión de *NY-ESO1* en linfoma difuso de células grandes B

Se incluyeron 28 pacientes con LDCGB, se encontró una media de edad de 45 años en un rango de 18 a 69 años. En el análisis de expresión en todas las variedades de linfoma se observó una frecuencia del gen *NY-ESO1* del 33.3%. En el LDGCB la expresión del gen *NY-ESO1* fue del 46% (13/28), a las muestras se les realizó un análisis de qRT-PCR para observar las diferencias en los niveles de expresión. El control utilizado como muestra de referencia fue el tejido testicular, además se incluyeron dos muestras negativas analizadas previamente por RT-PCR. Los pacientes fueron tratados con CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona) y ninguno de estos pacientes recibió rituximab. Los pacientes que mostraron respuesta parcial fueron tratados con dexametasona, etopósido y cis-platino como quimioterapia de segunda línea a discreción del médico tratante. El análisis de supervivencia fue a 5.3 años.

En la figura 19 se muestra el nivel promedio de expresión del gen y el estadio clínico, el tejido testicular se muestra como control. Se encontró una relación entre el estadio clínico y la expresión del gen *NY-ESO1*, la prueba estadística fue una prueba de T, con un valor de $p=0.007$

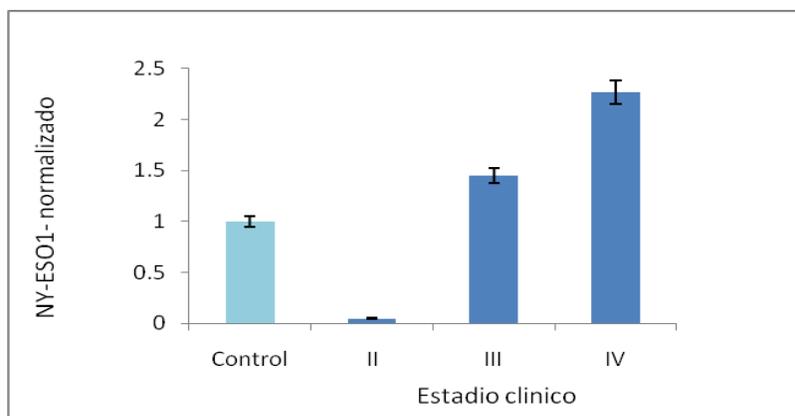


Figura 19. Relación entre los niveles de expresión de *NY-ESO1* y el estadio clínico

Los resultados del qRT-PCR muestran que conforme avanza la enfermedad el número de transcritos del gen *NY-ESO1* aumenta. Se muestra el control positivo (tejido testicular) y los diferentes estadios clínicos.

7.8.1. Correlación clínica de *NY-ESO1* y factores clínicos en LDCGB

Los factores clínicos comparados con la expresión *NY-ESO1* fueron edad, sexo, sitios extranodales, estado funcional, niveles de LDH, estadio clínico e IPI. Se realizó la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov a los datos con variables continuas.

La edad se muestra con la mediana y el rango, para el caso de los positivos fue de 58 y para los negativos de 37 con un rango de (18-69 y 19-65) respectivamente; no se encontró asociación de éste parámetro y la expresión de este gen. En relación al sexo de los pacientes positivos, se encontraron 5 (38.4%) en masculino y en femenino 8 (61.5%), no se encontraron diferencias significativas con respecto a los negativos (Tabla 18).

La presencia de sitios extranodales mostró un 61.5% (8/13) en positivos y un 33.3% (5/15) en negativos, ninguno de estos dos parámetros se encontraron diferencias significativas. El análisis estadístico mostró valores significativos con los parámetros de LDH, estadio clínico e IPI. ($p \leq 0.05$). Los niveles altos de LDH representan el 84.6% en positivos contra el 20% en negativos ($p=0.001$); en el estadio clínico III o IV, el 92.3% se asocia con la expresión del gen y un 33.3 % en los que no lo expresan ($p=0.001$); los pacientes que mostraron un IPI alto fueron los positivos en un 62.2% mientras los negativos en un 2% ($p= 0.019$)

Tabla 18. Correlación entre la expresión del gen *NY-ESO1* y factores clínico-pronósticos en pacientes con LDCGB

Características		<i>NY-ESO1</i>		Valor de p
		Positivo n (%)	Negativo n (%)	
Pacientes	n(28)	13 (46.4)	15(53.5)	
Edad	Mediana	58	37	
	Rango	18-69	19 -65	
	Mayores de 60 años	6	4	
Sexo	Masculino	5(38.4)	8(53.3)	
	Femenino	8(61.5)	7(46.6)	
Sitios extranodales>1	Si	8(61.5)	5(33.3)	
	No	5(38.4)	10(66.6)	
Estado Funcional	0	0	1(6.6)	
	1	7(53.8)	12(80.0)	
	2	6(46.1)	2(1.3)	
	3	0	0	
	4	0	0	
Niveles de LDH > normal	Si	11(84.6)	3(20)	0.001*
	No	2(15.3)	12(80)	
IPI	Bajo	1(7.6)	7(46.6)	0.019*
	Bajo- Intermedio	3(23.1)	5(33.3)	
	Intermedio	0	0	
	Alto	9(69.2)	3(2.0)	
Estadio clínico	I-II	1(7.6)	10(66.6)	0.001*
	III-IV	12(92.3)	5(33.3)	

LDH: Lactato deshidrogena serica

*Prueba exacta de Fisher

7.8.2. Análisis de sobrevida en LDCGB y la expresión de NY-ESO1

El estudio se realizó durante 5.3 años, 13 pacientes fueron positivos y 15 negativos para el gen *NY-ESO1*. El análisis de sobrevida se realizó con una gráfica de Kaplan Meier y una prueba de Long-Rank considerándose significativo un valor de $p \leq 0,05$, figura 20. La media de sobrevida fue de 4.7 años para los negativos, mientras que en los positivos fue de 2.5 años

La sobrevida a 3 años fue de 23.1% para pacientes positivos y de 66.46% en los pacientes negativos (figura 20). En este periodo se observó que el 76.9% (10/13) de los pacientes que expresaban *NY-ESO1* murieron. En contraste en el grupo de pacientes negativos murió un 33.3% (5 /15). En el análisis estadístico se encontró un valor de Log Rank de 0.002

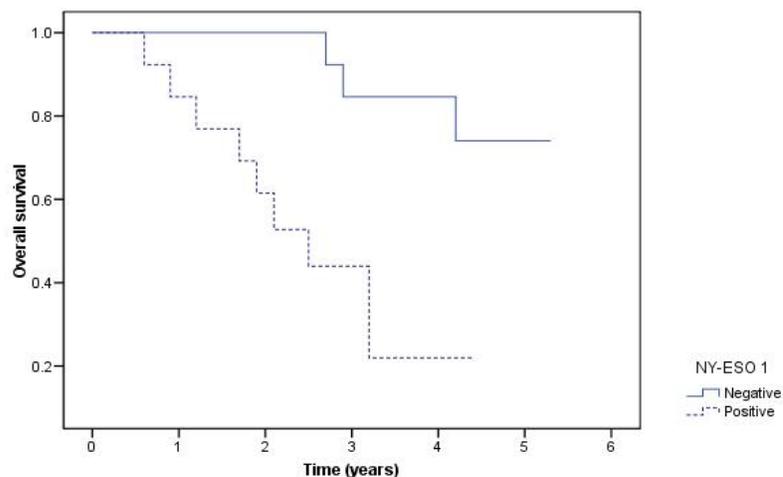


Figura 20. Análisis de sobrevida en relación *NY-ESO1*

La expresión de *NY-ESO1* es de mal pronóstico ($p = 0.001$). Se realizó un seguimiento a 5.3 años en donde se observa una menor sobrevida en aquellos pacientes que expresaron el gen *NY-ESO1*.

7.9. Frecuencia de coexpresión de los CTA en linfoma

Posterior al análisis de frecuencias de cada gen se determinó la co-expresión de los genes CTA analizados en los 69 pacientes con linfoma. El 27.53% expresan al menos un gen (19/69); el 23.18% co-expresan dos genes (16/69); el 24.63% expresan tres genes (17/69); el 7.24% expresan cuatro genes y solo un paciente expreso cinco de los ocho genes analizados representando el 1.4% (Tabla 19, Figura 21.)

Tabla 19. Frecuencia de coexpresión de CTA en Linfoma

Genes Co-expresados	n	Frecuencia (%)
0	11	15.94
1	19	27.53
2	16	23.18
3	17	24.63
4	5	7.24
5	1	1.44

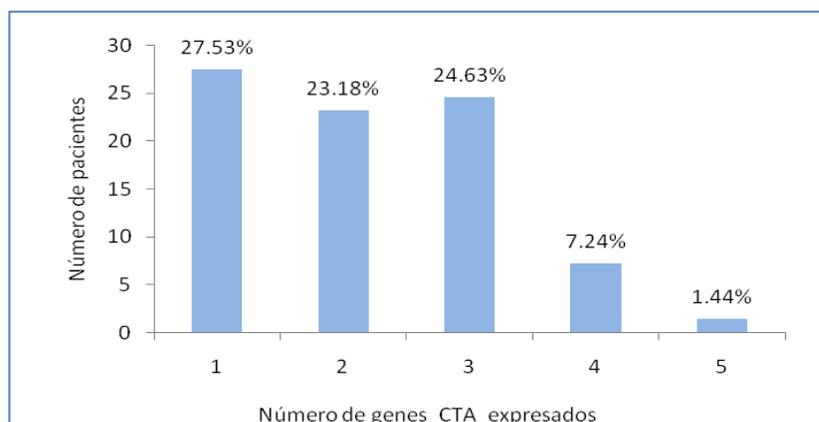


Figura 21. Porcentaje de genes CTA co-expresados en linfoma.

Se observa el porcentaje de genes que se co-expresan en linfoma, el 27.53% expresa al menos un gen CTA.

Posteriormente se analizó la coexpresión de los genes CTA en 28 pacientes con LDCGB; en el análisis se encontró el 85.7% de los pacientes con LDCGB expresan algún gen CTA, siendo que el 35.71% expresaron solo un gen; el 17.85% coexpresaron dos genes; el 21.42% tres genes; el 7.14% cuatro genes y el 3.57% expresaron 5 genes (figura 22, tabla 20).

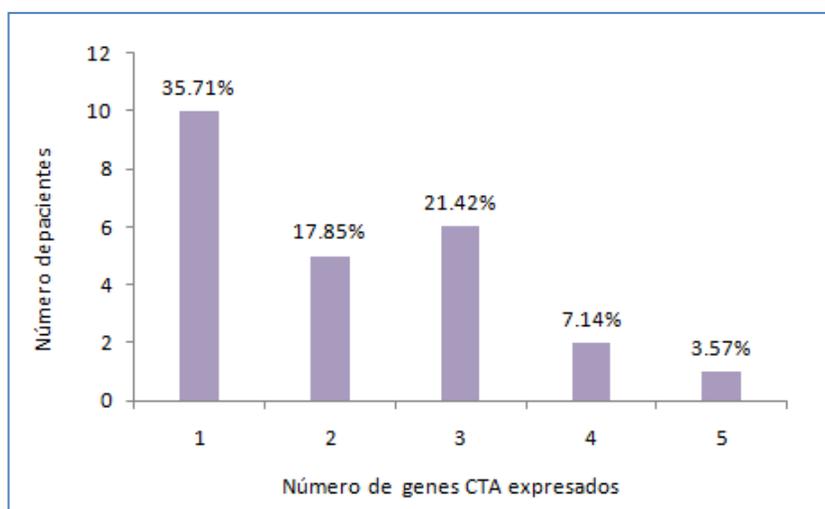


Figura 22. Porcentaje de co-expresión de los CTA en LDCGB.

Se observa el porcentaje de genes que se co-expresan en linfoma, el 35.71% expresa al menos un gen CTA.

Tabla 20. Frecuencia de coexpresión de CTA en LDCGB

Genes coexpresados	n	Frecuencia (%)
0	4	14.28
1	10	35.71
2	5	17.85
3	6	21.42
4	2	7.14
5	1	3.57

7.9.1. Frecuencia Coexpresión de los CTA en LDCGB

Los genes *MAGE A3-NY-ESO1* se encontraron co-expresados en 7 pacientes; *NY-ESO1-MAGE A4* en 5 pacientes y *NY-ESO1-LAGE* en 4 pacientes. En la tabla 21 se describe la asociación entre CTA asociados que se observaron en los pacientes analizados. Como se aprecia no existió una asociación específica de 3 genes, aunque se observa la presencia de *NY-ESO1* la mayor parte de los casos.

Tabla 21. Asociación los genes CTA en LDCGB

Número de genes	Paciente	Coexpresión de genes CTA
2	7	<i>NY-ESO1, LAGE</i>
	20	<i>MAGEA3, NY-ESO1</i>
	24	<i>MAGEA4, MAGEB2</i>
	49	<i>NY-ESO1, MAGEA4</i>
	54	<i>NY-ESO1, LAGE</i>
3	6	<i>MAGEA3, NY-ESO1, GAGE</i>
	9	<i>MAGEC1, NY-ESO1, LAGE</i>
	18	<i>MAGEC1, NY-ESO1, BAGE</i>
	21	<i>MAGEA4, MAGEC1, GAGE</i>
	41	<i>MAGEA3, NY-ESO1, MAGEB2</i>
	43	<i>MAGEA3, NY-ESO1, MAGEA4</i>
4	23	<i>MAGEA3, MAGE A4, NY-ESO1, GAGE</i>
	25	<i>MAGEA4, MAGE B2, NY-ESO1, GAGE</i>
5	45	<i>MAGE A3, MAGEA4, MAGE B2, NY-ESO1, LAGE</i>

7.9.2. Relación de la expresión de CTA y la sobrevida en pacientes con LDCGB

Se incluyeron 28 pacientes que fueron tratados con CHOP; se tomo en cuenta la fecha del diagnóstico con la biopsia de ganglio hasta la muerte del paciente con un tiempo de seguimiento de 4.5 años (figura 23 y 24). El análisis de sobrevida se realizó con una gráfica de Kaplan Meier y una prueba de Long- Rank considerándose significativo un valor de $p \leq 0,05$. En el análisis de sobrevida de cada gen CTA se aprecia que no todos tuvieron relación con la sobrevida, los genes que mostraron significancia estadística fueron *MAGE A3* ($p=0.001$), *MAGE A4* ($p=0.027$), *MAGE B2* ($p=0.008$) y *GAGE* ($p=0.021$) y *NY-ESO 1* ($p=0.005$).

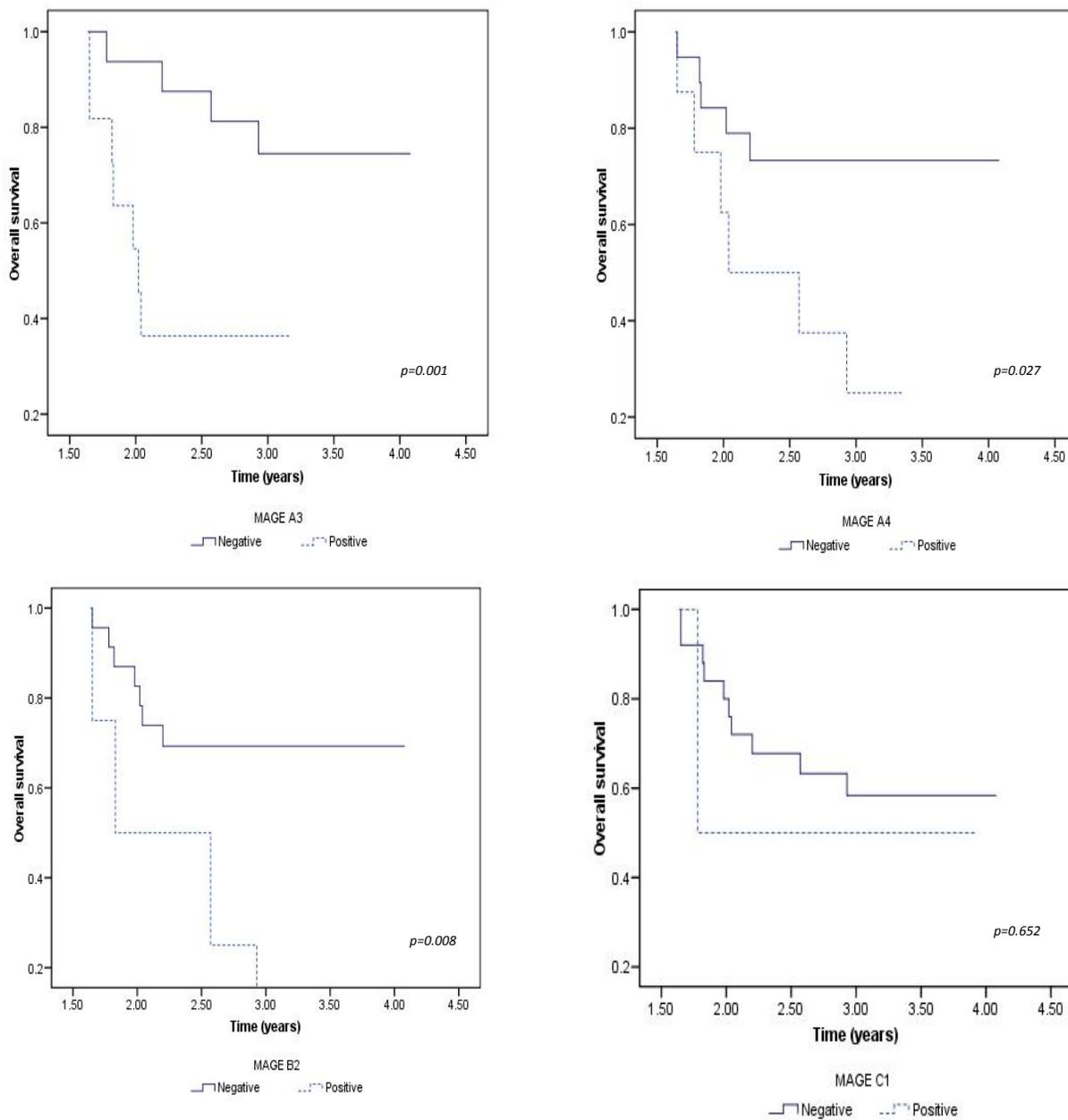


Figura 23. Análisis de sobrevida de los genes *MAGE* en pacientes con LDCGB

Se muestran las gráficas de sobrevida de los genes *MAGE A3*, *MAGE A4*, *MAGE B2* y *MAGE C1*. Solo el gen *MAGE C1* no mostró significancia estadística.

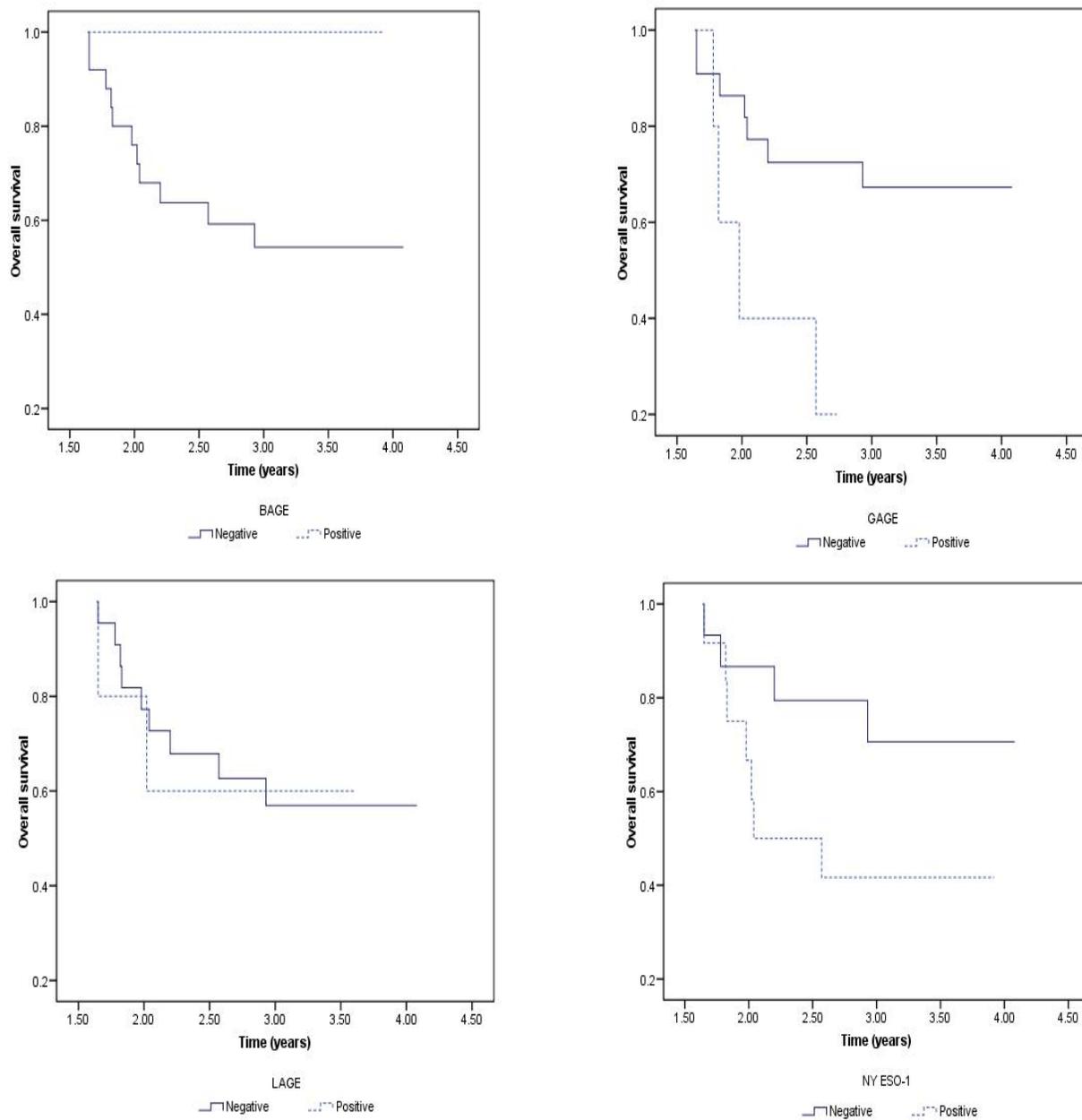


Figura 24. Análisis de sobrevida de los genes CTA en pacientes LDCGB

Se muestran las gráficas de sobrevida de los genes *BAGE*, *GAGE*, *LAGE*, *NY-ESO1*. Los genes *NY-ESO1* y *GAGE* mostraron significancia estadística $p \leq 0,05$.

7.9.3. Correlación clínica de los CTA y factores clínicos en LDCGB

Se realizó la correlación clínica solo en los genes con relación con la sobrevida; los parámetros utilizados fueron edad, sexo, sitios extranodales, ECOG, LDH, IPI y estadio clínico, se aplicó un análisis de Chi- cuadrada y un ajuste de Pearson en aquellos datos que fueron menores de 5. Se tomaron como significativos aquellos que fueron $p \leq 0,05$. Los genes CTA con correlación con parámetros clínicos fueron solo *MAGE-A3* y *NY-ESO1* (Previamente detallado). Los genes *MAGE A4*, *MAGE B2* y *GAGE* (Tabla 22), no presentaron correlación estadísticamente significativa con ningún parámetro clínico analizado.

Tabla 22. Correlación clínica entre *MAGE A4*, *MAGE B2* y *GAGE*

Parámetros clínicos		<i>MAGE A4</i>		<i>MAGE B2</i>		<i>GAGE</i>	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Edad	Media	41	45	39	45	49	43
	Mediana	41	49	37	49	52	45
	Rango	18-62	18-69	18-63	18-69	36-69	18-69
	Mayores 60 años	3	7	2	8	3	7
Sexo	masculino	3	10	1	12	1	12
	femenino	5	10	3	12	4	11
Sitios extranodales >1	Si	5	8	2	11	4	9
	No	3	12	2	13	1	14
Estado funcional	0	0	1	0	1	0	1
	1	6	13	3	16	5	14
	2	2	6	1	7	0	8
	3	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0
Niveles > LDH	Si	4	10	3	11	3	11
	No	4	10	1	13	2	12
IPI	Bajo	3	5	1	7	2	6
	Bajo- Intermedio	1	7	1	7	1	7
	Intermedio	0	0	0	0	0	0
	Alto	4	8	2	10	2	10
Estadio clínico	I-II	2	9	0	11	2	9
	III-IV	6	11	4	13	3	14

7.9.4. Co-expresión de los CTA y su impacto en la sobrevida en LDCGB

Con el fin de conocer el impacto en la sobrevida de los genes CTA en esta variedad histológica de linfoma se considero el número de genes que se expresaban por paciente y se agruparon en pacientes sin expresión (negativos), con expresión de 1 gen y pacientes que co-expresaron es decir más de un gen.

En el análisis se encontró que los pacientes que no tenían expresión de ningún CTA presentaron una media de 1175 días, los que expresaron 1 gen 977 días y los que tuvieron coexpresión 780 días. Se obtuvo un valor de Log-Rank de 0.016.

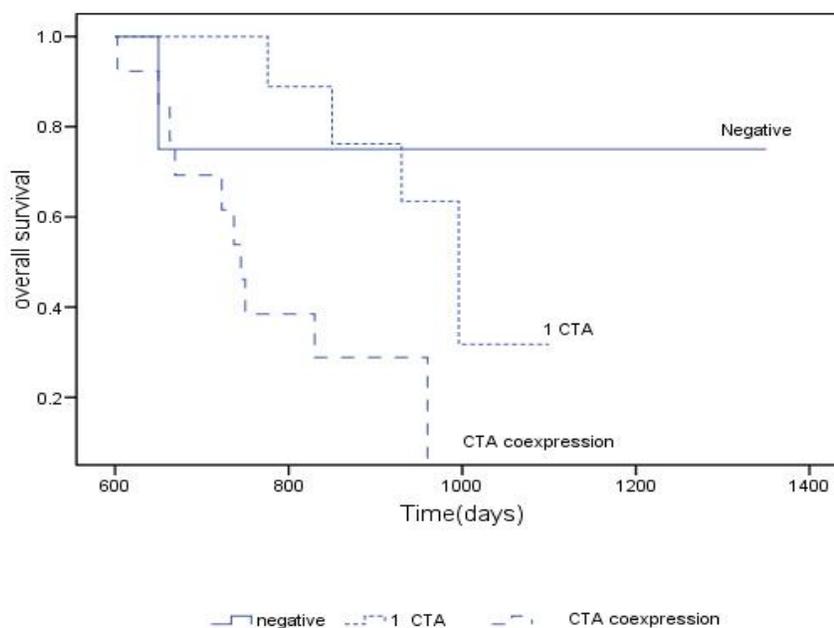


Figura 25. Presencia de CTA como factor de mal pronóstico

Se observa una menor sobrevida en aquellos pacientes que co-expresaron los genes CTA en LDCGB.

8. Discusión

Los antígenos testiculares de cáncer (CTA) han sido utilizados como biomarcadores tumorales, ya que se ha descrito que pueden estar implicados en la progresión tumoral y que aquellos pacientes que los expresan tienen una menor supervivencia. Dentro de los CTA, uno de los más estudiados y analizados son los genes de la familia *MAGE*. Su expresión se ha reportado en cáncer de pulmón (64), carcinoma gástrico (133), carcinoma hepatocelular (134), cáncer mamario (135), carcinoma colorectal (136), tumores de cabeza y cuello (137), osteosarcoma (138), cerebral (139), cáncer cérvico uterino (140). En la actualidad no existe una neoplasia que no exprese al menos un CTA.

Los primeros estudios de los CTA en leucemias se realizaron con la detección de los genes *MAGE*. Chambost y cols., en 1993 (142) realizaron un estudio en la población francesa con 27 muestras de pacientes con leucemia aguda (16 LAM y 11 LAL), 12 de leucemia mieloide crónica y 6 LLC, no hubo expresión del gen *MAGE-1* a nivel de mRNA, únicamente se presentó en las líneas celulares mieloides (K562, HEL y HL-60).

En 1995 Shichijo y cols, (141) reportaron que la expresión en leucemias fue del 1.2% (2/154) y que *MAGE-A* no se expresa en este tipo de cáncer, realizaron el estudio en 63 muestras de pacientes con leucemia (34 leucemia de células T; 16 casos de leucemia de células B y 23 leucemia mielomonocítica), analizando los genes *MAGE* (*MAGE-1, 2, 3, 4 y 6*). Reportó una frecuencia del 38% (24/63) (17 de leucemia de células T, 7 de leucemias de células B) en este grupo de genes. En el 2001 Chambost y cols, aumentaron el panel de pacientes para el estudio (170), incluyendo 154 muestras (22 de LMC, 72 de LAM, 7 de leucemia aguda bifenotípica, 27 de LAL y 10 de LLC). En contraste en el 2002 Adams y cols. (143) encontraron los genes CTA en una frecuencia de expresión en general del 48.5% (33/68) (9 de LAL y 24 de LMC), analizaron los genes *MAGE-A3, BAGE-1, GAGE y NY-ESO1*, en 68 muestras de pacientes (26 de LAM y 42 de LMC).

En la población mexicana el primer estudio sobre este grupo de genes fue realizado por Martínez A. y cols; (144) en el 2007, se analizaron 115 muestras de leucemias (34 de LAM, 76 de LAL de células B y 5 de LMC) para los genes *MAGE-A1*, *MAGE-A3* y *MAGE-B2*. La expresión encontrada para *MAGE A3* fue del 32.17% (37 /115) (14 de LAM, 23 en LAL de células B, 1 en LGC) y *MAGE B-2* en un 16%, este trabajo confirmó la presencia del gen *MAGE* en este tipo de cáncer.

Nuestros resultados mostraron que existe expresión de los genes CTA en pacientes con linfoma en la población mexicana encontrando una frecuencia del gen *MAGE A3* de 44.9%, seguido de *NY-ESO1* con un 33.3%; *MAGE A4*, *MAGE B2* y *LAGE* mostraron 27%, 21% y 20% respectivamente. Los genes *GAGE*, *BAGE* y *MAGE C1* tuvieron frecuencias menores del 20% (15.9%, 13.0% y 7.2%). En el linfoma difuso de células grandes se encontraron frecuencias para los genes *MAGE A3* del 39.28% y *NY-ESO1* del 46.42%. En el caso del linfoma de Hodgkin se encontró una frecuencia del gen *MAGE A3* del 30% el linfoma clásico de celularidad mixta y un 15.38% el linfoma clásico esclerosis nodular. En la bibliografía internacional no existen trabajos en donde se muestre la expresión de los CTA en los distintos tipos histológicos de linfoma ya que solo describen alguna variedad de ésta enfermedad, por lo tanto nuestro trabajo es de gran importancia ya que están representados los linfomas de mayor frecuencia en la población mexicana.

En el linfoma de Hodgkin, en dos trabajos analizan la frecuencia de los genes CTA, en el primero Inaoka y cols, (141) en el 2011 reportan que en linfoma de Hodgkin clásico en pacientes brasileños de todo el grupo de genes CTA (*MAGE*, *GAGE*; *NY-ESO*), solo los genes *MAGE A 7/38* (18.4%) y *MAGE-C1/CT7 5/38* (13.2%) se expresaron. Se describe que el 28.6% se encontraba en fase avanzada de la enfermedad en comparación con un 11.8% en estadios iniciales, sin embargo no tuvieron significancia estadística. El segundo reporte en LH es el de Chambost y cols., (146) en el 2000, donde se detecta la expresión del *gen MAGE A-4* a nivel de mRNA y de proteína en 5/18 (27.8%) en células Reed Sternberg. La frecuencia encontrada en nuestro estudio fue similar a los dos trabajos mencionados; del 30% en linfoma de celularidad mixta y 15% del tipo esclerosis nodular, aunque no se detalla el tipo de LH en ninguno de los dos trabajos, existe expresión de los CTA principalmente de los genes *MAGE*. Es necesario realizar un seguimiento y correlacionar con los factores clínicos pronósticos en este tipo de linfoma.

En el caso de los linfomas no Hodgkin también son escasos los reportes; Xie y cols.,(143) en el 2003 realizaron la determinación de antígenos testiculares en 93 pacientes con LNH; se incluyen muestras con las variedades histológicas de LDCGB, folicular, analizando el grupo de genes *MAGE-3*, *MAGE-4*, *CT-7*, *HOM-MEL-40/SSX-2*, *SSX-1*, *SSX-4*, *HOM-TES-14/SCP-1* y *HOM-TES-85*; los resultados demostraron que el LDCGB fue el que mayormente expresaba los CTA encontrando un 25% (7/28) del *HOM-TES-14/SCP-1* y del *SSX-1* 17.8% (5/28). En los linfomas de linaje T, los periféricos mostraron un 6% y en el tipo linfoma-leucemia de células T, solo el 2% de expresión para *HOM-TES-14/SCP-1*. De los genes de la familia *MAGE* se analizó el *MAGE A3* y *A4*, sin embargo, la expresión fue de tan solo el 6% en linfoma periférico de células T; el gen *NY-ESO1* no mostró expresión en ningún tipo de linfoma. Eichmuller y cols, (148,149) en el 2002 y 2003 han se realizó el análisis de expresión en linfomas de células T cutáneos (Extranodal) y encontraron una frecuencia en *MAGE-A9* 27% y de *GAGE* del 35% en 20 pacientes.

En los pacientes analizados en este trabajo el LDCGB y el linfoma folicular se expresaron todos los genes del panel de los genes CTA (*MAGE*, *BAGE*, *GAGE*, *NY-ESO*, *LAGE*). Los genes *MAGE A3* y *NY-ESO1* en LDCGB mostraron una frecuencia del 39.2% y del 46.42% respectivamente; en el caso del linfoma folicular se presentó con una frecuencia del 9% y del 18%, para éstos genes. En comparación con el estudio de Xie y cols, (143) en los linfomas de linaje T la frecuencia de *MAGE* fue del 6%; nosotros obtuvimos en Linfoma periférico de células T y en Linfoma/leucemia de células T del adulto el 20%, estas diferencias podrían ser por el número de muestras analizadas, sería necesario aumentar la n para realizar una comparación en cuanto a la expresión de CTA en leucemias de linaje T. Si bien es claro que los genes de la familia *MAGE* presentan frecuencias de expresión en un rango del 20% al 43% son escasos los estudios de los CTA en linfoma por lo que nuestros resultados son de gran importancia ya que se describe mayor información sobre la frecuencia y la relación que pudieran tener con el pronóstico y sobrevida de esta neoplasia. Debido a los resultados encontrados a nivel de mRNA del gen *MAGE A3*, se realizó la detección a nivel de proteína y una correlación clínica con factores clínico- pronósticos, así como el seguimiento determinando la implicación de éste gen en la sobrevida de los pacientes con LDCGB.

El LDCGB es el tipo más común de linfoma no Hodgkin y representa el 30% y el 40% de los nuevos diagnósticos. Como se sabe a pesar de modernos agentes de quimioterapia y terapia con anticuerpos monoclonales, el pronóstico de muchos pacientes con neoplasias hematológicas, especialmente aquellos con enfermedades agresivas como el LDCGB, el linfoma de células del manto (LCM) y el mieloma múltiple (MM), sigue siendo pobre. Ni el IPI, ni el R-IPI identifican un grupo de riesgo con menos de un 50% de probabilidades de sobrevida.

A pesar de los avances existen pocos marcadores moleculares que puedan identificar poblaciones con riesgo de falla al tratamiento y o mal pronóstico (127, 128). El gen *MAGE-A3* está implicado en predecir una evolución desfavorable en pacientes con cáncer de pulmón (83,84), melanoma (89,90), el mieloma múltiple (93,94), cáncer de cuello uterino (108) y el carcinoma de la vejiga urinaria (112). En cáncer de pulmón tiene una frecuencia en la expresión mayor al 50% tanto en su variedad de NSCLC como de carcinoma de células escamosas (SqCC) (85) y por lo tanto su importancia en la detección temprana de éstas neoplasias. La relación en cuanto a la presencia de los genes *MAGE* y el estadio clínico se ha realizado en pacientes con CNPCP (83) observándose mayor frecuencia en la expresión en estadios III y IV, la relación encontrada no es solo a nivel de mRNA sino de proteína. Además, se han realizado los seguimientos clínicos para valorar sobrevida y se reporta que aquellos pacientes que expresan alguno de los genes *MAGE* tienen una menor sobrevida y mal pronóstico (66, 68, 72,73); cabe mencionar que los genes específicos con relación con la sobrevida fueron *MAGE A3* y *MAGE A4*. En melanoma reportan que la frecuencia en la expresión aumenta de un estadio inicial del 45% a un 83% en tumores con metástasis, por lo que sugieren que la expresión de *MAGE* se asocia a un estado avanzado de la enfermedad y se ha encontrado relación con la expresión de genes y la infiltración de linfocitos (82,83). En mieloma múltiple; las frecuencias reportadas son mayores para el caso de *MAGE C1* en un 70% (93). Se ha observado que *MAGE C1* se relaciona con estadios avanzados y en el gen *MAGE A3* observaron una correlación con la proliferación avanzada de las células plasmáticas (97). En relación a utilizarlo como marcador de mal pronóstico y de sobrevida se han realizado seguimientos observando que puede ser un indicador de recaída temprana (95,96).

En el caso de LDCGB, Han y cols. (102) analizaron a 69 pacientes con este padecimiento en sangre periférica y encuentran una frecuencia de expresión de *MAGE A3* del 42.9%, evaluaron las características clínicas, el linaje de células y los índices pronósticos internacionales, incluyendo la edad, rendimiento, LDH, y la participación extra-nodales, y no encontraron correlación con ningún

parámetro clínico. Con respecto al seguimiento solo 6 pacientes (7.5%) fueron positivos después de 3 y 4 ciclos de quimioterapia y 3 (4.1%) después de 6-8 ciclos de quimioterapia. El descenso de la expresión del gen después de la quimioterapia sugiere la utilidad de este gen como marcador tumoral de células circulantes en linfoma.

Nuestros resultados muestran el uso del gen *MAGE-A3* como un marcador pronóstico en pacientes con LDCGB. Se encontró que la expresión de este gen se asocia con mal pronóstico en estos pacientes. Nuestros datos difieren de los resultados publicados previamente por Han y cols., (102), quien informó que la expresión de *MAGE-A3* no se asoció con características clínicas o el pronóstico en pacientes con LDCGB; posiblemente se debe a que el régimen de tratamiento fue diferente y a que la detección en nuestro estudio fue realizado en el tejido tumoral al diagnóstico de la enfermedad; mientras que en el estudio de Han y cols.,(102) se realizó en sangre periférica, sin embargo, la frecuencia en la expresión de este gen es similar.

En nuestro estudio, se observó una correlación significativa entre la expresión de mRNA de *MAGE-A3* y las etapas avanzadas de la enfermedad, los niveles séricos de LDH, el IPI, la respuesta al tratamiento y la sobrevida global. En los análisis previos de un número relativamente pequeño de pacientes con esta enfermedad, una variedad de características clínicas se asociaron consistentemente con el estadio-enfermedad y el resultado: la concentración sérica de LDH, el número de ganglios y sitios extranodales de la enfermedad, el tamaño del tumor, y la distinción entre enfermedad localizada (Ann Arbor etapas I o II) y enfermedad avanzada (estadios III o IV) (102). Nuestros resultados muestran que los pacientes en estadio III y IV LDCGB expresan mayor número de transcritos del gen *MAGE-A3* que los de las fases I y II. Lo anterior corrobora lo que se ha publicado sobre el incremento de los CTA conforme aumenta la malignidad. Hemos observado que la expresión de *MAGE-A3* se asocia con una menor sobrevida global. La cuantificación de los transcritos del gen *MAGE-A3* puede predecir la sobrevida en el LDCGB. Existen reportes de altos niveles de expresión de CTA que correlacionan a un peor pronóstico en el mieloma múltiple y en cáncer de pulmón de células no pequeñas (84,93). Los reportes parecen indicar que la función biológica de los genes *MAGE*, es la inhibición de la apoptosis brindándole una ventaja a la célula tumoral y de ahí su relación con un mal pronóstico en pacientes que los expresan (53,54).

Es clara la implicación del gen *MAGE A3* en relación a una menor sobrevida en el caso de LDCGB, es de gran importancia encontrar marcadores moleculares predictivos en pacientes con esta neoplasia, tratados con CHOP y R-CHOP, las cuales son las primeras líneas terapéuticas. Diversos estudios muestran que aun no existe algún marcador molecular en esta patología (131,132). Se sabe que las mutaciones o deleciones de *p53* en pacientes con LDCGB tienen un impacto negativo en la sobrevida del paciente, sobre todo en los que son tratados con R-CHOP. *MYC* también se ha considerado como marcador de menor sobrevida con R-CHOP en LDCGB no clasificables. La expresión de *BCL-6*, se ha asociado con un pronóstico favorable en pacientes tratados con CHOP; sin embargo, al utilizar R-CHOP en los pacientes BL6 positivos se no encontró alguna asociación, lo mismo sucede con *BCL-2* en linfomas foliculares (150,151). En nuestros resultados *MAGE A3* puede ser un marcador de menor sobrevida en pacientes tratados con CHOP, pero no en aquellos tratados con R-CHOP (152,153). Será interesante evaluar la relación de la expresión de *MAGE-A3* y la respuesta al tratamiento o el pronóstico en los pacientes tratados con rituximab y CHOP, así como la co-expresión de genes como *BCL-6*, *p53*, como un panel de marcadores para esta enfermedad.

Otro de los genes CTA de gran valor pronóstico es el gen *NY-ESO1* conocido como CTAG1B (cancer/testis antigen 1B) fue aislado en la ciudad de New York de una paciente femenina de 58 años con carcinoma de células escamosas de esófago se localiza en la región cromosómica Xq24-Xq28, zona en donde se encuentran genes como *MAGE-A*, *MAGE C*, *NY-ESO1*. Este se conoce como el antígeno con mayor inmunogenicidad, por lo ha sido utilizado en esquemas de vacunación en muchos tipos de cáncer (154). El gen codifica para una proteína de 19 kDa con 180 aminoácidos. La expresión de estos genes parece estar relacionada con la desmetilación de las regiones promotoras, al igual que los demás miembros CTA; se ha identificado en tejidos normales a nivel citoplasmático y nuclear de las espermatogonias. Su función aun no está descrita, se sabe que en células stem cell se ha detectado solo a nivel nuclear lo que ha sugerido su posible relación con promover en las células algunas características como la inmortalidad, la auto renovación, la capacidad migratoria y capacidad de invasión (154).

La expresión en tejidos malignos se ha realizado por métodos como la RT-PCR y por inmunohistoquímica y son escasos los estudios en donde se realiza la cuantificación o bien la secuenciación del gen amplificado. Las frecuencias reportadas varían según el tipo de cáncer; en cáncer de pulmón de células no pequeñas (63-67), melanoma (70-72) próstata (155), carcinoma

hepatocelular (134) y carcinoma de células escamosas de esófago (156), gástrico (157), la expresión se encuentra entre un 25% a 45%; en CA mama(85) y vejiga (158), de un 10% a un 35%; en el caso de ovario (82) y colon (80) las frecuencias son menores al 15%.

En el caso de cánceres hematológicos se ha descrito que en mielomas su frecuencia es mayor del 50%; el caso contrario se describe en leucemias; Lim y cols. (159) analizan muestras de LAM, LAL, LMC y Mieloma Múltiple y no detecta expresión de *NY-ESO1*. Niemeyer y cols. (160); no detecta expresión en LAM, solo en un 15% en el caso de LAL. Adams, 2002 (143) analiza muestras de LMC en fase crónica, blástica y acelerada sin encontrar expresión de este gen, encuentra solo un 4% en LAM. En el caso de los linfomas los reportes son escasos. Inaoka y cols (145) en linfomas de Hodgkin analizando 38 pacientes con ausencia de expresión del gen *NY-ESO1* por inmunohistoquímica. Por otra parte, Nishikawa y cols, (161) demostraron expresión del gen *NY-ESO1* en el 61% en linfoma/leucemia de células T adulto. Se ha demostrado que existe correlación entre la expresión de los genes *NY-ESO1* y el grado de metástasis en el carcinoma de células escamosas (162).

La relación entre la expresión del gen y el grado del tumor en diversos cánceres no es clara; en el caso de urotelial, existe una clara asociación entre la expresión de mRNA y de grado de tumor, ya que existe un aumento progresivo del 2% en tumores de grado 1; al 44% en tumores grado 4 (162). En cambio en cáncer de próstata se observó una relación de *NY-ESO1* (detectado con IHQ) con PSA (Antígeno específico prostático) pero no con el Score de Gleason que es usado para la estadificación del tumor e incluyendo invasividad y poder metastásico (155). Su utilidad como marcador pronóstico se ha observado en cánceres como melanoma (163), mieloma (164) cáncer de pulmón de células no pequeñas (165,166); en linfoma no existen datos sobre su relación pronóstica. Nuestros resultados confirman que la expresión del gen *NY-ESO1* se asocia con el estadio avanzado de la enfermedad, niveles de LDH, IPI y la respuesta al tratamiento. En LDCGB no existe ningún reporte en la literatura internacional que asocie la expresión de *NY-ESO1* con los parámetros clínicos.

Los niveles de expresión del gen *NY-ESO1* fueron evaluados por medio de qRT-PCR, los resultados demuestran un mayor número de transcritos en los estadios III y IV en los pacientes con LDGBC que en los estadios I y II, $p=0.007$. Dyrskjot y cols (158) relaciona los niveles de expresión por medio de qRT-PCR con supervivencia libre de progresión $p=0.040$ en carcinoma

urotelial y es el único trabajo que miden niveles de expresión *NY-ESO1*. Nosotros observamos que la expresión del gen *NY-ESO1* está asociado con una menor sobrevida, ($p=0.002$). Por lo que la expresión del gen *NY-ESO1* en los pacientes con LDCGB es de gran relevancia ya que podría ser un marcador molecular con valor pronóstico.

Los reportes sobre la coexpresión son limitados, se conoce que los genes que se expresan asociados son *MAGE-A (A3, A4, C1)*, *NY-ESO1* y *GAGE* en un 40 al 60% de diversos cánceres; además se sabe que pacientes que coexpresan estos genes presentan un mal pronóstico y sobrevida corta la mayor parte de estos estudios se ha realizado a nivel de proteína por medio de inmunohistoquímica (162-164). En el análisis de sobrevida encontramos que los genes fueron *MAGE A3, MAGE A4, MAGE B2, GAGE* y *NY-ESO 1* que pudieran ser utilizados como marcadores de mal pronóstico, pues cada uno de ellos confiere una menor sobrevida. En la coexpresión se observó que los genes *MAGE A3-NY-ESO1* y *NY-ESO1-MAGE A4* son los que se expresan en LDCGB con mayor frecuencia, y que existe una relación entre el número de genes CTA que pueda expresar un paciente con esta neoplasia y una menor sobrevida.

En mieloma múltiple se ha observado que la coexpresión entre *MAGE C1* y *MAGE-A3* aumenta conforme los estadios clínicos (164); en el caso de NSCLC se ha observado que *MAGE A3* y *NY-ESO1*, son marcadores de mal pronóstico independientemente de las variables clínicas. (65, 165,166). En cáncer colorectal expresión de *NY-ESO1* puede servir como un marcador para la metástasis local y la enfermedad avanzada, mientras que la expresión de *MAGE A4* esta significativamente asociado con nódulos linfáticos metastásicos (167), esta asociación de mal pronóstico también se ha descrito en Ca de ovario (168). Cho y cols, (169) confirmaron la interacción de *MAGE-C1 con NY-ESO1* y la localización citoplasmática de ambas proteínas en líneas celulares de cáncer de diferentes orígenes, así como en tumores primarios de mieloma múltiple y CA de pulmón de células no pequeñas.

La co-expresión de los CTA en tumores, podría sugerir que estos genes pueden ser activados por un mecanismo común y debido a que la activación es por mecanismos epigenéticos, sería importante conocer los patrones de metilación en los pacientes y asociarlos con los niveles expresión de mRNA. Nuestros resultados muestran la importancia en la expresión de los CTA, ya que pueden ser como marcadores moleculares pronóstico en LDCGB.

9. Conclusiones

Los pacientes con linfoma que expresaron los genes CTA mostraron un pronóstico desfavorable y una menor sobrevida

- Existe expresión de los CTA en linfoma
- La frecuencia de expresión encontrada en todas las variedades de linfoma fue del 44.9%, para gen *MAGE A3*, seguido de *NY-ESO1* con un 33.3%. Los genes *GAGE*, *BAGE* y *MAGE C1* tuvieron frecuencias menores a 20% (15.9%, 13.0% y 7.2%).
- En el LDCGB, los genes de mayor expresión fueron *NY-ESO1* y *MAGEA3* con 46.4% y 39.2% respectivamente.
- Los niveles de expresión de mRNA de los genes *NY-ESO1* y *MAGEA3* correlacionan con el estadio clínico de la enfermedad en LDCGB.
- En LDCGB se determinó una relación directa entre los niveles de la proteína *MAGE A3* y el estadio clínico.
- Existe una asociación entre los genes *NY-ESO1* y *MAGEA3* estadísticamente significativa y entre el IPI, estadio clínico y LDH en LDCGB.
- Los genes *NY-ESO1* y *MAGEA3* están relacionados con una menor sobrevida en los pacientes con LDCGB tratados con CHOP.
- Existe coexpresión de los CTA en linfoma, donde predominan *NY-ESO1 -MAGE A3* y *NY-ESO1- MAGE A4*.
- La coexpresión de los CTA está asociada a una menor sobrevida del paciente con LDCGB tratados con CHOP
- Los genes CTA pueden ser utilizados como marcadores clínico-pronóstico en pacientes con LDCGB tratados con CHOP.

10. Perspectivas

- Evaluar la asociación clínico-pronóstico de los CTA en las diferentes variedades histológicas.
- Conocer los patrones de metilación de los CTA en las diversas variedades histológicas y asociarlos con parámetros clínicos y sobrevida.
- Conocer si existe asociación de otros genes como BCL-6, BCL-2 y los CTA y su impacto clínico.
- Realizar un seguimiento clínico de la expresión de los CTA en células circulantes de linfoma y valorar su uso como marcador de enfermedad mínima residual.
- Asociar el valor pronóstico de los CTA en pacientes tratados con R-CHOP.

11. Referencias bibliográficas

1. Van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991; 254: 1643-7.
2. De Plaen E, Lurquin C, Lethé B, Van der Bruggen P, Brichard V, Renauld JC, Coulie P, Van Pel A, Boon T. Identification of genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes. *Methods: Comp Method Enzymol* 1997, 12: 125-142,
3. Old LJ. Cancer/testis (CT) antigens- a new link between gametogenesis and cancer. *Cancer Immun.*2001;1-9
4. Jungbluth AA, Silva WA JR, Iversen K, Frosina D, zaidi B, Coplan K, et al. Expression of cancer testis (CT) in placenta. *Cancer Immun.* 2007; 7: 15-29
5. Cronwrigth GK, Götherström C, Darey P, Ehnman M, Brodin B. Cancer Testis antigen expression in human mesenchymal stem cells: down-regulation of SSX impairs cell migration and matrix metalloproteinase 2 expression. *Cancer Res.* 2005, 65: 2207-2215 2005
6. Costa, Sigalotti I, Covre A, Zabierowski S, Himes B, Giorgio I, Herlyn M. Cancer Testis Antigens in Human Melanoma Stem Cells: Expression, Distribution, and Methylation Status. *J. Cell. Physiol.* 2008.215: 287–291.
7. Atanackovic D, Altorki NK, Stockert E, Williamson B, Jungbluth AA, Ritter E, Santiago E, Ferrara CA, Matsuo M, Selvakumar A, Dupont B, Chen YT, Hoffman EW, Ritter G, Old LJ and Gnjjatic S. Vaccine-induced CD4+ T cell responses to *MAGE-3* protein in lung cancer patients. *J Immunol*, 2004, 172: 3289-3296.
8. Bedrosian H, Rosemarie Mick, Shuwen Xu, Harvey Nisenbaum, Faries M, Zhang P, Cohen PA, Koski G, Czerniecki BJ. Intranodal Administration of Peptide-Pulsed Mature Dendritic Cell Vaccines Results in Superior CD8 T-Cell Function in Melanoma Patients. *J Clin Oncol* 2003 (21):3826-3835.
9. Brossart P. Dendritic cells in vaccination therapies of malignant diseases. *Transfus Apheresis Sci.* 2002;27(2):183-6
10. Goldalaine D., Carrasco J., Lucas S. Polyclonal CTL response observed in melanoma patients vaccinated with dendritic cells pulsed with a *MAGE-3.A1* peptide. *J Immunol.* 2003; 171:4893-4897
11. Grafouri-Fard S, Hossein Mondarresi M. Cancer- Testis Antigens: Potencial Targets for Cancer Immunotherapy. *Archives of Iradian medicine* 2009;(12):4,395-404
12. Scalan M J., Simpson J.G., and Old LJ. *Cancer Immunity* 2004; 4:1-15

13. Kirkin AF, Dzhandzhugazyan KH, Zeutehn J. Cancer/Testis Antigens: Structural and Immunobiological Properties. *Cancer Investigation*, 2002; 2: 222-236
14. Ross MT, Grafham DV, Coffey AJ, Scherer S, McLay K, Muzny D et al. The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature*. 2005; 434(7031):325-37.
15. De Plaen E, Arden K, Traversari C, Gaforio JJ, Szikora JP, De Smet C, Brasseur F, Van der Bruggen P, Lethé B, Lurquin C, Brasseur R, Chomez P, De Backer O, Cavenee W and Boon T. Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the *MAGE* family. *Immunogen* 1994, 40: 360-369.
16. Mathieu MG, Miles AK, Li G, McArdle SE, Rees RC. Cancer/testis antigens for therapeutic use. *J BUON*. 2009;14(1):S97-102.
17. Serrano, A.; Lethé, B.; Delroisse, J.M.; et al. Quantitative Evaluation of the Expression of *MAGE* Genes in Tumors by Limiting Dilution of cDNA Libraries. *Int. J. Cancer* 1999, 83, 664–669.
18. Visseren, M.J.; Van der Burg, S.H.; van der Voort, E.I.; et al. Identification of HLA-A*0201-Restricted CTL Epitopes Encoded by the Tumor-Specific *MAGE-2* Gene Product. *Int. J. Cancer* 1997, 73, 125–130.
19. Gaugler, B.; Van den Eynde, B.J.; Van der Bruggen, P.; et al. Human Gene *MAGE-3* Codes for an Antigen Recognized on a Melanoma by Autologous Cytolytic T Lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1994, 179, 921–930.
20. Manici, S.; Sturniolo, T.; Imro, M.A.; et al. Melanoma Cells Present a *MAGE-3* Epitope to CD4+ Cytotoxic T Cells in Association with Histocompatibility Leukocyte Antigen DR11. *J. Exp. Med.* 1999, 189, 871–876.
21. Chaux, P.; Vantomme, V.; Stroobant, V.; et al. Identification of *MAGE-3* Epitopes Presented by HLA-DR Molecules to CD4+ T Lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1999, 189, 767–778.
22. Duffour, M.T.; Chaux, P.; Lurquin, C.; et al. A *MAGEA4* Peptide Presented by HLA-A2 is recognized by Cytolytic T Lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 1999, 29, 3329–3337.
23. Jurk, M.; Kremmer, E.; Schwarz, U.; et al. *MAGE-11* Protein is Highly Conserved in Higher Organisms and Located Predominantly in the Nucleus. *Int. J. Cancer* 1998, 75, 762–766.
24. Huang, L.Q.; Brasseur, F.; Serrano, A.; et al. Cytolytic T Lymphocytes Recognize an Antigen Encoded by *MAGE-A10* on a Human Melanoma. *J. Immunol.* 1999, 162, 6849–6854.
25. Tanzarella, S.; Russo, V.; Lionello, I.; et al. Identification of a Promiscuous T-Cell Epitope Encoded by Multiple Members of the *MAGE* Family. *Cancer Res.* 1999, 59, 2668–2674.
26. Panelli, M.C.; Bettinotti, M.P.; Lally, K.; et al. A Tumor- Infiltrating Lymphocyte from a Melanoma Metastasis with Decreased Expression of Melanoma Differentiation Antigens Recognizes *MAGE-12*. *J. Immunol.* 2000, 164, 4382–4392.

27. Lurquin, C.; De Smet, C.; Brasseur, F.; et al. Two Members of the Human *MAGEB* Gene Family Located in Xp21.3 Are Expressed in Tumors of Various. Histological Origins. *Genomics* 1997, 46, 397–408.
28. Muscatelli, F.; Walker, A.P.; De Plaen, E.; et al. Isolation and Characterization of a *MAGE* Gene Family in the Xp21.3 Region. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1995, 92, 4987–4991.
29. Mc Curdy DK, Tai LO, Nguyen J, Wang Z, Yang HM, Udar N, Naiem F, Concannon P, Gatti RA. *MAGE* Xp-2: a member of the *MAGE* gene family isolated from an expression library using systemic lupus erythematosus sera. *Mol Genet Metab* 1998, 63: 3-13
30. De Plaen, E.; Boon, T. *MAGE-B5*, *MAGE-B6*, *MAGE-C2*, and *MAGE-C3*: Four New Members of the *MAGE* Family with Tumor-Specific Expression. *Int. J. Cancer* 2000, 87, 55–60.
31. Ohman Forslund K, Nordqvist K. The melanoma antigen genes--any clues to their functions in normal tissues? *Exp Cell Res.* 2001, 1; 265(2):185-94.
32. Iacobuzio-Donahue CA. Epigenetic Changes in Cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2009; 4:229–49
33. Stephen B Baylin. DNA methylation and gene silencing in cancer *Nature Clinical Practice Oncology* 2005; 2, S4-S11
34. Jungbluth AA, Busam KJ, Kolb D, Iversen K, Coplan K, Chen YT, Spagnoli GC, Old LJ. Expression of *MAGE*-antigens in normal tissues and cancer. *Int J Cancer.* 2000;85(4):460-5
35. Fratta E, Sigalotti L, Colizzi F, Covre A, Nicolay HJ, Danielli R, Fonsatti E, Altomonte M, Calabrò L, Coral S, Maio M. Epigenetically regulated clonal heritability of CTA expression profiles in human melanoma. *J Cell Physiol.* 2010; 223(2):352-8.
36. Sigalotti L, Covre A, Zabierowski S, Himes B, Colizzi F, Natali PG, Herlyn M, Maio M Cancer testis antigens in human melanoma stem cells: expression, distribution, and methylation status. *J Cell Physiol.* 2008; 215(2):287-91.
37. De Smet C, De Backer O, Faraoni I, Lurquin C, Brasseur F, Boon T. The activation of human gene *MAGE-1* in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996; 93(14):7149-53.
38. Serrano A, García A, Abril E, Garrido F, Ruiz-Cabello F. Methylated CpG points identified within *MAGE-1* promoter are involved in gene repression. *Int J Cancer.* 1996; 68(4):464-70.
39. Janssen BL, van de Locht LT, Fourkour A, de Smet C, Mensink EJ, van Muijen GN, de Vries TJ. Transcription of the *MAGE-1* gene and the methylation status of its Ets binding promoter elements: a quantitative analysis in melanoma cell lines using a real-time polymerase chain reaction technique. *Melanoma Res.* 1999; 9(3):213-22.
40. Lorient A, De Plaen E, Boon T, De Smet C. Transient down-regulation of DNMT1 methyltransferase leads to activation and stable hypomethylation of *MAGE-A1* in melanoma cell. *J Biol Chem.* 2006; 281(15):10118-26.

41. Jang SJ, Soria JC, Wang L, Hassan KA, Morice RC, Walsh GL, Hong WK, Mao L. Activation of melanoma antigen tumor antigens occurs early in lung carcinogenesis. *Cancer Res.* 2001; 61(21):7959-63.
42. Honda T, Tamura G, Waki T, Kawata S, Terashima M, Nishizuka S, Motoyama T. Demethylation of *MAGE* promoters during gastric cancer progression. *Br J Cancer.* 2004; 90(4):838-43.
43. Yang B, Wu J, Maddodi N, Ma Y, Setaluri V, Longley BJ. Epigenetic control of *MAGE* gene expression by the KIT tyrosine kinase. *J Invest Dermatol.* 2007; 127(9):2123-8.
44. Sandlow JI, Feng HL, Sandra A. Localization and expression of the c-kit receptor protein in human and rodent testis and sperm. *Urology.* 1997; 49 (3):494-500.
45. Gaskell TL, Esnal A, Robinson LL, Anderson RA, Saunders PT. Immunohistochemical profiling of germ cells within the human fetal testis: identification of three subpopulations. *Biol Reprod.* 2004; 71(6):2012-21.
46. Takahashi K, Shichijo S, Noguchi M, Hirohata M, Itoh K. Identification of *MAGE-1* and *MAGE-4* proteins in spermatogonia and primary spermatocytes of testis. *Cancer Res.* 1995;55(16):3478-82
47. Gjerstorff MF, Kock K, Nielsen O, Ditzel HJ. *MAGE-A1*, *GAGE* and NY-ESO1 cancer/testis antigen expression during human gonadal development. *Hum Reprod* 2007;(4):953-60.
48. Xiao, Chen HS. Biological functions of melanoma-associated antigens. *World J Gastroenterol.* 2004; 10(13):1849-53.
49. Miranda EI. *MAGE* biological functions and potential clinical applications. *Leuk Res.*2010 ;34(9):1121-2.
50. Taniura H, Taniguchi N, Hara M, Yoshikawa K. Necdin, a postmitotic neuron-specific growth suppressor, interacts with viral transforming proteins and cellular transcription factor E2F1. *J Biol Chem* 1998; 273: 720-728.
51. Taniura H, Matsumoto K, Yoshikawa K. Physical and functional interactions of neuronal growth suppressor Necdin with p53. *J Biol Chem* 1999; 274: 16242-16248.
52. Nakada Y, Taniura H, Uetsuki T, Inazawa J, Yoshikawa K. The human chromosomal gene for necdin, a neuronal growth suppressor, in the Prader-Willi syndrome deletion region. *Gene* 1998; 213: 65-72
53. Yang B, O'Herrin SM, Wu J, Reagan-Shaw S, Ma Y, Bhat KM, Gravekamp C, Setaluri V, Peters N, Hoffmann FM, Peng H, Ivanov AV, Simpson AJ, Longley BJ. *MAGE-A*, *mMAGE-b*, and *MAGE-C* proteins form complexes with KAP1 and suppress p53-dependent apoptosis in *MAGE*-positive cell lines. *Cancer Res.* 2007;67(20):9954-62.
54. Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem* 2002; 277: 34287-94.

55. Sakurai T, Itoh K, Higashitsuji H, et al. A cleaved form of *MAGE-A4* binds to Miz-1 and induces apoptosis in human cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 15505–14.
56. Peikert T, Specks U, Farver C, Erzurum SC, Comhair SA. Melanoma antigen A4 is expressed in non-small cell lung cancers and promotes apoptosis. *Cancer Res.* 2006;66(9):4693-700.
57. Nagao T, Higashitsuji H, Nonoguchi K, et al. *MAGE-A4* interacts with the liver oncoprotein gankyrin and suppresses its tumorigenic activity. *J Biol Chem* 2003; 278: 10668–74.
58. Cilensek ZM, Yehiely F, Kular RK, Deiss LP. A member of the *GAGE* family of tumor antigens is an anti-apoptotic gene that confers resistance to Fas/CD95/APO-1, Interferon-gamma, taxol and gamma-irradiation. *Cancer Biol Ther.* 2002;1(4):380-7.
59. Duan Z, Duan Y, Lamendola DE, Yusuf RZ, Naeem R, Penson RT, Seiden MV. Overexpression of *MAGE/GAGE* genes in paclitaxel/doxorubicin-resistant human cancer cell lines. *Clin Cancer Res.* 2009 (7):2778-85.
60. Kasuga C, Nakahara Y, Ueda S, Hawkins C, Taylor MD, Smith CA, Rutka JT. Expression of *MAGE* and *GAGE* genes in medulloblastoma and modulation of resistance to chemotherapy. Laboratory investigation. *J Neurosurg Pediatr.* 2008 ;1(4):305-31
61. Figueiredo DL, Mamede RC, Spagnoli GC, Silva WA , Zago M, Neder L, Jungbluth AA, Saggiaro FP. High expression of cancer testis antigens *MAGE-A*, *MAGE-C1/CT7*, *MAGE-C2/CT10*, *NY-ESO1*, and *GAGE* in advanced squamous cell carcinoma of the larynx. *Head Neck.* 2011;33(5):702-7
62. Zou C, Shen J, Tang Q, Yang Z, Yin J, Li Z, Xie X, Huang G, Lev D, Wang J. Cancer-testis antigens expressed in osteosarcoma identified by gene microarray correlate with a poor patient prognosis. *Cancer.* 2012;118(7):1845-55
63. Melloni G, Ferreri AJ, Russo V, Gattinoni L, Arrighoni G, Ceresoli GL, Zannini P, Traversari C. Prognostic significance of cancer-testis gene expression in resected non-small cell lung cancer patients. *Oncol Rep.* 2004,12 (1):145-51.
64. Yoshida N, Abe H, Ohkuri T, Wakita D, Sato M, Noguchi D, Miyamoto M, Morikawa T, Kondo S, Ikeda H, Nishimura T. Expression of the *MAGE-A4* and *NY-ESO1* cancer-testis antigens and T cell infiltration in non-small cell lung carcinoma and their prognostic significance. *Int J Oncol.* 2006; 28(5):1089-98.
65. Kim SH, Lee S, Lee CH, Lee MK, Kim YD, Shin DH, Choi KU, Kim JY, Park do Y, Sol MY. Expression of cancer-testis antigens *MAGE-A3/6* and *NY-ESO1* in non-small-cell lung carcinomas and their relationship with immune cell infiltration. *Lung.* 2009; 187(6):401-11.
66. Grah J, Samija M, Juretić A, Sarcević B, Sobat H. Immunohistochemical expression of cancer/testis antigens (*MAGE-A3/4*, *NY-ESO1*) in non-small cell lung cancer: the relationship with clinical-pathological features. *Coll Antropol.* 2008; 32(3):731-6.

67. Shigematsu Y, Hanagiri T, Shiota H, Kuroda K, Baba T, Mizukami M, So T, Ichiki Y, Yasuda M, So T, Takenoyama M, Yasumoto K. Clinical significance of cancer/testis antigens expression in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2010; 68(1):105-10.
68. Siene W, Mecklenburg I, Dango S, Ehrhardt P, Kirschbaum A, Passlick B, Pantel K. Detection of *MAGE-A* transcripts in bone marrow is an independent prognostic factor in operable non-small-cell lung cancer *Clin Cancer Res*. 2007;13(13):3840-7.
69. Sugita M, Geraci M, Gao B, Powell RL, Hirsch FR, Johnson G, Lapadat R, Gabrielson E, Bremnes R, Bunn PA, Franklin WA. Combined use of oligonucleotide and tissue microarrays identifies cancer/testis antigens as biomarkers in lung carcinoma. *Cancer Res*. 2002, 62(14):3971-9.
70. Prasad ML, Jungbluth AA, Patel SG, Iversen K, Hoshaw-Woodard S, Busam KJ. Expression and significance of cancer testis antigens in primary mucosal melanoma of the head and neck. *Head Neck*. 2004;26(12):1053-7
71. Lüftl M, Schuler G, Jungbluth AA. Melanoma or not? Cancer testis antigens may help. *Br J Dermatol*. 2004; 151(6):1213-8.
72. Barrow C, Browning J, MacGregor D, Davis ID, Sturrock S, Jungbluth AA, Cebon J. stage. *Clin Cancer Res*. 2006; 1; 12(3 Pt 1):764-71.
73. Busam J., Kristin Iversen, B.S., Marianne Berwick, Guilio C. Spagnoli,,Lloyd J. Old., Achim A. Jungbluth. Immunoreactivity with the Anti-*MAGE* Antibody 57B in Malignant Melanoma: Frequency of Expression and Correlation with Prognostic Parameters. *Mod Pathol* 2000;13(4):459–465
74. Pastorcic-Grgic M, Sarcevic B, Dosen D, Juretic A, Spagnoli GC, Grgic M. Prognostic value of *MAGE-A* and NY-ESO1 expression in pharyngeal cancer. *Head Neck*. 2009, 22.
75. Cheng S, Liu W, Mercado M, Ezzat S, Asa SL. Expression of the melanoma-associated antigen is associated with progression of human thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2009;16(2):455-66.
76. Perez D, Herrmann T, Jungbluth AA, Samartzis P, Spagnoli G, Demartines N, Clavien PA, Marino S, Seifert B, Jaeger D. Cancer testis antigen expression in gastrointestinal stromal tumors: new markers for early recurrence. *Int J Cancer*. 2008; 123(7):1551-5.
77. Suzuki S, Sasajima K, Sato Y, Watanabe H, Matsutani T, Iida S, Hosone M, Tsukui T, Maeda S, Shimizu K, Tajiri T. *MAGE-A* protein and *MAGE-A10* gene expressions in liver metastasis in patients with stomach cancer. *Br J Cancer*. 2008; 99(2):350-6.
78. Kobayashi Y, Higashi T, Nouse K, Nakatsukasa H, Ishizaki M, Kaneyoshi T, Toshikuni N, Kariyama K, Nakayama E, Tsuji T. Expression of *MAGE*, *GAGE* and *BAGE* genes in human liver diseases: utility as molecular markers for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2000,32 (4):612-7.
79. Kim J, Reber HA, Hines OJ, Kazanjian KK, Tran A, Ye X, Amersi FF, Martinez SR, Dry SM, Bilchik AJ, Hoon DS. The clinical significance of *MAGEA3* expression in pancreatic cancer. *Int J Cancer*. 2006; 118(9):2269-75.

80. Scalan MJ, Welt S, Gordon CM, Chen YT, Gure AO, Stockert E, Jungbluth AA, Ritter G, Jäger D, Jäger E, Knuth A, Old LJ. Cancer-related serological recognition of human colon cancer: identification of potential diagnostic and immunotherapeutic targets.. *Cancer Res.* 2002, 15; 62(14):4041-7.
81. Hofmann M, Ruschenburg I. mRNA detection of tumor-rejection genes *BAGE*, *GAGE*, and *MAGE* in peritoneal fluid from patients with ovarian carcinoma as a potential diagnostic tool. *Cancer.* 2002; 96(3):187-93.
82. Yakirevich E, Sabo E, Lavie O, Mazareb S, Spagnoli GC, Resnick MB. Expression of the *MAGE-A4* and NY-ESO1 cancer-testis antigens in serous ovarian neoplasms. *Clin Cancer Res.* 2003,9(17):6453-60.
83. Bellati F, Napoletano C, Tarquini E, Palaia I, Landi R, Mancini N, Spagnoli G, Rughetti A, Panici PB, Nuti M. Cancer testis antigen expression in primary and recurrent vulvar cancer: association with prognostic factors. *Eur J Cancer.* 2007;43(17):2621-7.
84. Napoletano C, Bellati F, Tarquini E, Tomao F, Taurino F, Spagnoli G, Rughetti A, Muzii L, Nuti M, Benedetti Panici P. *MAGE-A* and NY-ESO1 expression in cervical cancer: prognostic factors and effects of chemotherapy. *Am J Obstet Gynecol.* 2008;198(1):1-7
85. Bandić D, Juretić A, Sarcević B, Separović V, Kujundžić-Tiljak M, Hudolin T, Spagnoli GC, Cović D, Samija M. Expression and possible prognostic role of *MAGE-A4*, NY-ESO1, and HER-2 antigens in women with relapsing invasive ductal breast cancer: retrospective Immunohistochemical study. *Croat Med J.* 2006; 47(1):32-41.
86. Krüger S, Ola V, Feller AC, Fischer D, Friedrich M. Expression of cancer-testis antigen CT7 (*MAGE-C1*) in breast cancer: an immunohistochemical study with emphasis on prognostic utility. *Pathol Oncol Res.* 2007, 13(2):91-6.
87. Sharma P, Shen Y, Wen S, Bajorin DF, Reuter VE, Old LJ, Jungbluth AA. Cancer-testis antigens: expression and correlation with survival in human urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2006 ;12(18):5442-7
88. Bergeron A, Picard V, LaRue H, Harel F, Hovington H, Lacombe L, Fradet Y. High frequency of *MAGE-A4* and *MAGE-A9* expression in high-risk bladder cancer. *Int J Cancer.* 2009;125(6):1365-7
89. Grau E, Oltra S, Martínez F, Orellana C, Cañete A, Fernández JM, Hernández-Martí M, Castel V. *MAGE-A1* expression is associated with good prognosis in neuroblastoma tumors. *Cancer Res Clin Oncol.* 2009,135(4):523-31.
90. Andrade VC, Vettore AL, Felix RS, Almeida MS, Carvalho F, Oliveira JS, Chauffaille ML, Andriolo A, Caballero OL, Zago MA, Colleoni GW. Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients. *Cancer Immunol.* 2008, (1); 82.
91. Andrade VC, Vettore AL, Regis Silva MR, Félix RS, Almeida MS, de Carvalho F, Zago MA, Caballero OL, Simpson AJ, Colleoni GW. Frequency and prognostic relevance of cancer testis antigen 45 expression in multiple myeloma. *Exp Hematol.* 2009; 37(4):446-9.

92. Atanackovic D, Luetkens T, Hildebrandt Y, Arfsten J, Bartels K, Horn C, Stahl T, Cao Y, Zander AR, Bokemeyer C, Kröger N. Longitudinal analysis and prognostic effect of cancer-testis antigen expression in multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(4):1343-52.
93. Condomines M, Hose D, Raynaud P, Hundemer M, De Vos J, Baudard M, Moehler T, Pantesco V, Moos M, Schved JF, Rossi JF, Rème T, Goldschmidt H, Klein B. Cancer/testis genes in multiple myeloma: expression patterns and prognosis value determined by microarray analysis. *J Immunol.* 2007; 178(5):3307-15.
94. Jungbluth AA, Ely S, DiLiberto M, Niesvizky R, Williamson B, Frosina D, Chen YT, Bhardwaj N, Chen-Kiang S, Old LJ, Cho HJ. The cancer-testis antigens CT7 (*MAGE-C1*) and *MAGE-A3/6* are commonly expressed in multiple myeloma and correlate with plasma-cell proliferation. *Blood.* 2005; 106(1):167-74.
95. Atanackovic D, Luetkens T, Kloth B, Fuchs G, Cao Y, Hildebrandt Y, Meyer S, Bartels K, Reinhard H, Lajmi N, Hegewisch-Becker S, Schilling G, Platzbecker U, Kobbe G, Schroeder T, Bokemeyer C, Kröger N. Cancer-testis antigen expression and its epigenetic modulation in acute myeloid leukemia. *Am J Hematol.* 2011; 86(11):918-22.
96. Almstedt M, Blagitko-Dorfs N, Duque-Afonso J, Karbach J, Pfeifer D, Jäger E, Lübbert M. The DNA demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine induces expression of NY-ESO1 and other cancer/testis antigens in myeloid leukemia cells. *Leuk Res.* 2010; 34(7):899-905.
97. Matsushita M, Yamazaki R, Ikeda H, Kawakami Y. Preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) in the development of diagnostic and therapeutic methods for hematological malignancies. *Leuk Lymphoma.* 2003; 44(3):439-44.
98. Ji Y, Zhang W, Wang J, Gu L. mRNA expression of the XAGE-1 gene in human acute leukemia. *Int J Hematol.* 2010; 91(2):209-12.
99. Claus R, Almstedt M, Lübbert M. Epigenetic treatment of hematopoietic malignancies: in vivo targets of demethylating agents. *Semin Oncol.* 2005; 32(5):511-20.
100. Winkler C, Steingrube DS, Altermann W, Schlaf G, Max D, Kewitz S, Emmer A, Kornhuber M, Banning-Eichenseer U, MS. Hodgkin's lymphoma RNA-transfected dendritic cells induce cancer/testis antigen-specific immune responses. *Cancer Immunol Immunother.* 2012 Mar 15. [Epub ahead of print]
101. Nishikawa H, Maeda Y, Ishida T, Gnjatic S, Sato E, Mori F, Sugiyama D, Ito A, Fukumori Y, Utsunomiya A, Inagaki H, Old LJ, Ueda R, Sakaguchi S. Cancer/testis antigens are novel targets of immunotherapy for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood.* 2012, 29; 119(13):3097-104.
102. Han MH, Eom HS, Park WS, Yun T, Park S, Kim HJ, Jeon CH, Kong SY. Detection of circulating lymphoma cells in patients with non-Hodgkin lymphoma using *MAGE-A3* gene expression in peripheral blood. *Leuk Res.* 2010; 34(9):1127-31.
103. Williams, Beutler E, Hematology:, Lichman M, Stone sexta edición Mc Graw Hill 2001

104. Wintrobe's clinical haematology 12th. Lee R, Bithell T, Foerster J, Athens J, Lukenks J. 2008. 12 Edición Interamericana. Buenos Aires , Argentina.
105. Globocan 2008. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. www-dep.iarc.fr
106. Tirado y Mohar, Epidemiología de la Neoplasias Oncohematológicas. *Cancerología 2* (2007): 109-120.
107. Dirección General de Epidemiología. Compendio de registros histopatológicos de neoplasias en México. Mortalidad 2000 2004. México: Secretaría de Salud.
108. Mohar A, Frías-Mendivil M, Suchil-Bernal L, Mora-Macías T, G. de la Garza J. Epidemiología descriptiva de cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología de México. *Salud Pública Mex* 1997; 39:253-258.
109. Berrios Rueda R. Frecuencia de enfermedades onco-hematológicas en el servicio de Hematología del Hospital General de México revisión de 6 años. Tesis de postgrado. México, D.F, 2007:32-57.
110. Castellanos-Sinco, Humberto Baldemar, Ramos-Peñafiel, Christian Omar, Martínez-Murillo Carlos. Quimioterapia en linfoma no Hodgkin: 17 años de experiencia en el Hospital General de México. *Rev Med Hosp Gen Mex* 2010;73(4):213-218
111. Boletín epidemiológico, Hospital General de México, 2011. <http://www.hgm.salud.gob.mx/interior/planeacion/boletin.html>
112. Willett EV, Roman E. Epidemiology. En Marcus R, Sweetenham JW, Williams ME (eds). *Lymphoma. Pathology, Diagnosis and Treatment*. 1st ed. Cambridge University Press, 2007:3-11.
113. Holford T, Leaderer B, Boyle P, Ba Y, Xia Z, Rothman N, Zhang Y Occupational solvent exposure, genetic variation of DNA repair genes, and the risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Cancer Prev*. 2012
114. Kiesewetter B, Troch M, Müllauer L, Raderer M. Running in the family: MALT lymphoma and autoimmune disease in mother and daughter. *World J Gastrointest Oncol*. 2012; 4(2):26-9.
115. Jadali Z. *Hepat Mon*. Hepatitis C virus cryoglobulinemia and non-hodgkin lymphoma. 2012; 12(2):85-91.
116. Batra R, Medeiros BC, Zehnder JL, Warnke RA, Natkunam Y. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. Aggressive EBV-associated Lymphoproliferative Disorder: A Prodrome to Diffuse Large B-cell Lymphoma. . 2012; 20(3):325-30.
117. Wang F, Yuan S, Teng KY, Garcia-Prieto C, Luo HY, Zeng MS, Rao HL, Xia Y, Jiang WQ, Huang HQ, Xia ZJ, Sun XF, Xu RH High hepatitis B virus infection in B-cell lymphoma tissue and its potential clinical relevance.. *Eur J Cancer Prev*. 2012; 21(3):261-7.

118. Magrath I. Epidemiology: clues to the pathogenesis of Burkitt lymphoma. *Br J Haematol.* 2012 ;156(6):744-56
119. Jaffe ES, Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood.* 2011; 117 (19):5019-32.
120. Harris NL, Stein H, Coupland SE, Hummel M, Favera RD, Pasqualucci L, Chan WC. New approaches to lymphoma diagnosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2001:194-220.
121. Figueroa, F, Silva Moreno, Rivas Vera S, Sobrerilla P. Linfomas No Hodgkin. Estado actual. *Gac Méd Méx* 2003: 139 (2), 139-147
122. Lee Harris, Elaine S. Jaffe, Harald Stein, Peter M. Banks, John K.C. Chan, Michael L. Cleary, A Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms: A Proposal From the International Lymphoma Study Group. *Blood*, Vol 84, No 5 (September I), 1994p:p 1361-1392
123. Síndromes Hematológicos, su relación con las enfermedades que lo producen. Gutiérrez Romero M. 2006. Editorial Prado
124. Hematología Clínica, 2006. Sans-Sabrafen Jordi, C. Besses Raebel, J. L. Vives Corrons 5ta Edición
125. Good, David J, Gascoyne Randy D. Classification of Non-Hodgkin's Lymphoma, *Hematology Oncology Clinics of North America* 2008; 22 (5),781-805.
126. Hartmann, Ma, German Ott, MD, Andreas Rosenwald, Molecular Biology and Genetics of Lymphomas. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 2008; 22 (5) , 807-823.
127. Madrigal Velázquez M, Avilés Miranda Agustín, Mayani Héctor. El linfoma difuso de células grandes: Nuevos enfoques moleculares. *Revista de Investigación Clínica* 2004; 56 (4), 483-494.
128. Guía práctica clínica IMSS 174-09 linfoma no Hodgkin en el adulto, <http://www.cvsp.cucs.udg.mx/guias>
129. Hermans, A.D.G. Krol, K. van Groningen, Ph.M. Kluin, J.C. Kluin-Nelemans, M.H.H. Kramer, E.M. Noordijk International Prognostic Index for Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma Is Valid for All Malignancy Grades. *Blood*, 1995; 86(4) pp 1460-1463.
130. Brenner Hermann, Gondos Adam, Pulte Dianne. Ongoing improvement in long-term survival of patients with Hodgkin disease at all ages and recent catch-up of older patients. *Blood*, 2008; 111: 2977-2983
131. Coiffier B, LePAGE E, Briere J. et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002;346:235-42.

132. Maloney DG. Concepts in radiotherapy and immunotherapy: anti-CD20 mechanisms of action on targets. *Semin Oncol.* 2005; 32 (1):S19-26.
133. Kim YM, Lee YH, Shin SH, Kim EH, Choi YW, Lee KM, Park JH, Lee YU, Seel DJ, Kim MC. Expression of *MAGE-1*, *-2*, and *-3* genes in gastric carcinomas and cancer cell lines derived from Korean patients. *J Korean Med Sci.* 2001; 16(1):62-68.
134. Luo G, Huang S, Xie X, Stockert E, Chen YT, Kubuschok B, Pfreundschuh M. Expression of cancer-testis genes in human hepatocellular carcinomas. *Cancer Immun.* 2002. 2:11.
135. Fujie T, Mori M, Ueo H, Sugimachi K, Akiyoshi T. Expression of *MAGE* and *BAGE* genes in Japanese breast cancers. *Ann Oncol* 1999. 8: 369-372.
136. Nishimura S, Fujista M, Terata N, Tani T, Kodoma M; Itoh K. Expression of *MAGE* genes in colorectal carcinomas. *Nihon Rissho Meneki* 1997; (20): 95-101.
137. Lee KD, Chang HK, Jo YK, Kim BS, Lee BH, Lee YW, Lee HK, Huh MH, Min YG, Spagnoli GC, Yu TH. Expression of the *MAGE 3* gene product in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Anticancer Res.* 1999 Nov-Dec;19(6B):5037-42.
138. Sudo T, Kuramoto T, Komiya S, Inoue A, Itoh K. Expression of *MAGE* genes in osteosarcoma. *J Orthop Res* 1997; (15): 128-132.
139. Kuramoto T. Detection of *MAGE-1* antigen in brain tumor. *Kurume J Med* 1997; 44: 43-51.
140. Chang HK, Park J, Kim W, Kim K, Lee M, Park U, Choi B. The expression of *MAGE* and *GAGE* genes in uterine cervical carcinoma of Korea by RT-PCR with common primers. *Gynecol Oncol.* 2005;97(2):342-7.
141. Shichijo S, Sagawa K, Brasseur F, Boon T, Itoh K. *MAGE-1* gene is expressed in T-cell leukemia. *Int J of Cancer* 1996, 65, 709.
142. Chambost H, Brasseur F, Coulie P, et al. A tumor associated antigen expression in human haematological malignances. *J Haematology* 1993, 84, 424.
143. Adams S, Sahota, A Mijovic, B Czepulkowski, RA Padua, GJ Mufti, and BA Guinn. Frequent expression of *HAGE* in presentation chronic myeloid leukaemias. *Leukemia* (2002) 16, 2238–2242
144. Martínez A, Olarte M, A Mergold, E. Rozen, J. Collazo, O Amansio- Chassin, R.M. Ordóñez, J.J. Montesinos, H. Mayani, DK. McCurdy, P. Ostrosky-Wegman, E. Garrido- Guerrero, E.I. Miranda. mRNA expression of *MAGE- A3* gene in leukemia cells. *Leukemia Research* 2007 (31):33-37
145. Inaoka RJ, Jungbluth AA, Baiocchi OC, Assis MC, Hanson NC, Frosina D, Tassello J, Bortoluzzo AB, Alves AC, Colleoni GW. An overview of cancer/testis antigens expression in classical Hodgkin's lymphoma (cHL) identifies *MAGE-A* family and *MAGE-C1* as the most frequently expressed antigens in a set of Brazilian cHL patients. *BMC Cancer.* 2011;11(1):416.

146. Chambost H, Van Baren N, Brasseur F, Godelaine D, Xerri L, Landi S, Theate I, Plumas J, Spagnoli G, Michel G, Coulie P, Olive D.. Expression of gene *MAGE-A4* in Reed-Sternberg Cells. *Blood*. 2000; (95), 3530-3533.
147. Xie X, Wacker HH, Huang S, Regitz E, Preuss KD, Romeike B, Parwaresch R, Tiemann M, Pfreundschuh M. Differential expression of cancer testis genes in histological subtypes of non-Hodgkin's lymphomas. *Clin Cancer Res*. 2003;9(1):167-73.
148. Eichmuller stefan , dirk usener, daniela thiel and dirk schadendorf. Serological detection of cutaneous t-celllymphoma-associated antigens. *PNAS*, 2001:98.,629–634.
149. Eichmüller S, Usener D, Thiel D, Schadendorf D. Tumor-specific antigens in cutaneous T-cell lymphoma: expression and sero-reactivity. *Int J Cancer*. 2003 Apr 20;104(4):482-7.
150. Durnick David K., Law David K., Maurer, Matthew J, Natkunam Yasodha, Kurtin Paul J, McPhail Ellen Expression of LMO2 Is Associated With t(14;18)/IGH-BCL2 Fusion but Not BCL6 Translocations in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Am J Clin Pathol* 2010;134:278-281
151. Sukjoong Oh1, Dong Hoe Koo, Cheolwon Suh, Shin Kim, Bong Hee Park, Joon Kang, and Jooryung Huh. Prognostic Value of Immunohistochemical Biomarkers at Different Cut-off Values in Patients with Diffuse Large B-cell Lymphoma Treated with CHOP Chemotherapy,. *J Korean Med Sci* 2011; 26: 1556-1562
152. Bari, L. Marcheselli, S. Sacchi, R. Marcheselli, S. Pozzi, P. Ferri, E. Balleari, P. Musto, S. Neri, M. A. Aloe Spiriti Cox . Prognostic models for diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era: a never-ending story. *Annals of Oncology* 21: 1486–1491, 2010.
153. Flowers Christopher R; Sinha Rajni, MD, Vose Julie M., Improving Outcomes for Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *CA CANCER J CLIN* 2010; 60:393–408
154. Nicholaou T, Ebert L, Davis ID, Robson N, Klein O, Maraskovsky E, Chen W, Cebon J. Directions in the immune targeting of cancer: lessons learned from the cancer-testis Ag NY-ESO1. *Immunol Cell Biol*. 2006;84 (3):303-17.
155. Nakada T, Noguchi Y, Satoh S et al. NY-ESO1 mRNA expression and immunogenicity in advanced prostate cancer. *Cancer Immun*. 2003; 3: 10–21.
156. Bujas T, Marusic Z, Peric Balja M, Mijic A, Kruslin B, Tomas D. *MAGE-A3/4* and NY-ESO1 antigens expression in metastatic esophageal squamous cell carcinoma. *Eur J Histochem*. 2011, 21;55(1)
157. Wang Y, Wu XJ, Zhao AL et al. Cancer/testis antigen expression and autologous humoral immunity to NY-ESO1 in gastric cancer. *Cancer Immun*. 2004; 4: 11–17.
158. Dyrskjot L, Zieger K, Kissow Lildal T, Reinert T, Gruselle O, Coche T, Borre M, Orntoft TF. Expression of *MAGE-A3*, NY-ESO1, LAGE-1 and PRAME in urothelial carcinoma. *Br J Cancer*. 2012 May 17. doi: 10.1038/bjc.2012.215.

159. Lim SH, Austin S, Owen-Jones E, Robinson L. Expression of testicular genes in haematological malignancies. *Br J Cancer*. 1999;81 (7):1162-4.
160. Niemeyer P, Tureci O, Eberle T, Graf N, Pfreundschuh M, Sahin U. Expression of serologically identified tumor antigens in acute leukemias. *Leuk. Res*. 2003; 27: 655–60.
161. Nishikawa H, Maeda Y, Ishida T, Gnjatic S, Sato E, Mori F, Sugiyama D, Ito A, Fukumori Y, Utsunomiya A, Inagaki H, Old LJ, Ueda R, Sakaguchi S. Cancer/testis antigens are novel targets of immunotherapy for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*. 2012, 29;119(13):3097-104.
162. Kurashige T, Noguchi Y, Saika T, Ono T, Nagata Y, Jungbluth A, Ritter G, Chen YT, Stockert E, Tsushima T, Kumon H, Old LJ, Nakayama E. NY-ESO1 expression and immunogenicity associated with transitional cell carcinoma: correlation with tumor grade. *Cancer Res*. 2001; 61(12):4671-4.
163. Vaughan HA, Svobodova S, Macgregor D et al. Immunohistochemical and molecular analysis of human melanomas for expression of the human cancer-testis antigens NY-ESO1 and LAGE-1. *Clin. Cancer Res*. 2004; 10: 8396–404
164. Van Rhee F, Szmania SM, Zhan F et al. NY-ESO1 is highly expressed in poor-prognosis multiple myeloma and induces spontaneous humoral and cellular immune responses. *Blood* 2005; 105: 3939–44.
165. Gure AO, Chua R, Williamson B et al. Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res*. 2005; 11: 8055–62.
166. Konishi J, Toyooka S, Aoe M et al. The relationship between NY-ESO1 mRNA expression and clinicopathological features in non-small cell lung cancer. *Oncol. Rep*. 2004; 11: 1063–7.
167. Li M, Yuan YH, Han Y, Liu YX, Yan L, Wang Y, Gu J. Expression profile of cancer-testis genes in 121 human colorectal cancer tissue and adjacent normal tissue. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1809-1814.
168. Yakirevich E, Sabo E, Lavie O, Mazareb S, Spagnoli GC, Resnick MB. Expression of the *MAGE-A4* and NY-ESO1 cancer-testis antigens in serous ovarian neoplasms. *Clin. Cancer Res*. 2003; 9: 6453–60
169. Cho HJ, Caballero OL, Gnjatic S, Andrade VC, Colleoni GW, Vettore AL, Outtz HH, Fortunato S, Altorki N, Ferrera CA, Chua R, Jungbluth AA, Chen YT, Old LJ, Simpson AJ Physical interaction of two cancer-testis antigens, *MAGE-C1* (CT7) and NY-ESO1 (CT6). *Cancer Immun*. 2006 (1);6:12.
170. Chambost H, van Baren N, Brasseur F, Olive D. *MAGE-A* genes are not expressed in human leukemias. *Leukemia*. 2001;15(11):1769-71.

12. Anexo

Secuencias de primers

MAGE A3-F TGGAGGACCAGAGGCCCCC

MAGE A3-R GGACGATTATCAGGAGGCCTGC

MAGE A4-F GCGAGCTGCTGTCTGAC

MAGE A4-R AAGGACTCTGCGTCAGGC

MAGE C1-F GACGAGGATCGTTCAGGTCAGC

MAGE C1-R ACATCCTCACCCTCAGGAGGG

MAGE B2-F CTGACTCCGCTTTGAGGC

MAGE B2-R GCACCCCAGAAACAGAAGAGG

GAGE2-F TATGCGGCCCGAGCAGTT

GAGE2- R GGAGCCGTAGTCCTCGTAG

BAGE4-F TGGCTCGTCTCACTCTGG

BAGE4-R AGGACAACCTCGACGACAGA

LAGE 1-F CTGCGCAGGATGGAAGGTGCCCC

LAGE 1-R GCGCCTCTGCCCTGAGGGAGC

NY-ESO1-F CCCACCGCCTCCCGTG

NY-ESO1-R CTGGCCACTCGTGCTGGGA

β2m-F CCTCCATGATGCTGCTTACATGTC**

β2m-R ATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAGCT**

Andrade VC y cols. Cancer Immunity 2008, (1); 8:2

***Martínez A y cols. Leukemia Research 2007 (31):33-37*

