



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA

CURSO DE ESPECIALIZACIÓN EN UROLOGÍA

HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO DR. EDUARDO LICEAGA

TÍTULO

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

TESIS DE POSGRADO PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALIDAD EN:

UROLOGÍA

PRESENTA

DR. ALEJANDRO CUMMING MARTINEZ BAEZ

ASESOR DE TESIS:

DR. HUGO ARTURO MANZANILLA GARCIA

MEDICO URÓLOGO ADSCRITO AL SERVICIO DE UROLOGÍA HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO

DR. ADOLFO MARTÍNEZ TOVAR

COORDINADOR DE INVESTIGACION DEL SERVICIO DE HEMATOLOGIA

CO-ASESOR DE TESIS:

DR. LEOPOLDO MATEO GARDUÑO ARTEAGA

JEFE DE ENSEÑANZA Y DEL SERVICIO DE UROLOGÍA HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO

CIUDAD DE MÉXICO 9 DE NOVIEMBRE DEL 2016



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.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORÍA

A Dios por permitirme vivir esta vida a lado suyo y siendo un instrumento para la sanación de mis pacientes, por haberme abierto las puertas en el camino que me ha impuesto.

A mi esposa Andrea que ha sido una inspiración en este camino de la Medicina y la Urología. Por haber confiado y apoyado nuestro plan de vida.

A mi familia por el apoyo incondicional a lo largo de este camino dándome cariño, consejos, tranquilidad y confianza.

A mis amigos por la confianza que me han tenido en todos estos años.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Biología Molecular U-204 del Hospital General de México O.D., Secretaria de Salud, bajo la dirección del Dr. Adolfo Martínez Tovar.

Este proyecto fue apoyado por la dirección de investigación del Hospital General de México bajo el número de registro: DI/08/103/4/17

TÍTULO:

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

ÍNDICE

Título	3
Marco Teórico	5
Planteamiento del Problema.....	18
Justificación.....	18
Hipótesis.....	18
Objetivos.....	18
Metodología.....	19
Análisis Estadístico.....	19
Resultados.....	24
Discusión.....	38
Conclusión.....	39
Bibliografía.....	40

MARCO TEÓRICO

EMBRIOLOGÍA

EMBRIOLOGÍA Y DESARROLLO GONADAL

El sexo genético o cromosómico es el que determina que la gónada indiferenciada se convierta en ovario en la mujer y en testículo en el varón. El desarrollo de los órganos sexuales durante la época embrionaria se produce en dos etapas: la etapa indiferenciada, la cual es idéntica en ambos sexos y la diferenciada, que es distinta según el sexo cromosómico. La aparición del testículo depende del cromosoma "Y", que induce la diferenciación de la gónada a testículo, si este está ausente se diferencia a ovario.

El sistema genital indiferenciado contiene las estructuras necesarias para desarrollar cualquier sexo. Las gónadas son sexualmente indiferenciadas y tienen componentes masculinos y femeninos. La diferenciación hacia un sexo concreto conlleva el predominio gradual de un componente y la desaparición del otro. Las principales estructuras de este sistema genital indiferenciado son los conductos de Wolff, de Müller y el seno urogenital. La gónada indiferenciada aparece en la quinta a sexta semana de gestación. Una vez determinada la presencia de ovario o testículo serán estos los que condicionen el posterior desarrollo de las características sexuales del individuo. La transformación del sistema genital diferenciado se realiza durante la séptima semana de gestación, la gónada comienza a asumir características de ovario o testículo, según el feto posee cromosoma XX (sexo femenino) o XY (sexo masculino).

El parénquima testicular se encuentra formado por túbulos seminíferos, los cuales tienen células de sostén llamadas células de Sertoli. Las células de Sertoli son células que derivan del epitelio germinal de la superficie de la glándula. Son células germinales madre, primitivas, de división lenta. Estas células mantienen contacto físico con los espermatozoides. Se encargan de mantener la homeostasis hormonal sobre todo de la hormona folículo estimulante. Las células de Sertoli proporcionan una barrera hematotesticular. Las células de Leydig se derivan de las células intersticiales. No solo la diferenciación testicular se lleva a cabo de manera temprana, si no que la secreción hormonal es imprescindible para la diferenciación de los conductos genitales y los genitales externos.

No es hasta la semana 14-18 la cual adquiere luz y se diferencian en túbulos seminíferos, túbulos rectos y rete de testis. El desarrollo del gubernáculo es efecto de la actividad hormonal. Esta estructura se encuentra antes del desarrollo de la pared abdominal y promueve el desarrollo del canal inguinal. El gubernáculo sostiene el testículo en el canal inguinal durante el crecimiento rápido de la columna lumbar, acción que promueve el ascenso del riñón. Sin el gubernáculo, el testículo podría alojarse en el espacio retroperitoneal. Por esta razón la posición pélvica del testículo no es por descenso del retroperitoneo sino por fijación del mismo mientras ascienden los riñones.

Bajo la influencia de la testosterona los conductos de Wolff desarrollarán el epidídimo, el conducto deferente, los conductos eyaculadores y las vesículas seminales. A través de la acción de la 5 alfa reductasa, la dehidrotestosterona producida localmente por las células mesenquimatosas del seno urogenital se diferenciarán en la próstata y las glándulas bulbouretrales. Los elementos Mullerianos

desaparecen como resultado de la acción de la sustancia inhibitoria Mulleriana. Quedan remanentes de estos conductos en los genitales masculinos, como es el apéndice testicular y el verum montanum en la uretra prostática.

El descenso testicular es la última fase de una secuencia genética y hormonal. El descenso testicular es necesario para el desarrollo normal de la espermatogénesis. Se requiere de 2-3 C más bajo que la temperatura corporal para una espermatogénesis adecuada. El descenso testicular se divide en tres fases: Migración transabdominal al orificio inguinal interno, desarrollo del proceso vaginal y del canal inguinal y el descenso transinguinal al escroto.

Conforme se desarrolla el escroto, el gubernáculo se mantiene una estructura intraperitoneal. El peritoneo se invagina para formar el proceso vaginal, migra con los elementos de la pared abdominal anterior, con esto el testículo se cubre de aquellas capas al paso por el anillo inguinal. El gubernáculo se adhiere a la base del escroto y a la base del epidídimo. Conforme el gubernáculo degenera, el epidídimo desciende y genera un espacio para el testículo dentro del escroto.

El epidídimo y el testículo se encuentran sostenidos por el gubernáculo en el anillo inguinal interno hasta 2 meses previos al parto. Bajo estimulación hormonal el gubernáculo y el proceso vaginal se extienden hasta el escroto. Posteriormente este se contrae y degenera lo que hace la migración del epidídimo hacia el escroto, al mismo tiempo el proceso vaginal se oblitera.

Un defecto en este proceso de migración es una de las explicaciones para el testículo no descendido o criptorquidia. Alteraciones al epidídimo se relaciona con testículo no descendido hasta el 36%. (1)

Criptorquidia se refiere a la ausencia del testículo en el escroto. La criptorquidia aislada es el defecto más frecuente en los genitales masculinos. El 33% de los neonatos pretérminos nacen con criptorquidia, al nacimiento a término el 2-4% presentan criptorquidia y el 1% de los varones de 1 año de edad nacidos a término. Se desconoce la causa exacta de este defecto. Se cree que la hormona INSL3 (Leydig Insulin- like hormone) es la causante de la masculinización del gubernáculo, con esto se posiciona el testículo en al anillo inguinal interno en la semana 12 de gestación. Del 3 al 7 mes de gestación el testículo se encuentra estacionario. La elongación del peritoneo llamado proceso vaginal junto con el gubernáculo crea un espacio del canal inguinal hacia el escroto para el descenso testicular. La última fase de descenso testicular se lleva a cabo muy rápido entre las semanas 24-35 de gestación. Durante este tiempo la testosterona contrae el gubernáculo y oblitera el proceso vaginal. Aproximadamente 2/3 partes de neonatos con criptorquidia tienen descenso espontáneo dentro de los primeros 6 meses de vida.

Existen diferentes factores hormonales implicados en el descenso testicular. Los andrógenos y el receptor de andrógenos tienen un papel fundamental en este proceso. La hormona INSL3 es producida por el testículo fetal junto con su receptor la cual es de suma importancia en la fase transabdominal. Existen otras hormonas como la sustancia inhibitoria anti-mulleriana, péptido relacionado al gen de la calcitonina y el factor de crecimiento epidérmico la cual todos han sido implicados en el descenso testicular.

Existe un aumento de 3.7- 7.5 veces más la probabilidad de padecer cáncer de testículo en un testículo no descendido. Aproximadamente el 10% de los tumores de testículo se desarrollan en personas con antecedente de criptorquidia. La estirpe histológica más frecuente en testículo no

descendido sin haber recibido manejo es seminoma, la estirpe más frecuente en testículos manejados con orquidopexia es carcinoma embrionario. (2)

CÁNCER DE TESTÍCULO

El cáncer de testículo pertenece a una entidad clínica muy diversa, 95% de ellos pertenecen a tumores de células germinales. El cáncer de testículo representa el 1 al 2% de las neoplasias en el hombre en Estados Unidos, con una incidencia de 5 casos por cada 100,000 habitantes. En Estados Unidos el cáncer de testículo es la neoplasia más frecuente entre hombres de 20 a 40 años de edad y la segunda más frecuente después de leucemia en hombres de 15-19 años de edad. A partir de la terapia a base de cisplatino se aumentó la sobrevida libre de enfermedad del 80-90% incluso con enfermedad metastásica. (3)

En México, el cáncer se ha convertido en un problema de salud pública, con 110 mil casos nuevos registrados por año. Los tumores malignos ocupan el tercer lugar en la lista de las principales causas de muerte en el país; en el año 2006 fallecieron 63 888 personas por esta causa, representando 12.9% del total de las defunciones registradas en ese año. En el grupo de varones de 25 a 34 años, la leucemia (18.7%) y el tumor maligno de testículo (13.3%) ocasionan 32 de cada 100 decesos. (4)

Se han identificado varios factores de riesgo para el desarrollo de esta neoplasia, como la criptorquidia, historia familiar de cáncer de testículo, antecedente de cáncer de testículo, disgenesia testicular y Síndrome de Klinefelter.

EPIDEMIOLOGÍA Y ETIOLOGIA

La incidencia de cáncer testicular va a variar dependiendo de la zona geográfica. La mayor incidencia se encuentra en los países de Escandinavia, Alemania, Suiza y Nueva Zelanda. Incidencia intermedia de esta neoplasia es en Estados Unidos e Inglaterra. Incidencia más baja en África y Asia. En Estados Unidos la incidencia en hombres no hispanos es cinco veces mayor que la de afroamericanos.

La incidencia de cáncer de testículo parece estar aumentando a nivel mundial. Esto probablemente se deba a la prevención y a los métodos diagnósticos. Solo 10-30% de los hombres van a presentarse con enfermedad metastásica al diagnóstico. Actualmente el seminoma localizado es la variante más frecuente a la presentación, representando aproximadamente 50% de los hombres con tumores de células germinales. (5)

Existen cuatro factores de riesgo bien establecidos: criptorquidia, historia familiar de cáncer de testículo, historia personal de cáncer de testículo y neoplasia germinal intratubular. Hombres con criptorquidia tienen cuatro a seis veces más probabilidad de padecer cáncer de testículo, pero esto disminuye si se practica orquidopexia antes de la pubertad. (6) El testículo contralateral descendido tiene ligero incremento de padecer cáncer de testículo, con un riesgo relativo de 1.74. (7) Hombres con cáncer testicular tienen 12 veces más probabilidad de padecer cáncer de células germinales en el testículo contralateral, esto se traduce en 2% de incidencia en 15 años. La neoplasia germinal intratubular también llamada carcinoma in situ se encuentra en el 80-90% de los casos de tumores germinales invasores en el parénquima adyacente. (8)

La carcinogénesis de los tumores germinales de testículo no es del todo comprendido. Se desarrollan de una lesión premaligna llamada neoplasia germinal intratubular o carcinoma in situ. Esta deriva de la falla en la diferenciación a espermatogonia. Se han identificado polimorfismos específicos relacionados a cáncer de testículo, como el ligando c- KIT. Las células primitivas dependen de su producción proteica para sobrevivir, este gen se encuentra en el cromosoma 12. Se ha visto que aproximadamente el 70% de los tumores germinales tiene un isocromosoma 12p. (9)

Una de las características más importantes en los tumores germinales es la sensibilidad a la quimioterapia a base de cisplatino. La cual dictamina la cura a la mayoría de los pacientes incluso con enfermedad avanzada. Se cree que esta respuesta es debida a la apoptosis dada por daño al ADN. La proteína p53 es la encargada de regular el ciclo celular. Esta se encuentra aumentada en los tumores germinales, por otro lado la proteína BCL2, una proteína antiapoptótica se encuentra disminuida en los tumores germinales. Otros genes también se han visto implicados en el proceso de apoptosis, como el FASLG, TNFSF10, BAX. (10)

CLASIFICACIÓN ANATOMOPATOLÓGICA

Clasificación Histológica de los tumores testiculares (11)

1. Tumores de Células Germinales
 - Neoplasia Intratubular de células germinales
 - Seminoma
 - Seminoma Espermatocítico
 - Carcinoma Embrionario
 - Tumor de Saco Vitelino
 - Coriocarcinoma
 - Teratoma Maduro e Inmaduro
 - Tumor Germinal Mixto (Tumores con más de un estirpe histológica)
2. Tumores de Cordones Sexuales
 - Tumor de Células de Leydig
 - Tumor Maligno de Células de Leydig
 - Tumor de Células de Sertoli
 - Variante rica en lípidos
 - Esclerosante
 - Células grandes calcificadas
 - Tumor Maligno de Células de Sertoli
 - Tumor de Células de la Granulosa
 - Tipo Adulto
 - Tipo Juvenil
 - Tumores del Tecoma/Fibroma
 - Tumores que contienen células germinales y de cordones sexuales
 - Gonadoblastoma
3. Tumores Misceláneos de Testículo
 - Tumor Carcinoide

- Tumores de epitelio Ovarico
 - Nefroblastoma
 - Paraganglioma
4. Tumores Hematopoyéticos
 5. Tumores de Estructuras Paratesticulares
 - Tumor Adenomatoide
 - Mesotelioma Benigno y Maligno
 - Adenocarcinoma del Epidídimo
 - Cistadenoma Papilar del Epidídimo
 - Tumor Neuroectodermico Melanocítico

DIAGNÓSTICO

Los tumores testiculares se presentan habitualmente en la tercera o cuarta década de la vida. La presentación más frecuente es una masa testicular indolora. Dolor testicular agudo es menos frecuente, se debe a crecimiento intratesticular rápido. Las metástasis regionales o a distancia se encuentran presente en aproximadamente dos tercios de los tumores germinales no seminomatosos y el 15% de los tumores germinales seminomatosos. Masas retroperitoneales pueden causar masa palpable, dolor abdominal o dolor en fosa renal secundario a uropatía obstructiva. También se pueden presentar con dolor lumbar secundario a involucro del músculo psoas o a las raíces nerviosas. Las metástasis pulmonares se pueden presentar como disnea, tos, dolor precordial o hemoptisis.

Se deben examinar ambos testículos, notando su tamaño, consistencia y la palpación de las estructuras anexas. Es frecuente el hidrocele acompañando al tumor testicular, de tal manera si no se logra explorar se debe realizar ultrasonido testicular. Se debe explorar el abdomen en busca de masas palpables también ginecomastia y auscultación de campos pulmonares en busca de enfermedad torácica.

El diagnóstico diferencial se puede hacer con epididimitis, orquitis, torsión testicular, hematoma o neoplasia paratesticular. Una masa intratesticular debe ser considerada tumoral hasta no demostrar lo contrario y debe ser evaluada con ultrasonido escrotal.

En hombres cuyo se presentan con una masas testicular, hidrocele o sintomatología escrotal se debe realizar un ultrasonido escrotal. Es un estudio complementario a la exploración física debido a su accesibilidad, costo beneficio y no invasivo. Su sensibilidad es de prácticamente 100%. (12)

MARCADORES TUMORALES

El cáncer de testículo es de las pocas neoplasias asociadas a marcadores tumorales séricos. Entre ellos se encuentran la alfa feto proteína, hormona gonadotropina coriónica y la deshidrogenasa láctica. La medición de ellos es imprescindible para el diagnóstico, pronóstico, tratamiento y monitoreo. Se deben obtener previos al procedimiento quirúrgico y posterior a ello para evaluar respuesta al manejo. Al momento del diagnóstico la alfa feto proteína se encuentra elevada del 50-70% en los pacientes con tumores localizados y hasta el 80% cuando se encuentran en fases avanzadas.

Alfa Feto Proteína

La alfa feto proteína (AFP) es una glucoproteína de 70,000 Kd que se demostró por primera vez en el plasma fetal normal por Bergstrand en 1954. Generalmente se produce en el hígado, saco vitelino y el tracto gastrointestinal del feto. La concentración más elevada se encuentra entre la 12 y la 14 semana de gestación, tras lo que disminuye, de forma que 1 año después del nacimiento solo se encuentra en concentraciones bajas.

En los tumores testiculares, la AFP puede producirse por el carcinoma embrionario puro, los tumores del saco vitelino o por tumores combinados. Nunca aparece en el coriocarcinoma puro o en el seminoma puro. La semivida de este marcador es de 5-7 días, por lo que puede utilizarse para apreciar la respuesta a los tratamientos. También se puede elevar en pacientes con carcinoma hepatocelular, cáncer de estómago, páncreas y pulmón. Los valores normales son de 0-10ng/ml. (4)

Hormona Gonadotropina Coriónica

La hormona gonadotropina coriónica (HCG) es una glucoproteína de 38,000 kD constituida por dos cadenas: alfa y beta. Se producen en condiciones normales por tejido trofoblástico. La HCG se produce por la placenta en condiciones normales. Zonk, en 1930, fue el primero en demostrar que la HCG era detectable en el plasma de pacientes con un tumor de células germinales. Demostrándose que las células del sincitiotrofoblasto son las productoras de esta hormona. La vida media es de 24-36 horas. Los niveles de la hormona gonadotropina coriónica se encuentran elevados del 20-40% en etapas clínicas tempranas en tumores no seminomatosos y hasta el 60% en tumores en etapas clínicas avanzadas. Aproximadamente el 15% de seminoma pueden presentar elevación de esta hormona. Esta presente en pacientes con coriocarcinoma y en el 60% de los pacientes con carcinoma embrionario. Los valores normales son de < 5mIU/mL. Un aumento de la HCG también puede encontrarse en otros tipos de cáncer (hígado, páncreas, estómago, pulmón, mama). (4)

Deshidrogenasa Láctica

Las deshidrogenasas láctica (LDH) son unas enzimas celulares ubicuas con peso molecular de 134.000 D, con una concentración especialmente elevada en el músculo liso, cardíaco y esquelético, en el hígado, el riñón y el cerebro. Se ha descrito que la elevación de la concentración plasmática de LDH o de una de sus isoenzimas (LDH I-IV) es un elemento destacado en el tratamiento de los tumores germinales. Se trata de un marcador de volumen tumoral que aparece elevado en el 70% de los pacientes con un seminoma.

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

La utilidad diagnóstica de los marcadores orientan sobre la naturaleza histológica del tumor, como la AFP hacia un tumor no seminomatoso, una normalización de la b-HCG tras la orquiectomía radical es un elemento indicativo de seminoma puro. La evaluación de la respuesta terapéutica después de

un tratamiento eficaz, los marcadores deben ser negativos, algo que debe mantenerse a lo largo de la vigilancia.

La velocidad de normalización de la cifra del marcador tras el tratamiento es considerado como factor pronóstico ya que dicha velocidad está en relación directa con la carga tumoral previa y con la viabilidad del tumor. La persistencia de un marcador elevado tras el tratamiento implica respuesta incompleta. De la misma manera la recidiva bioquímica o elevación de los marcadores puede preceder a la recidiva clínica o radiológica con lo que se puede instaurar el tratamiento antes de que la recidiva sea sintomática, cuando la carga tumoral es mínima.

ANTÍGENOS TESTICULARES DE CÁNCER (ATC)

Los antígenos testiculares de cáncer son moléculas específicas de tumores donde se ha demostrado su expresión en diferentes neoplasias. Por esta razón encontrarlos en algún otro tejido incluyendo hematopoyético podría ser indicativo de neoplasia.

Los antígenos testiculares de cáncer son un grupo de proteínas que están expresadas de forma normal en el tejido testicular, placenta y ovario. Son una amplia familia de antígenos asociados a la expresión de tumores de diversos orígenes histológicos. Los ATC poseen un patrón de expresión tumoral e inmunogenicidad, se encuentran también en algunos tumores sólidos, se han considerado antígenos estrictamente específicos de tumor y su principal ventaja es que son reconocidos por los linfocitos T CD8, los cuales desencadenan una respuesta inmune contra ellos. (23)

El término ATC fue acuñado por Old y Chen en 1997, hasta ahora 70 familias con más de 140 miembros de ATC han sido identificados. Los ATC pueden ser divididos en aquellos que son codificados en el cromosoma X, los genes X-ATC y los que no son codificados por el cromosoma X. Algunos de los genes que pertenecen a esta familia del cromosoma X son: SSX, GAGE, PAGE, XAGE de la región Xp11 y la región Xq24-q28 que alberga la más alta densidad de ATC incluyendo MAGE-A, MAGE-C y NY-ESO-1. Los genes que no pertenecen al cromosoma X están distribuidos en el genoma y son en su mayoría genes de copia única. (23)

Los antígenos asociados a melanoma (MAGE) fueron inicialmente identificados en el melanoma. Los genes de la familia MAGE se encontraron en una gran variedad de tumores a pesar de su expresión estaba limitada a células germinales de testículo, ovario y placenta. Los genes MAGE- A, B y C fueron los primeros que se describieron, están codificados en el cromosoma X. Las funciones de estos genes no están del todo esclarecidas pero se cree que tienen una relación con los ciclos de proliferación y apoptosis de las células tumorales. (23)

Otros ATC de gran importancia son los GAGE, esta familia se ubica en el cromosoma 11, se le ha encontrado en una gran variedad de tumores, las proteínas codificadas son reconocidas por los linfocitos CD4 y CD8, por esta razón han sido un blanco importante para terapia dirigida.

La frecuencia de expresión del gen MAGE en melanoma es del 73%, en cáncer de esófago el 47%, de cabeza y cuello el 49% y de vejiga el 36%. En cuanto al cáncer testicular se demostró que el ATC MAGE- A4 y PRAME se encuentra presente en el seminoma y no en el carcinoma embrionario. En estos se encontró en marcador CK18 y CD30. (24)

Se ha demostrado recientemente que el ATC MAGE-A inhibe la función de p53 al bloquear la interacción de este con la cromatina. En varios tipos de cáncer como el mieloma múltiple, hepatocarcinoma, mama, colorectal, vesical y otros se relaciona con mal pronóstico y progresión de la enfermedad. En el cáncer de testículo se ha estudiado poco, se ha estudiado la familia MAGE, el A-1, A-2, A-3 y A-4. Donde se vio que en el 68-82% de seminoma se encuentran positivos, ya sea en seminoma puro o germinal mixto con componente de seminoma. (25)

Se cree que el seminoma clásico y el tumor germinal mixto provienen de la neoplasia intratubular testicular y que el seminoma espermatocítico se desarrolla de otra lesión. Por esta razón se presentan positivos en el 100% de los seminomas espermatocíticos y en frecuencias variables en las demás estirpes histológicas. (26)

Se ha visto que los ATC generalmente se expresan en la fase pre meiótica en las células germinales del testículo fetal y tienden a desactivarse antes que suceda la meiosis. La detección individual de los ATC es extremadamente variable, sobre todo hablando del seminoma clásico, a diferencia del seminoma espermatocítico donde el origen es de células germinales del adulto y los ATC se encuentran siempre todos positivos. (28)

El rol biológico de los ATC en células germinales y tumorales no se ha demostrado. Se cree que juegan un papel en el desarrollo del tumor. Se cree que la expresión de MAGE contribuye con la alteración en la muerte celular programada y de esta manera contribuir al desarrollo de neoplasias. (30)

Son pocos los estudios que se han desarrollado para identificar la expresión de la familia del gen SSX. Se ha visto expresión variable en los diferentes tipos de tumores con frecuencias diferentes. (31)

Regulación de la expresión de los ATC

La expresión de estos genes está regulada por factores epigenéticos (metilación y acetilación), en donde el patrón de metilación del DNA se genera durante el desarrollo embrionario. Las alteraciones en la metilación (hipometilación e hipermetilación) del DNA ocurren durante la patogénesis de los tumores puesto que se ha observado en varios carcinomas. Esto juega un papel importante en la génesis del tumor. La expresión de estos genes no solo está dada por las alteraciones del promotor pero también alteraciones en la configuración de la cromatina. Esto ha arrojado la hipótesis que la mayoría de los ATC suelen ser activados por un factor transcripcional o por un evento regulatorio como es la hipometilación (28,30)

Inmunogenicidad de los ATC

Los ATC son expresados en tumores pero no en tejido sano, excepto en tejido testicular, el cual no es accesible para el sistema inmunológico dado que no expresan HLA de clase I en la superficie de las células. Tomando esto en cuenta los ATC pueden considerarse como objetivos esenciales del tumor. Los ATC codifican distintos péptidos antigénicos que son presentados al sistema inmunológico en asociación de varios HLA de clase I o II, así teniendo respuesta humoral y celular. Las respuestas inmunes espontáneas y coordinadas han sido demostradas en contra de varios ATC.

Los ATC representan un objetivo molecular ideal para la inmunoterapia en los pacientes con cáncer. La caracterización de péptidos inmunogénicos de ATC seleccionados junto con la identificación de antígenos de HLA representan la base para iniciar terapias basadas en el uso de ATC como agentes terapéuticos. (29,30)

La expresión de los ATC en tejido testicular normal y tumoral ha sido analizado por métodos de inmunohistoquímica. Se han visto tres patrones comunes de la expresión de ATC en tejido testicular. La expresión predominante en espermatogonias, la expresión en espermatoцитos primarios y secundarios como antígenos nucleares y la expresión restringida para las células germinales maduras. La mayoría de las ATC son: NY-ESO-1, MAGE-A, GAGE, CT47 y NXF2. La mayoría de estos son antígenos nucleares. No se han estudiado todos los ATC en tejido tumoral, solo NY-ESO-1, MAGE, GAGE y CT45. (30)

Se han identificado pocos ATC la cual desencadenen respuesta humoral o celular, entre ellos MAGE, NY-ESO-1 y SSX. Se han desarrollado estudios clínicos prometedores encaminados a estos ATC con respuesta variable. La identificación del antígeno apropiado es lo más importante en el desarrollo de inmunoterapia antígeno específico. (30)

ESTADIFICACIÓN

El pronóstico de tumores de células germinales y el manejo inicial se dictamina por el estadio clínico de la enfermedad. Se basa en el reporte histopatológico, marcadores tumorales posterior a la orquiectomía radical y extensión de enfermedad metastásica.

Los tumores germinales siguen un patrón característico de diseminación. La vía de diseminación es por vía linfática desde el tumor primario hasta el retroperitoneo. Todos los pacientes con tumor germinal deben ser sometidos a una tomografía de abdomen y pelvis con medio de contraste para evaluar el estadio clínico. Aquellos ganglios los cuales midan de 5-9 mm en el territorio del drenaje linfático testicular deben ser considerados sospechosos para evitar los falsos negativos. Todos los pacientes deben ser sometidos a estudio de imagen de tórax. Es razonable realizar radiografía de tórax como estudio de imagen inicial y la tomografía torácica reservada para aquellos con elevación de marcadores tumorales posterior a orquiectomía, evidencia de extensión metastásica a la exploración física o evidencia en la tomografía abdominal.

Los marcadores posteriores a la orquiectomía son importantes para estadificar, pronóstico y selección del manejo. Por esta razón a todo paciente se deben tomar marcadores tumorales posteriores a la orquiectomía. Pacientes con elevación persistente o aumento de los marcadores representa enfermedad metastásica y estos pacientes deben recibir manejo.

TNM de Testículo



NCCN Guidelines Version 2.2016 Staging Testicular Cancer

[NCCN Guidelines Index](#)
[Testicular Cancer TOC](#)
[Discussion](#)

Table 1

American Joint Committee on Cancer (AJCC)
TNM Staging System for Testis Cancer (7th ed., 2010)

Primary Tumor (T)*

The extent of primary tumor is usually classified after radical orchiectomy, and for this reason, a pathologic stage is assigned.

- pTX Primary tumor cannot be assessed
- pT0 No evidence of primary tumor (e.g. histologic scar in testis)
- pTis Intratubular germ cell neoplasia (carcinoma in situ)
- pT1 Tumor limited to the testis and epididymis without vascular/lymphatic invasion; tumor may invade into the tunica albuginea but not the tunica vaginalis
- pT2 Tumor limited to the testis and epididymis with vascular/lymphatic invasion, or tumor extending through the tunica albuginea with involvement of the tunica vaginalis
- pT3 Tumor invades the spermatic cord with or without vascular/lymphatic invasion
- pT4 Tumor invades the scrotum with or without vascular/lymphatic invasion

*Note: Except for pTis and pT4, extent of primary tumor is classified by radical orchiectomy. TX may be used for other categories in the absence of radical orchiectomy.

Used with the permission of the American Joint Committee on Cancer (AJCC), Chicago, Illinois. The original and primary source for this information is the AJCC Cancer Staging Manual, Seventh Edition (2010) published by Springer Science+Business Media, LLC (SBM). (For complete information and data supporting the staging tables, visit www.springer.com.) Any citation or quotation of this material must be credited to the AJCC as its primary source. The inclusion of this information herein does not authorize any reuse or further distribution without the expressed, written permission of Springer SBM, on behalf of the AJCC.

Regional Lymph Nodes (N)

- Clinical**
- NX Regional lymph nodes cannot be assessed
 - N0 No regional lymph node metastasis
 - N1 Metastasis with a lymph node mass 2 cm or less in greatest dimension; or multiple lymph nodes, none more than 2 cm in greatest dimension
 - N2 Metastasis with a lymph node mass, more than 2 cm but not more than 5 cm in greatest dimension; or multiple lymph nodes, any one mass greater than 2 cm but not more than 5 cm in greatest dimension
 - N3 Metastasis with a lymph node mass more than 5 cm in greatest dimension
- Pathologic (pN)**
- pNX Regional lymph nodes cannot be assessed
 - pN0 No regional lymph node metastasis
 - pN1 Metastasis with a lymph node mass 2 cm or less in greatest dimension and less than or equal to five nodes positive, none more than 2 cm in greatest dimension
 - pN2 Metastasis with a lymph node mass more than 2 cm but not more than 5 cm in greatest dimension; or more than five nodes positive, none more than 5 cm; or evidence of extranodal extension of tumor
 - pN3 Metastasis with a lymph node mass more than 5 cm in greatest dimension

Distant Metastasis (M)

- M0 No distant metastasis
- M1 Distant metastasis
- M1a Nonregional nodal or pulmonary metastasis
- M1b Distant metastasis other than to nonregional lymph nodes and lung

[Continued on next page](#)

Tabla 1: Guía Cáncer Testicular NCCN 2016 (13)



NCCN Guidelines Version 2.2016 Staging Testicular Cancer

[NCCN Guidelines Index](#)
[Testicular Cancer TOC](#)
[Discussion](#)

Table 1 (continued)

American Joint Committee on Cancer (AJCC)
TNM Staging System for Testis Cancer (7th ed., 2010)

ANATOMIC STAGE/PROGNOSTIC GROUPS

Group	T	N	M	S (Serum Tumor Markers)
Stage 0	pTis	N0	M0	S0
Stage I	pT1-4	N0	M0	SX
Stage IA	pT1	N0	M0	S0
Stage IB	pT2	N0	M0	S0
	PT3	N0	M0	S0
	PT4	N0	M0	S0
Stage IS	Any pT/TX	N0	M0	S1-3
Stage II	Any pT/TX	N1-3	M0	SX
Stage IIA	Any pT/TX	N1	M0	S0
	Any pT/TX	N1	M0	S1
Stage IIB	Any pT/TX	N2	M0	S0
	Any pT/TX	N2	M0	S1
Stage IIC	Any pT/TX	N3	M0	S0
	Any pT/TX	N3	M0	S1
Stage III	Any pT/TX	Any N	M1	SX
Stage IIIA	Any pT/TX	Any N	M1a	S0
	Any pT/TX	Any N	M1a	S1
Stage IIIB	Any pT/TX	N1-3	M0	S2
	Any pT/TX	Any N	M1a	S2
Stage IIIC	Any pT/TX	N1-3	M0	S3
	Any pT/TX	Any N	M1a	S3
	Any pT/TX	Any N	M1b	Any S

Serum Tumor Markers (S)

- SX Marker studies not available or not performed
 - S0 Marker study levels within normal limits
 - S1 LDH < 1.5 x N* and hCG (mIU/mL) < 5,000 and AFP (ng/mL) < 1,000
 - S2 LDH 1.5-10 x N or hCG (mIU/mL) 5,000-50,000 or AFP (ng/mL) 1,000-10,000
 - S3 LDH > 10 x N or hCG (mIU/mL) > 50,000 or AFP (ng/mL) > 10,000
- *N indicates the upper limit of normal for the LDH assay.

Used with the permission of the American Joint Committee on Cancer (AJCC), Chicago, Illinois. The original and primary source for this information is the AJCC Cancer Staging Manual, Seventh Edition (2010) published by Springer Science+Business Media, LLC (SBM). (For complete information and data supporting the staging tables, visit www.springer.com.) Any citation or quotation of this material must be credited to the AJCC as its primary source. The inclusion of this information herein does not authorize any reuse or further distribution without the expressed, written permission of Springer SBM, on behalf of the AJCC.

Tabla 2: Guía Cáncer Testicular NCCN 2016: Etapas Clínicas y Marcadores Tumoraes

Clasificación Pronostica de Tumores Germinales

Se realizó un análisis internacional para valorar los factores pronósticos en pacientes con tumor germinal. Se analizaron los marcadores tumorales posterior a manejo quirúrgico, la determinación de la extensión anatómica de la enfermedad y la determinación y tamaño de los ganglios regionales.

Grupos de Riesgo de Tumores Germinales



National
Comprehensive
Cancer
Network®

NCCN Guidelines Version 2.2016 Testicular Cancer

RISK CLASSIFICATION FOR ADVANCED DISEASE (post-orchietomy)¹

Risk Status	Nonseminoma	Seminoma
Good Risk	Testicular or retroperitoneal primary tumor and No nonpulmonary visceral metastases and <u>Post-orchietomy markers</u> - all of: AFP < 1,000 ng/mL hCG < 5,000 iu/L LDH < 1.5 x upper limit of normal	Any primary site and No nonpulmonary visceral metastases and Normal AFP Any hCG Any LDH
Intermediate Risk	Testicular or retroperitoneal primary tumor and No nonpulmonary visceral metastases and <u>Post-orchietomy markers</u> - any of: AFP 1,000–10,000 ng/mL hCG 5,000–50,000 iu/L LDH 1.5–10 x upper limit of normal	Any primary site and Nonpulmonary visceral metastases and Normal AFP Any hCG Any LDH
Poor Risk	Mediastinal primary tumor or Nonpulmonary visceral metastases or <u>Post-orchietomy markers</u> - any of: AFP > 10,000 ng/mL hCG > 50,000 iu/L LDH > 10 x upper limit of normal	No patients classified as poor prognosis

Tabla 3: Grupos de Riesgo

Aproximadamente el 56%, 28% y el 16% de los pacientes con tumor germinal no seminomatoso avanzado se van a clasificar en riesgo leve, moderado y severo respectivamente, de acuerdo a la clasificación internacional del cáncer de células germinales. (14) A los 5 años de libre de progresión y sobrevida global para estos pacientes es de: 89% y 92%, 75% y 80% y 41 y 48% respectivamente.

No existe una categoría de mal pronóstico para pacientes con seminoma. El 90% son clasificados como riesgo leve y 10% como riesgo moderado. A los 5 años de libre de progresión y sobrevida global para estos pacientes es de: 82% y 86% y 67% y 72% respectivamente.

Factores de Riesgo Tumores Germinales Localizados Estadio I

El seminoma en estadio I se ha identificado que su tamaño >4cm y la invasión a la red de Haller como factores predictivos más importantes para recidiva.

En cuanto a tumores no seminomatosos en estadio I, la invasión vascular o linfática por el tumor primario es el factor predictivo más importante de metástasis ocultas. La tasa de proliferación, así como el porcentaje de carcinoma embionario. (15)

	For seminoma	For non-seminoma
Pathological (for stage I)		
Histopathological type	<ul style="list-style-type: none"> • Tumour size (> 4 cm) • Invasion of the rete testis 	<ul style="list-style-type: none"> • Vascular/lymphatic in or peri-tumoural invasion • Proliferation rate > 70% • Percentage of embryonal carcinoma > 50%

Tabla 4. Factores de Riesgo de Tumores Germinales Localizados Estadio I

TRATAMIENTO

Como parte del protocolo del paciente que va a ser sometido a un procedimiento quirúrgico por cáncer de testículo debe ser informado de la posibilidad de infertilidad. Prácticamente todos los pacientes después de manejo con quimioterapia desarrollaran azoospermia. De estos el 50% recuperara la cuenta espermática a los 2 años y 80% a los 5 años. Por esta razón pacientes que planean paternidad en el futuro al manejo oncológico se les recomienda la criopreservación.

El principio del manejo para pacientes con tumores germinales está basado en la rápida proliferación y el potencial curativo en todos los pacientes. La probabilidad de curación en la presencia de enfermedad metastásica ha llevado al manejo agresivo en cuanto a la administración de quimioterapia y de la cirugía postquimioterapia para reseca masas residuales. Los marcadores tumorales influyen el manejo de los tumores germinales, en particular los no seminomatosos. La elevación persistente de alfa feto proteína o de hormona gonadotropina coriónica nos indica de enfermedad metastásica, a estos pacientes se les inicia quimioterapia.

Al diagnóstico la proporción de pacientes en estadio clínico I, II y III es de 85%, 10% y 5% para seminoma respectivamente. Para no seminoma es de 33%, 33% y 33%. En seminoma se asocia con baja incidencia de metástasis ocultas a diferencia de no seminoma (10% vs 25%).

El seminoma es altamente sensible a la quimioterapia basada en platino y a la radioterapia a diferencia del no seminoma. Como el tumor germinal no seminomatoso son tumores mixtos y el teratoma generalmente se encuentra dentro del componente del tumor, se requiere de manejo con quimioterapia para erradicar los elementos sensibles a la quimioterapia y posteriormente cirugía de los elementos de teratoma.

La neoplasia intratubular de células germinales se diagnostica mediante biopsia al realizar protocolo de infertilidad, biopsia al testículo contralateral en paciente con tumor germinal o mediante biopsia en paciente con tumor germinal la cual se le realiza cirugía preservadora. El manejo radical se debe

otorgar ya que el 50% de las neoplasias intratubulares desarrollaran tumor germinal invasor. Se puede realizar orquiectomía radical o radioterapia localizada a baja dosis si se prefiere preservar la gónada para cuestiones endócrinas. (8)

Tumor Germinal No Seminomatoso

Un tercio de los tumores germinales no seminomatosos se encuentran en estadio I al diagnóstico con niveles normales de marcadores tumorales posterior a la orquiectomía. El manejo óptimo en estos pacientes sigue siendo controversial ya que la vigilancia, la linfadenectomía retroperitoneal la quimioterapia tienen una sobrevida a largo plazo del 100%. Se cree que solo el 20% de estos pacientes tendrán metástasis ocultas, por esta razón cualquier intervención en este tipo de pacientes se considera sobre tratamiento. Los factores de riesgo más comunes para presentar metástasis ocultas son invasión linfovascular y componente de carcinoma embrionario. (16)

Se han hecho estudios en cuanto al riesgo de recaída y mortalidad, los cuales los resultados han sido similares entre ellos. Se reporta el 28% en cuanto al riesgo de recaída y del 1.2% de mortalidad. (17) La quimioterapia es el manejo más común para la recaída y en aquellos donde se presenta con linfadenopatía retroperitoneal (>3cm) y elevación de los marcadores tumorales. Para aquellos que se presentan con masa pequeña (<3cm) y marcadores normales se pueden manejar con linfadenectomía retroperitoneal. (18)

La quimioterapia primaria ofrece al paciente tener recaída libre de enfermedad. Las desventajas de esto son que no trata teratoma retroperitoneal, requieren de vigilancia por periodos extensos y el riesgo de efectos adversos como neoplasias secundarias. Aunque la quimioterapia primaria se asocia con la menor tasa de recaída, la recaída es más complicada ya que presenta quimioresistencia. En cambio en pacientes que recaen posterior a la linfadenectomía retroperitoneal o a la vigilancia no han sido expuestos a quimioterapia y quedan curados prácticamente todos. (19)

Tumor Germinal Seminomatoso

El 80% de los pacientes con seminoma se presentan en estadio clínico I, es la presentación clínica más frecuente del cáncer de testículo. Han surgido cambios importantes en las últimas décadas en el manejo posterior a la orquiectomía radical. Desde vigilancia, radioterapia primaria y quimioterapia basada en esquema de platino. El control oncológico se aproxima al 100% con cualquiera de estas modalidades.

La radioterapia ha sido usada desde hace 4 décadas, usando el esquema clásico de al retroperitoneo e hilio ipsilateral, la configuración en "pata de perro". Las células de seminoma son altamente radiosensibles. Se han publicado series desde 1995 hasta el 2005 observando una adecuada respuesta, con 1% de recurrencia tras la radioterapia. (20) La vigilancia para estos pacientes debe ser clínico, con placa de tórax y marcadores tumorales. La toxicidad a largo plazo de estos pacientes es del 2%, la cual desde alteraciones gastrointestinales, hematológicas o neoplasias secundarias. (21, 22)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los marcadores tumorales séricos en el cáncer de testículo como la alfa feto proteína, la fracción beta de la hormona gonadotropina coriónica y la deshidrogenasa láctica tienen un papel importante en el diagnóstico, estadio clínico y pronóstico de la enfermedad.

De existir marcadores tumorales con mayor especificidad podrían identificar tumores testiculares en fases tempranas así mejorando el diagnóstico oportuno y pronóstico de la enfermedad.

¿Existe expresión de Antígenos Testiculares de Cáncer como MAGE-A3, MAGE- A4, SSX-1 y PRAME en sangre periférica en pacientes con Tumor de Testículo?

JUSTIFICACIÓN

Los Antígenos Testiculares de Cáncer son marcadores moleculares que podrían ser utilizados en pacientes con Tumor de Testículo como herramienta diagnóstica, determinar el estadio, pronóstico y progresión de la enfermedad.

HIPÓTESIS

Si los antígenos testiculares de cáncer se expresan en sangre periférica de pacientes con tumor testicular antes y después del procedimiento quirúrgico (Orquiectomía Radical), entonces apoya el diagnóstico de cáncer de testículo y su relación clínica con la extensión de la enfermedad.

OBJETIVO

Determinar si existe expresión de los Antígenos Testiculares de Cáncer MAGE- A3, MAGE- A4, SSX-1 y PRAME en sangre periférica de pacientes con Tumor de Testículo primario o enfermedad metastásica y así determinar la relación con la estirpe histológica.

OBJETIVO ESPECÍFICO

- Determinar si existe expresión de Antígenos Testiculares de Cáncer MAGE- A3, MAGE- A4, SSX-1 y PRAME en sangre periférica preoperatoria y posoperatoria en pacientes con tumor de testículo.
- Conocer el tipo de Antígeno Testicular de Cáncer en pacientes con Tumor Testicular.
- Conocer el número de Antígeno Testicular de Cáncer en pacientes con Tumor Testicular.
- Determinar si existe relación de Antígeno Testicular de Cáncer en pacientes con Tumor Testicular y la estirpe histológica.

VARIABLES

- Independientes
 - o Definición de Variables Independientes del estudio

<i>VARIABLE</i>	<i>DEFINICIÓN OPERACIONAL</i>	<i>TIPO DE VARIABLE</i>	<i>ESCALA DE MEDICIÓN</i>	<i>VALORES</i>
<i>MAGE-A3</i>	Identificación por RT-PCR	Cualitativa	Dicotómica Nominal	Presente/ Ausente
<i>MAGE-A4</i>	Identificación por RT-PCR	Cualitativa	Dicotómica Nominal	Presente/ Ausente
<i>SSX-1</i>	Identificación por RT-PCR	Cualitativa	Dicotómica Nominal	Presente/ Ausente
<i>PRAME</i>	Identificación por RT-PCR	Cualitativa	Dicotómica Nominal	Presente/ Ausente

- Dependientes
 - o Determinar la expresión de ATC en pacientes con cáncer testicular en las diferentes estirpes histológicas.

METODOLOGÍA

Tipo de estudio: Analítico, experimental, longitudinal y prospectivo

Universo: Pacientes con diagnóstico histopatológico de cáncer testicular.

Sitio: Servicio de Urología del Hospital General de México

Criterios de Inclusión:

- Pacientes masculinos mayores de 17 años de edad
- Pacientes con diagnóstico Histopatológico de Tumor Testicular
- Pacientes que no hayan recibido tratamiento previo a diagnóstico
- Pacientes con expediente clínico completo

Criterios de Exclusión:

- Pacientes sin diagnóstico y protocolo de estudio completo de tumor testicular
- Pacientes que hayan recibido cualquier tipo de tratamiento

Criterios de Eliminación

- Muestras insuficientes para realizar el análisis de expresión molecular de ATC
- Pacientes sin consentimiento informado
- Pacientes sin contar con reporte Histopatológico
- Pacientes sin expediente completo
- Abandono al tratamiento y seguimiento del paciente
- Paciente con tratamiento fuera de la institución

POBLACIÓN Y TAMAÑO DE LA MUESTRA

Material Biológico: Sangre Periférica

Sangre periférica de pacientes con diagnóstico de tumor testicular obtenida previo al procedimiento quirúrgico y posterior a manejo conjunto por Oncología Médica.

Se incluyeron en el estudio 35 muestras de pacientes con diagnóstico clínico de Tumor Testicular pertenecientes al Servicio de Urología del Hospital General de México durante un periodo de 8 meses. Posterior al reporte de Histopatología se reportaron 33 pacientes con diagnóstico definitivo de Tumor Testicular, mismos que se incluyeron al estudio, dos pacientes se eliminaron del estudio por presentar reporte de patología benigna.

Los pacientes que ingresaron al estudio previa firma del consentimiento informado recibieron atención en el servicio de Urología del Hospital General de México con la sospecha clínica de tumor testicular, presentando sintomatología de masa testicular, aumento de consistencia o dolor testicular. Fueron sometidos a protocolo de estudio de laboratorio y gabinete para corroborar el diagnóstico de Cáncer testicular. Entre los estudios de laboratorio se realizaron Biometría hemática, química sanguínea, marcadores tumorales séricos como alfa feto proteína, fracción beta de gonadotropina coriónica humana y deshidrogenasa láctica. Se realizó también ultrasonido testicular, tomografía computada de abdomen y pelvis y tele de tórax. Con todo esto se realizó el estadiamiento del paciente y así siendo programado para orquiectomía radical.

Se obtuvo una muestra de sangre venosa periférica 5ml horas previas al procedimiento quirúrgico (Orquiectomía Radical) la cual fue colocada en un tubo de EDTA (anticoagulante) y analizada por el Servicio de Biología Molecular del Hospital General de México.

A cada muestra sanguínea preoperatoria se realizó el análisis molecular separando el mRNA y análisis posteriormente por PCR. Aquellos pacientes quienes resultaron positivo a la muestra preoperatoria, se tomó una segunda muestra a los 3 meses del procedimiento quirúrgico, posterior al manejo establecido por Oncología Médica del Hospital General de México. De la misma forma se analizó el mRNA y posteriormente analizándose por PCR.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

- **Separación de leucocitos**

La separación de leucocitos se llevó a cabo por lisis de eritrocitos.

La muestra de sangre periférica se mezcló con solución lítica (solución hipertónica) en proporción 1:5 y se incubó 5 minutos a 4 C, esto para provocar la lisis de los eritrocitos, posteriormente se centrifugaron a 2500 rpm por 5 minutos, una vez que se obtuvo el botón de leucocitos se decantó el sobrenadante y se lavó con PBS 1X (phosphate buffer solution) centrifugando a 2500 rpm por 5 minutos. Los leucocitos que se obtuvieron fueron alicuotados en paquetes de $1-2 \times 10^6$ células para su posterior uso.

- **Aislamiento de mRNA**

El aislamiento de mRNA se realizó utilizando solución D, basado en el método de Chomczynski-Sacchi.

A las alícuotas de leucocitos se les agregó 550 μL de solución D y se mezcló mediante agitación hasta homogeneizar, posteriormente se agregaron 150 μL de ácido acético/acetato de sodio 2M pH 4, se homogenizó por inversión y se adicionaron 500 μL de fenol/agua (3:2) se mezcló y se agregó cloroformo-alcohol isoamílico (49:1), mezclando vigorosamente en vortex. Se incubó a 4 C durante 10 minutos y se centrifugó a 12000 rpm por 15 minutos a 4 C. Una vez centrifugado se separó la fase acuosa procurando no tomar la fase intermedia, se colocó en un tubo limpio y se adicionó etanol al 100%, se mezcló y se incubó a -20 C por una noche. Al siguiente día se centrifugó a 12000 rpm por 15 minutos a 4 C; el pellet obtenido se lavó con etanol al 75% se centrifugó a 8000 rpm por 7 minutos, se decantó el sobrenadante y se dejó secar el exceso de etanol invirtiendo el tubo. Según el tamaño del pellet se agregó de 10 a 40 μL de agua inyectable. Finalmente se alineó a 70 C durante 10 minutos. Se guardó a -80 C hasta su posterior uso.

- **Integridad, pureza y cuantificación de RNA**

- **Integridad**

La integridad del RNA se verificó con la presencia de las bandas 18S y 28S del RNA ribosomal (rRNA), mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%, cargando 2 μL de RNA mezclado previamente con 2 μL de buffer de carga y 2 μL de TAE1X, durante 40 minutos a 70volts.

- **Cuantificación y pureza**

Para determinar la concentración y pureza del RNA total se llevó a cabo la medición de la absorbancia a 260 y 280 nm de longitud de onda en espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific, Genesys 10S UV-Vis). A 260 nm los ácidos nucleicos alcanzan la absorción máxima de luz y las proteínas tienen un máximo de absorción a 280 nm, por lo que el cálculo de la relación A_{260} / A_{280} es una manera común para expresar la pureza del material genético. Un valor de 1.65 a 1.9 indica una muestra pura.

- **Síntesis de DNA complementario (cDNA)**

El cDNA se sintetizó a partir de 2500ng de RNA total a un volumen final de 25 μL . El RNA se mezcló con 1 μL de Oligo dT (PROMEGA, Madison WI, USA) y el volumen correspondiente de H₂O inyectable; se incubó a 70°C/10' y posteriormente se añadieron 6 μL de buffer 5X (250 mM Tris-HCl, pH=8.4, 500 mM KCl, 25 mM MgCl₂, 10mM DTT) (PROMEGA, Madison WI, USA), 3 μL de dNTPs 10 μM (Invitrogen, Life Technologies Carlsbad, CA) y 1 μL de transcriptasa reversa MML-V (200 U/ μL) (PROMEGA, Madison WI, USA) se incubó a 37°C/50', finalmente la enzima MML-V se inactivó incubando la muestra a 70°C/10'. Se almacenó a -80°C hasta su uso.

- **Detección de los ATC mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, polimerase chain reaction).**

Las reacciones de amplificación de los marcadores se prepararon de la siguiente manera.

Tabla # 5. Composición de los sistemas de PCR para marcadores.

Gen	H2O	5X Buffer	MgCl2 (25 mM)	dNTPs (10 mM)	Oligo Fw (10 µM)	Oligo Rv (10 µM)	DNA polimerasa	cDNA	Volumen final		
GAPDH	4.5 µL	2.5 µL	1.3 µL	0.3 µL	0.4 µL	0.4 µL	0.1 µL	1 µL	10.5 µL		
β-2-microglobulina									11.1 µL		
SSX-1								12 µL			
NY-ESO			0.8 µL	0.7 µL	0.7 µL	0.7 µL		0.7 µL	1.6 µL	1.6 µL	11.6 µL
MAGE-A3											
MAGE-A4											
PRAME											

Se utilizó GAPDH y β-2-Microglobulina como genes constitutivos para determinar integridad del material genético de cada muestra analizada. Las condiciones de amplificación se describen con más detalle en la Tabla # 7

Tabla # 6. Perfiles térmicos para amplificación de marcadores.

Gen	Fragmento (pb)	Condiciones de amplificación
GAPDH	221	Desnaturalización: 94°C/5min. Amplificación: 94°C/45seg, 60°C/45seg, 72°C/45seg (35 ciclos). Elongación: 72°C/10min. Templado: 4°C /10min
β-2-microglobulina	397	
SSX-1	97	Desnaturalización: 94°C/5min. Amplificación: 94°C/40seg, 60°C/30seg, 72°C/30seg (30 ciclos). Elongación: 72°C/10min. Templado: 4°C /10min
MAGE-A4	445	
MAGE-A3	725	Desnaturalización: 94°C/5min. Amplificación: 94°C/45seg, 60°C/45seg, 72°C/45seg (30 ciclos), Elongación: 72°C/10min, Templado: 4°C/10min.
PRAME	124	
NY-ESO1	308	

Tabla # 7. Oligonucleótidos específicos para la amplificación de fragmentos.

Gen	Oligo Fw	Oligo Rw	Longitud de producto (bp)
GAPDH	CGGGAAGCTTGTCATCAATGG	CATGGTTCACACCCATGACG	221
β-2-microglobulina	CCTCCATGATGCTGCTTACATGTC	ATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAGCT	397
MAGE A3	TGGAGGACCAGAGGCCCCC	GGACGATTATCAGGAGGCCTGC	725
NY-ESO1	AAAAACACGGGCAGAAAGC	GCTTCAGGGCTGAATGGAT	308
SSX-1	AAGCCAGCAGAGGAGGAAAA	TATTTGCTTTTCCTGGGGGG	97
PRAME	AACTGCTGGGCTTATGGG	CCCTCACACTGAACACTTG	124
MAGE-A4	GAGCAGACAGGCCAACCG	AAGGACTCTGCGTCAGGC	445

RESULTADOS

De acuerdo con los criterios de inclusión se analizaron 33 pacientes con tumor testicular, los cuales los 33 pacientes ingresaron al servicio de Urología del Hospital General de México.

De los 33 pacientes se encontraban en un rango de edad del 18-53 años de edad, con una media de 29 años de edad. El rango de mayor frecuencia fue de 18-25 años de edad, representando el 48.4%. El siguiente grupo de edad de 26-35 años de edad representó el 33.3% y mayores de 36 años de edad fue el 18.1%. El tiempo de evolución de la enfermedad que presentaban los enfermos con mayor frecuencia fue menor a 6 meses en el 48.4%. La mayoría de los pacientes se presentaron sin lesiones metastásicas en campos pulmonares, el 84.8%. La etapa clínica de mayor frecuencia fue el estadio IB en el 21.2% seguido del EC IA y el IIC en el 18.1%. En cuanto al estadio patológico de acuerdo a la clasificación de TNM de la NCCN de 2016 para cáncer de testículo el más frecuente fue el pT1 en el 48.4% seguido del pT2 en el 39.4% y pT3 en el 12.2%, no hubo pacientes pT4. En cuanto al diagnóstico patológico el Seminoma Clásico fue lo más frecuente representando el 51.5% seguido del tumor germinal mixto en el 48.5% (Tabla 8, Figura 1 y 2)

Tabla 8. Características clínicas de los pacientes con tumor testicular. (n=33)

		Media	Rango	n	%
Edad		29	18-53		
	18-25			16	48.4
	26-35			11	33.3
	mayor 36			6	18.1
AFP		722.9	0.80-8973		
FBHCG		1360.2	0 -29838		
DHL		829	111-4025		
Tiempo de Evolución	menor a 6 meses			16	48.4
	6 a 1 año			14	42.4
	mayores a 1 año			3	9.1
RX Tórax	Negativa			28	84.8
	Lesión			5	15.2
EC	IA			6	18.1
	IB			7	21.2
	IS			5	15.2
	IIB			2	6.1
	IIC			6	18.1
	IIIA			2	6.1
	IIIB			2	6.1
	IIIC			3	9.1
TNM	pT1			16	48.4
	pT2			13	39.4
	pT3			4	12.1
DX Patológico	Seminoma Clásico			17	51.5
	Tumor Germinal Mixto			16	48.5

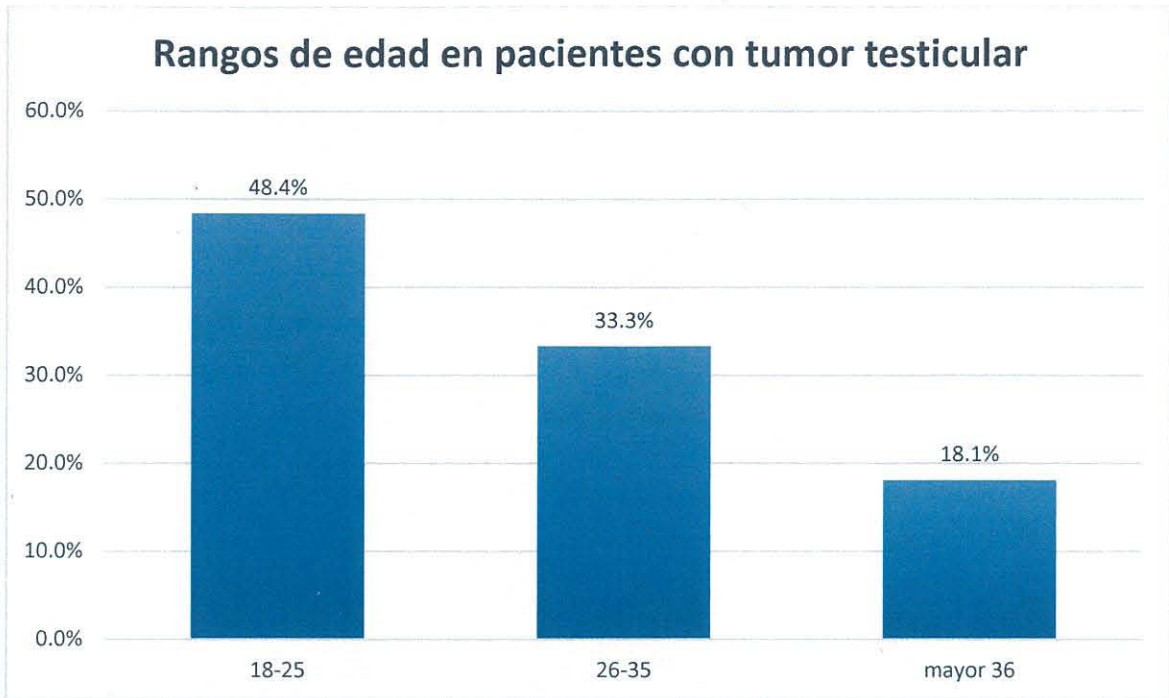


Figura 1: Rangos de edad en pacientes con Tumor Testicular

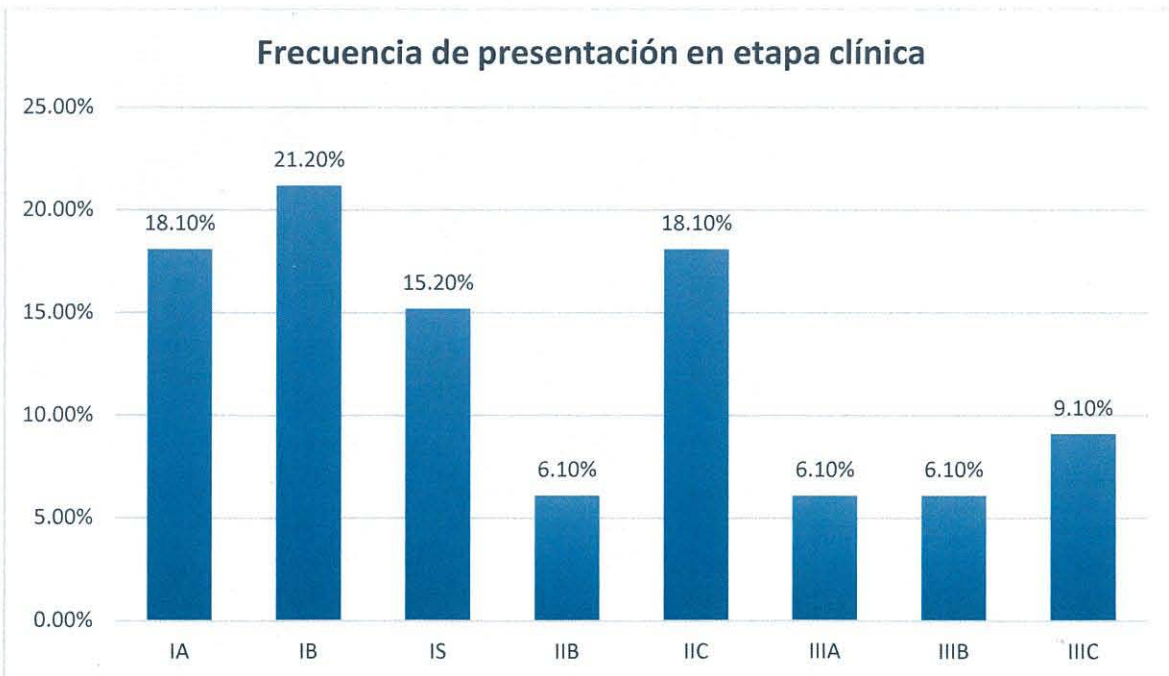


Figura 2: Frecuencia de Presentación en Etapa Clínica

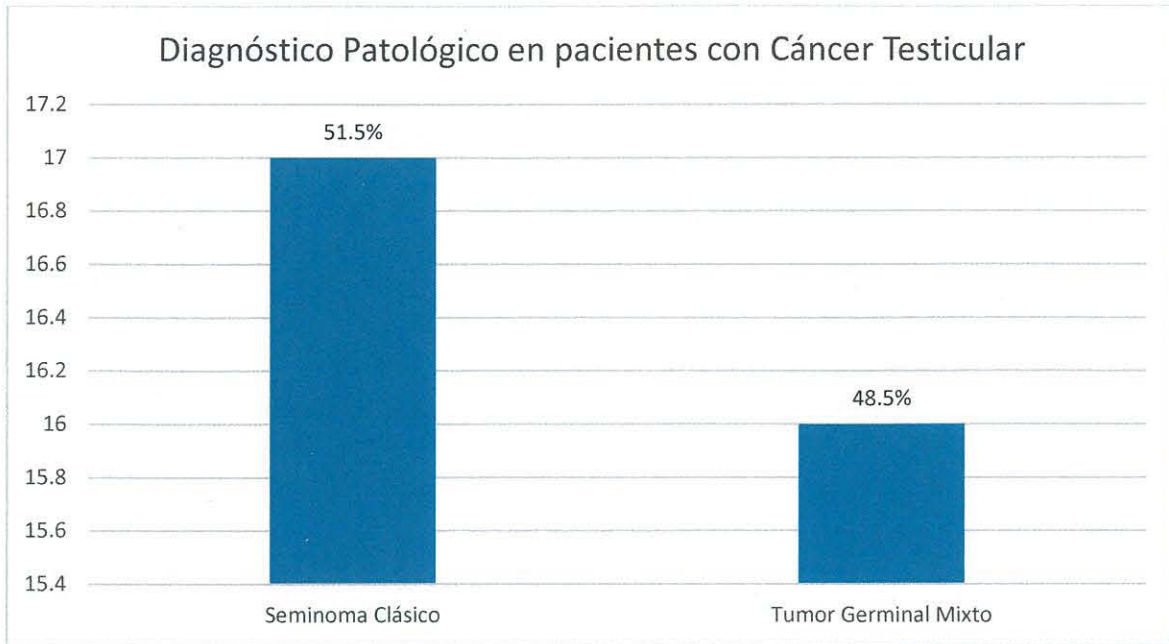


Figura 3. Diagnóstico Patológico en pacientes con Cáncer Testicular

Una vez que se corroboró que el gen control estaba presente se procedió a realizar la PCR para los genes de la familia MAGE-A3, MAGE-A4, SSX-1 y PRAME. Una vez realizada la estandarización se continuó con el análisis de ATC en pacientes con Tumor Testicular.

- INTEGRIDAD DEL MATERIAL GENÉTICO

Se aisló RNA de las muestras, observando las bandas características del RNA ribosomal 28S y 18S.

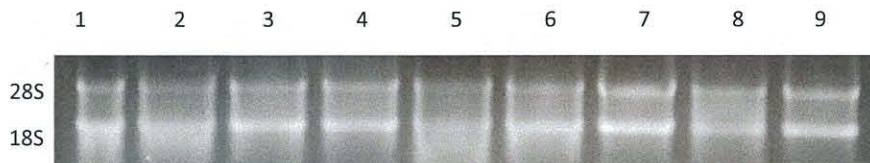


Figura 4. Determinación de la integridad de RNA. Carril 1: línea celularK-562; carril2-5 individuos sanos; carril 6-9: pacientes.

La adecuada síntesis de cDNA se corroboró amplificando los genes β -2-microglobulina (B-2-M) y GAPDH (394 pb y 221 pb respectivamente). (Figura 5)

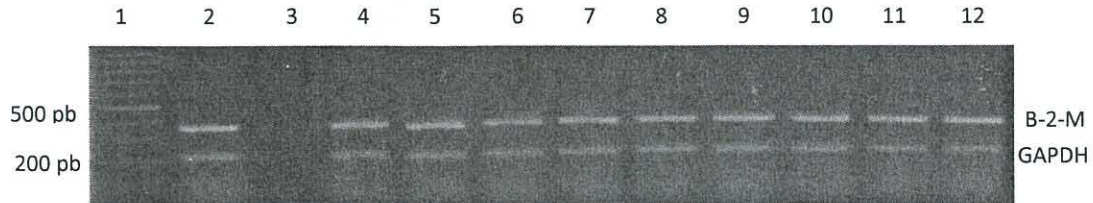


Figura 5. Amplificación de los genes constitutivos genes β -2-microglobulina y GAPDH. Carril 1: Marcador de peso molecular (MPM); carril 2: Control positivo (K-562); carril 3: Control negativo (H₂O); carril 4 – 7: individuos sanos; carril 8– 12 pacientes.

Se realizó RT-PCR para verificar la integridad del RNA con el gen constitutivo GAPDH (Figura 5).



Figura 6. Biomarcadores en individuos sanos. Carril 1: Marcador de peso molecular (MPM); carril 2: β -2-microglobulina (397pb) y GAPDH (221); carril 3: MAGE-A3 (-); carril 4: MAGE-A4 (-); carril 5: PRAME (-); carril 6: SSX-1 (-); carril 7: NY-ESO1(-).

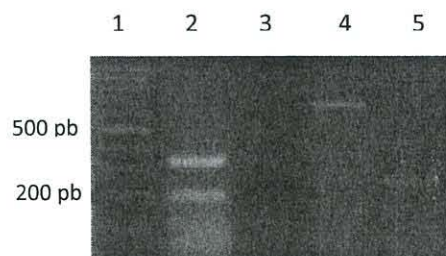


Figura 7. Controles positivos MAGE-A3 y NY-ESO1. Carril 1: Marcador de peso molecular (MPM); carril 2: β -2-microglobulina (397 pb) y GAPDH (221 pb); carril 3: control de reacción; carril 4: MAGE-A3 (+); carril 5: NY-ESO1 (+).

Se analizaron 33 muestras de sangre periférica en pacientes con diagnóstico de Tumor Testicular, se realizó RT-PCR para verificar la integridad del RNA con el gen constitutivo GAPDH. Una vez corroborado que el gen control estaba presente se procedió a realizar PCR para los genes de las familias MAGE-A3, MAGE- A4, SSX-1 y PRAME. Se encontraron 8 pacientes con determinación positiva a ATC. (Tabla 9)

Paciente	MAGE-A3	MAGE-A3 Control	MAGE-A4	MAGE-A4 Control	SSX-1	SSX-1 Control	PRAME	PRAME Control
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	+	-	-	-	-	-
6	-	-	+	-	-	-	+	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	+	-	-	-
14	-	-	-	-	+	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	+	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	+	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	+	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-
29	-	-	+	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 9: Expresión de los Antígenos Testiculares de Cáncer en 33 pacientes con Tumor Testicular

Se muestra la expresión para dos ATC en un paciente, resultó positivo para MAGE-A4 y PRAME. (Figura 8)

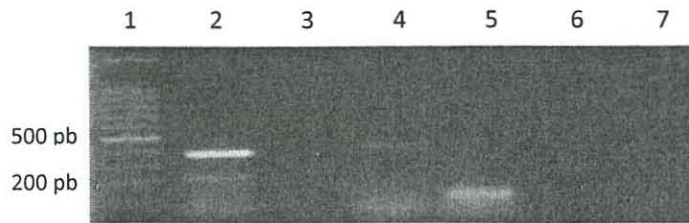


Figura 8. Determinación de biomarcadores en paciente #6. Carril 1: Marcador de peso molecular (MPM); carril 2: β -2-microglobulina (397 pb) y GAPDH (221 pb); carril 3: MAGE-A3 (-); carril 4: MAGE-A4 (+); carril 5: PRAME (+); carril 6: SSX-1 (-); carril 7: NY-ESO1(-).

Se muestra la expresión para un ATC en un paciente, resultó positivo para SSX-1. (Figura 9)



Figura 9. Determinación de biomarcadores en paciente #13. Carril 1: Marcador de peso molecular (MPM); carril 2: β -2-microglobulina (397 pb) y GAPDH (221 pb); carril 3: MAGE-A3 (-); carril 4: MAGE-A4 (-); carril 5: PRAME (-); carril 6: SSX-1 (+); carril 7: NY-ESO1(-).

Se muestra la expresión para un ATC en un paciente, resultó positivo para MAGE-A4. (Figura 10)

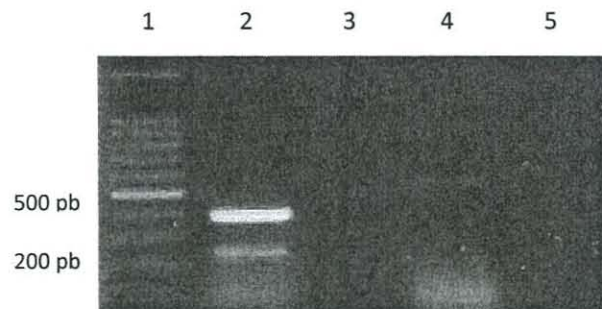


Figura 10. Determinación de biomarcadores en paciente #22. Carril 1: Marcador de peso molecular (MPM); carril 2: β -2-microglobulina (397 pb) y GAPDH (221 pb); carril 3: MAGE-A3 (-); carril 4: MAGE-A4 (+); carril 5: PRAME (-).

En este caso resultó positivo para SSX-1, lo cual posterior a manejo de orquiectomía se tomó muestra y se repitió el mismo proceso para determinación de ATC. Resultó negativo en la muestra de seguimiento. (Figura 11)

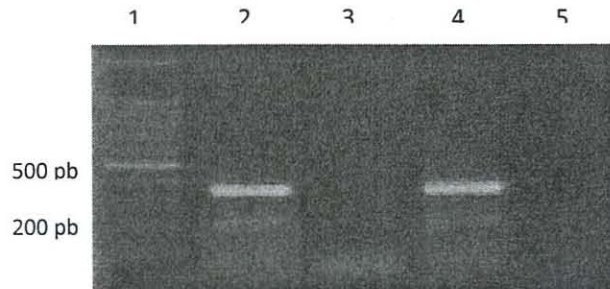


Figura 11. Seguimiento del paciente en paciente #13. Carril 1: Marcador de peso molecular (MPM); carril 2: β -2-microglobulina (397 pb) y GAPDH (221 pb); carril 3: SSX-1(+); carril 4: β -2-microglobulina (397 pb) y GAPDH (221 pb) (+); carril 5: SSX-1 (-).

Se realizó la asociación entre los diferentes parámetros clínicos y los pacientes que resultaron positivos a la expresión de ATC. (Tabla 10) Se analizó edad, tiempo de evolución, presencia de masa retroperitoneal, presencia de lesiones pulmonares, marcadores tumorales pre quirúrgicos, estadio clínico, estadio patológico dependiendo del TNM de cáncer de testículo y el diagnóstico histopatológico.

De los 33 pacientes analizados, resultaron 8 pacientes positivos a la expresión de ATC. En cuanto al rango de edad resultaron positivos 3 pacientes entre el grupo de edad de 18-25 representa el 9.1%, dos pacientes entre 26-35 años lo cual representa el 6.1% y tres pacientes mayores de 36 años de edad la cual es el 9.1%. ($p=0.266$) En cuanto al tiempo de evolución 4 pacientes cursaron con menor de 6 meses de evolución, representa el 12.1% y 4 pacientes el cual el tiempo de evolución fue de 6-12 meses de evolución, el 12.14%. ($p=0.575$) Se realizó tomografía computada de abdomen y pelvis y se analizó la asociación entre presentar masa retroperitoneal y resultar positivo a la determinación de ATC. Cinco pacientes resultaron con TC negativa a masa retroperitoneal, representa el 15.2% y 3 pacientes resultaron positivos a ATC y con masa retroperitoneal representando el 9.1%. ($p=0.475$) Se realizó tele de tórax y se analizó la asociación entre presentar lesiones pulmonares y resultar positivo a la determinación de ATC. Ocho pacientes resultaron con Tele de tórax negativa a lesiones pulmonares, representa el 24.2%. ($p=0.170$). Se analizaron los marcadores tumorales prequirúrgicos de los ocho pacientes con determinación positiva a ATC. En cuanto a la AFP en cuatro pacientes se encontraba normal previo al manejo quirúrgico esto es el 12.1%. Cuatro pacientes se encontraban con AFP elevada previo al manejo quirúrgico, el 12.1%. ($p=0.767$). Se midió también la fracción beta de la hormona gonadotropina coriónica la cual resultó positivo a ATC en un paciente, el 3.0% y negativos los otros siete, el 21.2%. ($p=0.632$) La DHL resultó normal en dos pacientes representando el 8.6% con expresión a ATC y se encontraba en rangos normales en los otros seis pacientes el 18.2% con determinación positiva a ATC. ($p=0.566$) En cuanto al estadio clínico y la asociación positiva a ATC un paciente con EC IIB y un paciente con EC IIIB, esto representó al 2.9% respectivamente. EL resto de los pacientes se encontraban dos pacientes con EC IA, dos pacientes con EC IB y dos pacientes con estadio clínico IS. ($p=0.542$) En cuanto al estadio patológico

dictaminado por el TNM de la guías de la NCCN de 2016 para cáncer de testículo se encontraron cuatro pacientes en pT1 representando el 12.1%, cuatro pacientes en pT2 representando el 12.1% que expresaron ATC. ($p=0.583$) Se analizó la asociación de ATC con el reporte histopatológico donde tres pacientes con seminoma clásico resultaron positivos a la expresión de ATC y representa el 9.1%. Cinco pacientes con expresión de ATC se reportó Tumor Germinal Mixto representando el 15.2% ($p=0.362$)

		ATC	
		Positivo	%
Edad	18-25	3	9.1
	26-35	2	6.1
	mayor 36	3	9.1
Evolución	menor a 6 meses	4	12.1
	6 a 1 año	4	12.1
	mayores a 1 año	0	-
TC	negativo	5	15.2
	masa retroperitoneal	3	9.1
RXTorax	Negativa	8	24.2
	Lesión	0	-
AFPpre	normal	4	12.1
	elevado	4	12.1
FBHCGpre	normal 0-1.1	2	6.1
	elevada mayor 1.1	6	18.2
DHLpre	normal	2	6.1
	Elevado mayor 192	6	18.2
EC	IA	2	6.1
	IB	2	6.1
	IS	2	6.1
	IIB	1	3.0
	IIC	0	-
	IIIA	0	-
	IIIB	1	3.0
	IIIC	0	-
TNM	pT1	4	12.1
	pT2	4	12.1
	pT3	0	-
	pTT4	0	-
Dx Patológico	Seminoma Clásico	3	9.1
	Tumor Germinal Mixto	5	15.2

Tabla 10. Asociación clínica de pacientes positivos para genes ATC

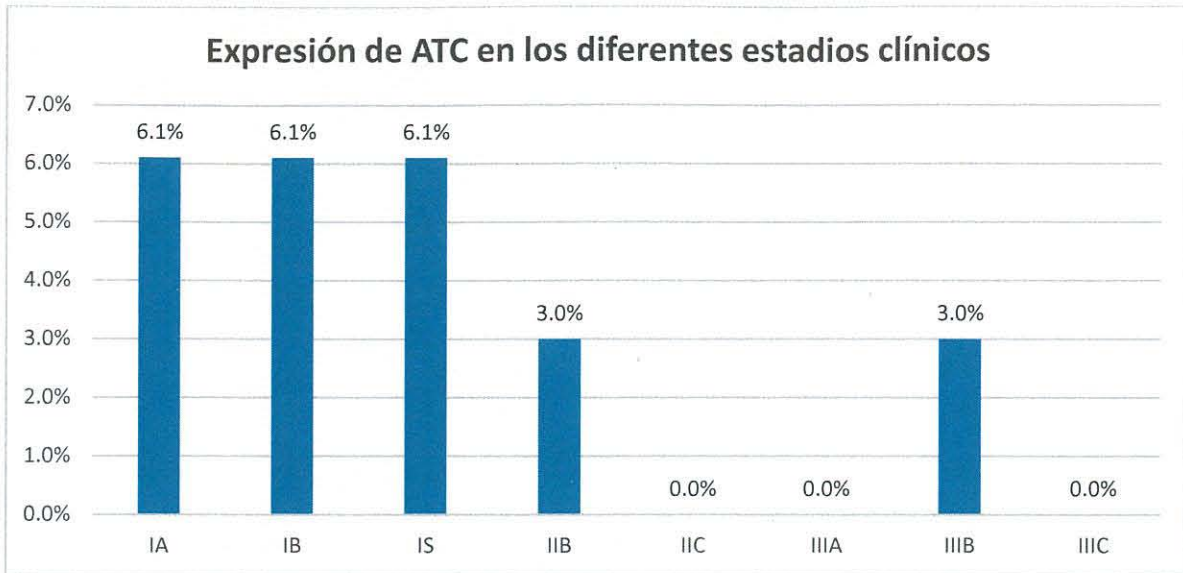


Figura 12. Expresión de ATC en diferentes Estadios Clínicos

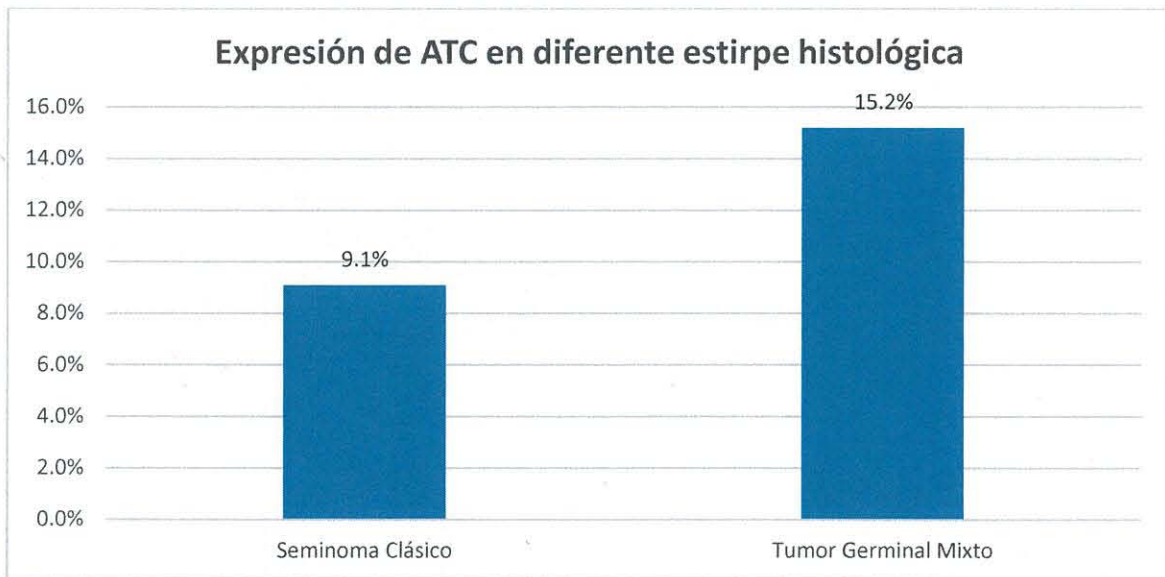


Figura 13. Expresión de ATC en diferentes Estirpes Histológicas

Resultaron positivos los ATC MAGE-A4, SSX-1 y PRAME en ocho pacientes de los 33 estudiados, la cual se analizó su presencia con los diferentes factores clínicos. (Tabla 11 y 12) Un paciente del grupo de edad 18-25 años de edad resultó positivo para MAGE-A4, un paciente del grupo de edad 26-35 años resultó positivo para MAGE-A4 y dos pacientes para el grupo de edad mayores de 36 años resultaron positivos para MAGE-A4, esto representa el 3.0 y 6.1% respectivamente. Dos pacientes del grupo de edad de 18-25 años resultaron positivo para SSX-1 y un paciente mayor de 36 años para el mismo ATC. Representan el 6.1% y 3.0% respectivamente. Un paciente entre 26-35 años resultó con dos ATC positivos, el MAGE-A4 y PRAME la cual representa el 3.0%. ($p=0.322$) Se analizó el Estadio Clínico (EC) y su asociación a la expresión de ATC. En cuanto al marcador tumoral MAGE-A4 se encontró positivo en un paciente en EC IB, un paciente en EC IS, un paciente en EC IIB y un paciente en EC IIIB, todos ellos representan el 3.0%. En cuanto al marcador tumoral SSX-1 se encontró positivo en un paciente con EC IA, un paciente con EC IB y un paciente con EC IS también representando el 3.0%. Hubo solo un paciente que presentó expresión para dos ATC, el MAGE-A4 y PRAME la cual se encontró en EC IA, representando el 3.0%. ($p=0.790$) (Tabla 11 y 12) Se analizó también el estadio patológico con respecto al TNM de Cáncer de Testículo de la NCCN de 2016 y su asociación a la expresión de ATC. Un paciente con pT1 resultó positivo a MAGE-A4. Tres pacientes con pT2 resultaron positivos a MAGE-A4. En cuanto al marcador tumoral SSX-1, dos pacientes resultaron positivos con pT1 y un paciente para pT2. Un solo paciente con pT1 resultó positivo para MAGE-A4 y PRAME. ($p=0.859$)

		ATC			
		Negativo	MAGE-A4	SSX	MAGE-A4 y PRAME
Edad	18-25	13	1	2	0
	26-35	9	1	0	1
	mayor 36	3	2	1	0
EC	IA	4	0	1	1
	IB	5	1	1	0
	IS	3	1	1	0
	IIB	1	1	0	0
	IIC	6	0	0	0
	IIIA	2	0	0	0
	IIIB	1	1	0	0
	IIIC	3	0	0	0
TNM	pT1	12	1	2	1
	pT2	9	3	1	0
	pT3	4	0	0	0
DX Patológico	Seminoma Clásico	14	2	1	0
	Tumor Germinal Mixto	11	2	2	1

Tabla 11. Expresión de ATC y su asociación con los factores clínicos

Se analizó la relación del diagnóstico histopatológico con la expresión de ATC. Donde 17 pacientes resultaron con Seminoma Clásico de estos 14 pacientes (42.4%) resultaron negativos para ATC, dos resultaron positivos (6.1%) para el marcador MAGE-A4 y un paciente para (3.0%) para SSX-1. En cuanto al tumor germinal mixto hubo un total de 16 pacientes, donde 11 de ellos (33.3%) resultaron negativos, dos de ellos (6.1%) positivos para MAGE-A4, dos de ellos (6.1%) positivos para SSX-1 y un paciente (3.0%) positivo para MAGE-A4 y PRAME. (Tabla 11 y 12)

		Negativos	MAGE A4	SSX	A4 y PRAME
Edad	18-25	39.4	3.0	6.1	,0
	26-35	27.2	3.0	0	3.0
	mayor 36	9.1	6.1	3.0	,0
EC	IA	12.1	0	3.0	3.0
	IB	15.2	3.0	3.0	0
	IS	9.1	3.0	3.0	0
	IIB	3.0	3.0	0	0
	IIC	18.2	0	0	0
	IIIA	6.1	0	0	0
	IIIB	3.0	3.0	0	0
	IIIC	9.1	0	0	0
TNM	PT1	36.4	3.0	6.1	3.0
	PT2	27.3	9.1	3.0	0
	PT3	12.1	0	0	0
Dx Patológico	Seminoma Clásico	42.4	6.1	3.0	,0
	Tumor Germinal Mixto	33.3	6.1	6.1	3.0

Tabla 12. Frecuencias de expresión de los genes ATC en cada parámetro clínico

Se analizó la frecuencia de cada ATC en sangre periférica independiente de los factores clínicos. Ocho pacientes resultaron positivos a ATC. El ATC MAGE-A4 fue el más frecuente con el 12.1% representando cuatro pacientes, seguido del SSX-1 con el 9.0% representando tres pacientes y con una frecuencia de 3.0% presentando MAGE-A4 y PRAME esto lo presentó un paciente. (Figura 14)

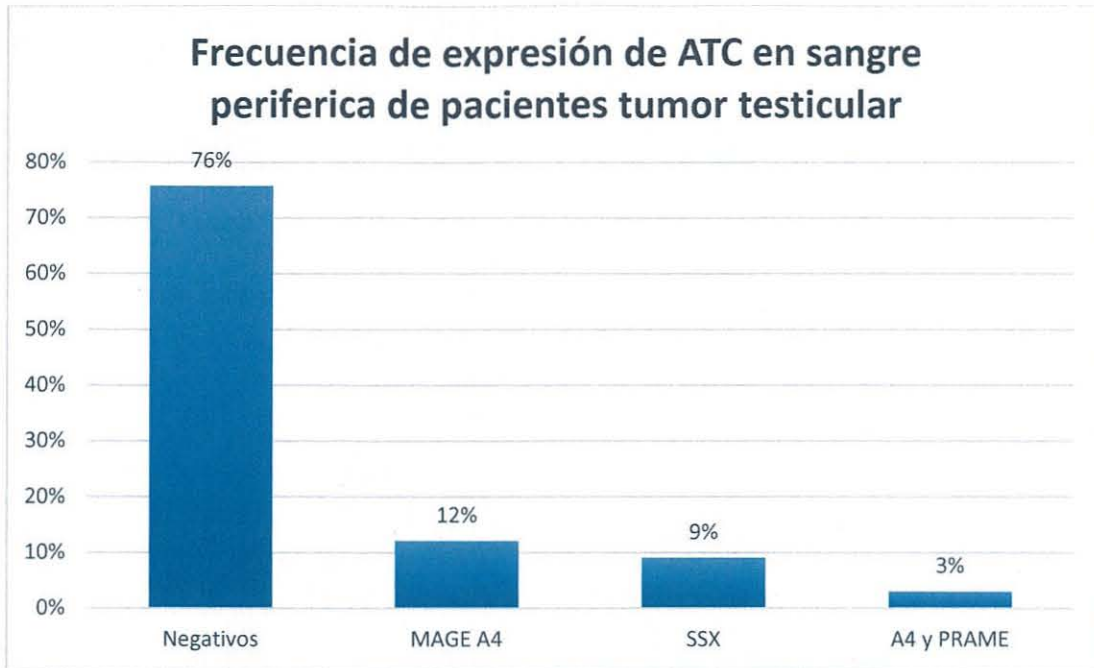


Figura 14. Frecuencia de expresión de ATC en sangre periférica de pacientes con tumor testicular.

Se analizaron 17 pacientes que resultaron con Seminoma Clásico de estos 14 pacientes (42.4%) resultaron negativos para ATC, dos resultaron positivos (6.1%) para el marcador MAGE-A4 y un paciente para (3.0%) para SSX-1. En cuanto al tumor germinal mixto hubo un total de 16 pacientes, donde 11 de ellos (33.3%) resultaron negativos, dos de ellos (6.1%) positivos para MAGE-A4, dos de ellos (6.1%) positivos para SSX-1 y un paciente (3.0%) positivo para MAGE-A4 y PRAME. (Figura 15)

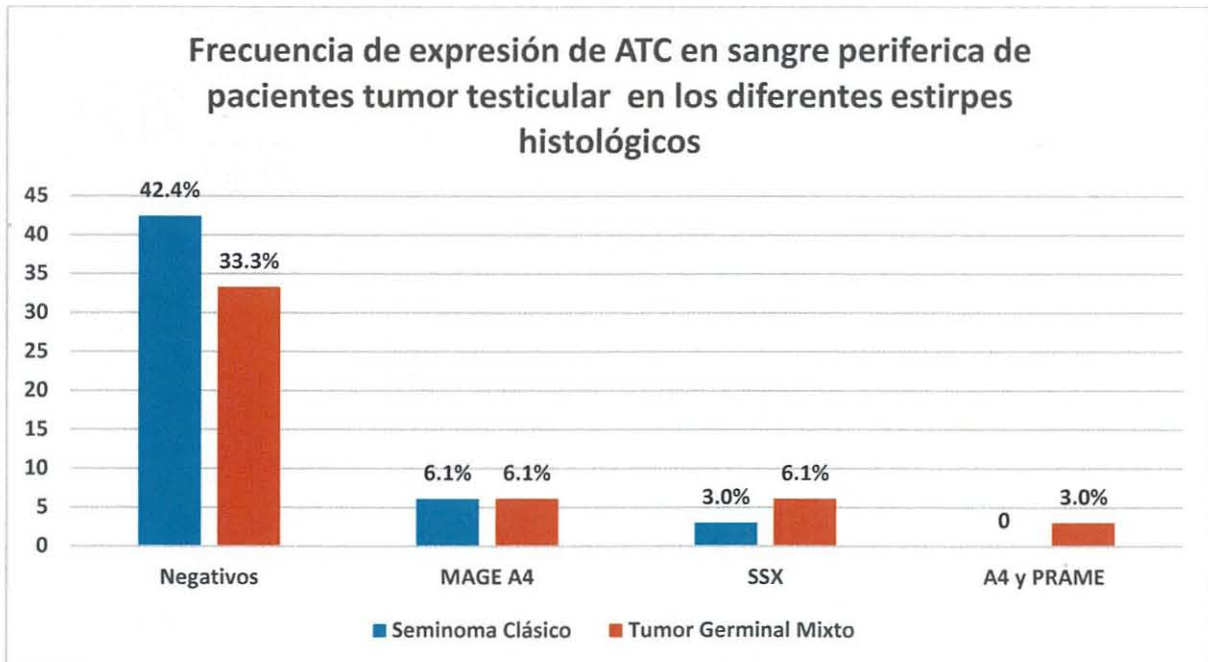


Figura 15. Frecuencia de expresión de ATC en sangre periférica en diferentes estirpes histológicas

Se realizó un seguimiento en aquellos pacientes quienes resultaron positivos a la expresión de ATC. De los ocho pacientes que resultaron positivos se tomó la determinación de ATC posterior al manejo quirúrgico y adyuvante. Los ocho pacientes que resultaron positivos previo al manejo primario resultaron negativos a la expresión de ATC después de haber recibido manejo para el cáncer de testículo. Esto representó que el 100% de los pacientes con determinación positiva resultaron negativos después del manejo primario. (Figura 16)

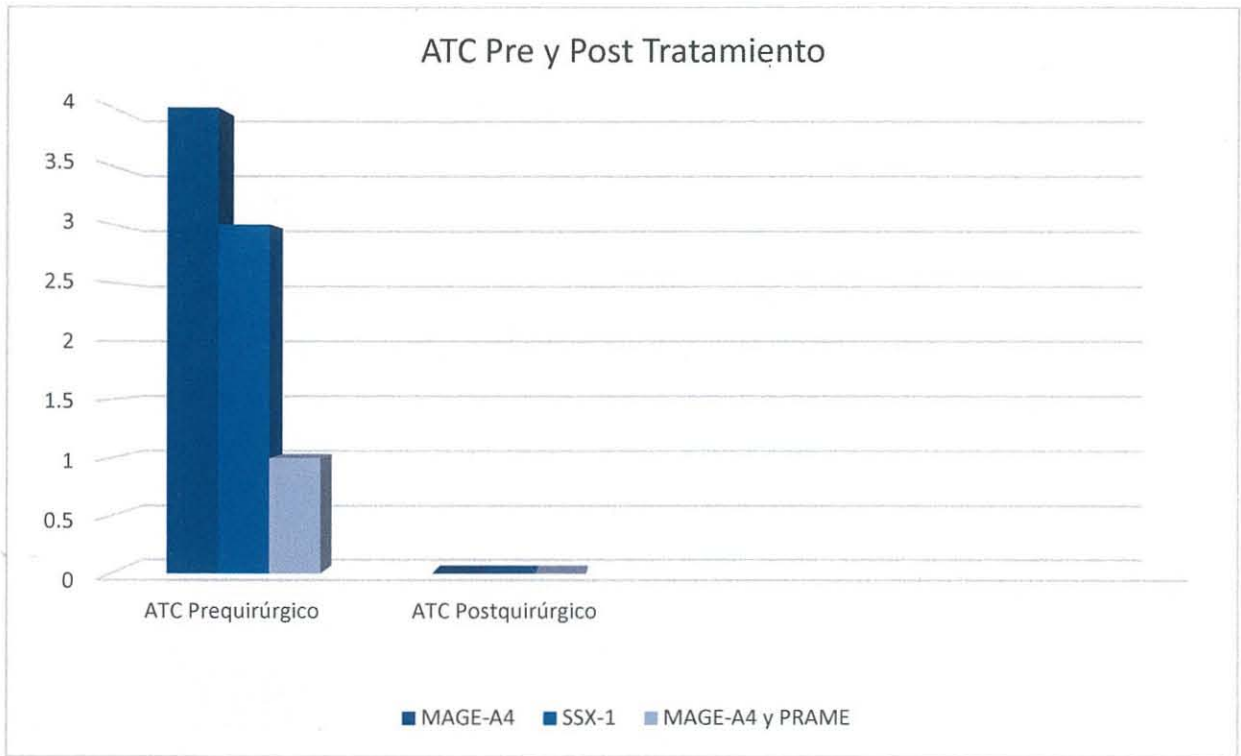


Figura 16. Seguimiento de la determinación de ATC posterior a manejo primario.

DISCUSIÓN

La incidencia de cáncer de testículo parece estar aumentando a nivel mundial.

Los antígenos testiculares de cáncer son un grupo de proteínas que están expresadas de forma normal en el tejido testicular, placenta y ovario. Son una amplia familia de antígenos asociados a la expresión de tumores de diversos orígenes histológicos. Hasta la fecha existe escasa información acerca de estos marcadores y su implicación en las diferentes enfermedades. (23)

En un estudio realizado más recientemente en el 2014 por Bode P. et al tomó una muestra de 325 muestras de tumor testicular, donde 207 de ellos fueron seminomas clásicos, 94 germinal mixto, 19 carcinoma embrionario puro y un caso de teratoma. Se encontró positivo en la familia de ATC de MAGE y GAGE del 4-40% y 10% respectivamente en seminoma. En cuanto al seminoma espermatocítico se encontraron positivos al 100% los ATC de MAGE, GAGE y CTAG1B. En cuanto a los demás estirpes histológicas resultaron negativos. Esto comprueba la teoría que el seminoma clásico y el tumor germinal mixto provienen de la neoplasia intratubular testicular y que el seminoma espermaticítico se desarrolla de otra lesión no asociada a neoplasia intratubular. (26) Comparado con nuestra serie presentaron determinación de MAGE en el 14.4%.

En los diferentes estudios donde se examinan diferentes ATC, los resultados han sido similares, donde el seminoma espermatocítico ha demostrado ser positivo al 100%, donde existe variedad en cuanto a la positividad son las demás variantes histológicas. En el estudio por Tseng Chen et al demuestran que el ATC GAGE y CT7 en seminoma clásico son los que tienen mayor sensibilidad. (86% y 91% respectivamente, siendo menos frecuente el MAGE-A en el 62%). En cuanto al tumor no seminomatoso se ha visto una expresión menos frecuente. En este mismo estudio se comprobó la teoría del desarrollo del tumor germinal, la razón por la positividad al 100% del seminoma espermatocítico y el resto de los tumores germinales encontrando ligera sensibilidad a los ATC. Se cree que los tumores germinales se originan de las células germinales en diferentes etapas de maduración. Los seminomas expresan típicamente genes que corresponden a células primordiales, en cambio el seminoma espermaticítico ha perdido estos genes y expresa marcadores de espermatogénesis incluyendo ATC, estos encontrados solo en células germinales pre meióticas. Esta conducta se ha visto en los diferentes estudios publicados, donde GAGE, SSX, MAGE y SAGE típicamente se encuentran en seminoma espermaticítico y OCT3 y NANOG en seminoma clásico. (27) A pesar de demostrar determinación menor para el ATC MAGE-A (62%) fue más elevado que lo demostrado en nuestro estudio.

Son pocos los estudios que se han desarrollado para identificar la expresión de la familia del gen SSX. Uno de ellos es el estudio por Tureci et al el cual analizan la expresión del ATC SSX en diferentes tumores del hombre, incluyendo el cáncer testicular. Se vió expresión variable en los diferentes tipos de tumores con frecuencias diferentes. En donde se expresó con mayor frecuencia esta familia de ATC fue en cáncer de mama seguido de cáncer colorectal. En este estudio se analizaron dos pacientes con seminoma clásico y ninguno de ellos lo presentó positivo. (31) En nuestro estudio de los nueve pacientes que resultaron positivos, tres de ellos fueron positivos a SSX-1, representando el 8.6%.

Existen otros estudios como el de Hara et al demostrando frecuencia de determinación de ATC entre el 68-82% en la familia de MAGE-A. (25)

Los ATC son expresados en tumores pero no en tejido sano, excepto en tejido testicular, el cual no es accesible para el sistema inmunológico dado que no expresan HLA de clase I en la superficie de las células. Tomando esto en cuenta los ATC pueden considerarse como objetivos esenciales del tumor. Los ATC codifican distintos péptidos antigénicos que son presentados al sistema inmunológico en asociación de varios HLA de clase I o II, así teniendo respuesta humoral y celular. Las respuestas inmunes espontáneas y coordinadas han sido demostradas en contra de varios ATC.

Los ATC representan un objetivo molecular ideal para la inmunoterapia en los pacientes con cáncer. La caracterización de péptidos inmunogénicos de ATC seleccionados junto con la identificación de antígenos de HLA representa la base para iniciar terapias basadas en el uso de ATC como agentes terapéuticos. (29,30)

CONCLUSIONES

Se sabe que no debe existir la expresión de ATC en sangre periférica de pacientes sanos. Se conoce expresión variable de ATC en las diferentes estirpes histológicas de cáncer testicular.

La frecuencia de MAGE-A4 fue la más frecuente en nuestra serie, seguido de SSX-1. El ATC MAGE-A4 se expresó en ambos grupos de tumores testiculares, tanto en los seminoma como en los no seminoma, por esta razón estos marcadores tumorales no son de utilidad para diferenciar entre estos dos grandes grupos de tumores testiculares.

No existe expresión del ATC MAGE-A3 en pacientes con tumor testicular. La expresión de PRAME resultó positiva en solo un sujeto por lo que carece de utilidad para pacientes con tumor testicular.

Generalmente los pacientes que resultan con expresión de ATC, presentan solo un antígeno.

Posterior al manejo primario el 100% de los pacientes que habían presentado expresión de los ATC al seguimiento resultaron negativos a la expresión de ATC.

Los ATC son un campo innovador para el desarrollo de nuevas terapias inmunológicas, diagnóstico y seguimiento, se debe continuar con el estudio para determinar su utilidad.

BIBLIOGRAFIA

1. MacLennan Gregory T., Hinman's Atlas of UroSurgical Anatomy, Second Edition, Elsevier, Chapter 17, pg 335-344
2. Gearhart, Rink, Mouriquand, Pediatric Urology, Second Edition, Elsevier, Cryptorchidism, Capter 43, pg 563-576
3. Campbell- Walsh, Urology, Tenth Edition, Elsevier, 2011, Male genitalia, Chapter 31
4. Flores N., Huerta G., Saucedo S., Diagnóstico y Tratamiento del Tumor Maligno de Testículo en todas las edades, Guía de Práctica Clínica del Sistema Nacional de Salud. 2014. Pg 1-45
5. Chaganti RS., Houldsworth J., Genetics and Biology in Adult Human Male Germ Cell Tumor, Cancer Res. 2000 Mar 15;60(6):1475-82
6. Wood HM., Elder JS., Cryptorchidism and testicular cáncer: separating fact from fiction. J Urol 2009 Feb; 18 (12): 452-61
7. Akre O., Pettersson A., Richiardi L., Risk of Contralateral testicular cáncer among men with unilaterally undescended testis: a meta analysis. Int J Cancer. 2009 Feb 1: 124 (3): 687-9
8. Skakkebaek NE., Carcinoma in situ of the testis: frequency and relationship to invasive germ cell tumours in infertile men. Histopathology. 2002 Sep; 41(3) 5-18
9. Bosl GJ., Dmitrovsky E., Reuter VE., Samaniego F., Rodriguez E., Isochromosome of the short arm of chromosome 12: clinically useful markers for male germ cell tumors. J Natl Cancer Inst 1989 Dec 20, 81(24) 1874-8
10. Mayer F., Honecker F., Towards an understanding of the biological response to cisplatin-based chemotherapy in germ- cell tumors. Ann Oncol. 2003 Jun, 14 (6): 825-32
11. WHO Histological Classification of Testis Tumors. Epstein JL., Sesterhenn IA., Eble UN., Sauter G. 2004: 250-262
12. Guy L., Vedrine N., Exploración clínica y laboratorio de Testículo; 2008; Elsevier Masson, SAS. E- 18-601-613
13. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines), Testicular Cancer. Version 2016.
14. International Germ Cell Consensus Classification: A prognostic factor based staging for metastatic germ cell cancers. International Germ Cell Cancer Collaborative Group. J Clin Oncol 1997; 15: 594-603.
15. Albers P., Albercht W., Algaba C. Guidelines on Testicular Cancer. European Association of Urology (2015)
16. Nicolai N., Miceli R., Artusi R. A simple model for predicting nodal metastasis in patients with clinical stage I nonseminomatous germ cell testicular tumors undergoing retroperitoneal lymph node dissection only. J Urol. 2004 Jan;171(1):172-6
17. Kollmannsberger C¹, Tandstad T², Bedard PL², Cohn-Cedermark G². Patterns of relapse in patients with clinical stage I testicular cancer managed with active surveillance. J Clin Oncol. 2015 Jan 1;33(1):51-7.
18. Choueiri TK, Stephenson AJ, Gilligan T, Klein EA. Management of clinical stage I nonseminomatous germ cell testicular cancer. Urol Clin North Am. 2007 May;34(2):137-48
19. Tandstad T, Dahl O, Cohn-Cedermark G, Cavallin-Stahl E. Risk-adapted treatment in clinical stage I nonseminomatous germ cell testicular cancer: the SWENOTECA management program. J Clin Oncol. 2009 May 1;27(13):2122-8
20. Classen J., Schmideberger H., Meisner C., Winkler C., Para-aortic Irridiation for stage I testicular seminoma: results of a prospective study in 675 patients. Br J Cancer. 2004; Jun 14: 90(12): 2305-11

21. Bieri, S., et al. Seminoma of the testis: is scrotal shielding necessary when radiotherapy is limited to the para-aortic nodes? *Radiother Oncol*, 1999. 50: 349.
22. Schoffski P., et al. Health-related quality of life (QoL) in patients with seminoma stage I treated with either adjuvant radiotherapy (RT) or two cycles of carboplatinum chemotherapy (CT): Results of a randomized phase III trial of the German Interdisciplinary Working Party on Testicular Cancer. *J Clin Oncol*, 2007. 25.
23. Linley AJ., Ahmad M., Rees RC. Tumor Associated antigens: considerations for their use in tumor immunotherapy. *Int J Hematol*. 2011: 93; 263-73
24. Biermann K., Heukamp L., Steger K. Genome- wide expression Profiling Reveals New Insights into Pathogenesis and Progression of Testicular Germ Cell Tumors. *Cancer Genomics and Proteomics* 4: 359-368 (2007)
25. Hara I., Hara S., Miyake H. Expression of MAGE genes in testicular germ cell tumors. *Urology* 1999; 53: 843-847
26. Bode P., Thielken A., Brandt S. Cancer Testis Antigen Expression in Testicular Germ Cell Tumorigenesis. *Modern Pathology* (2014) 27, 899-905
27. Tseng Chen Y., Coa D., Chiu R. Chromosome X- encoded Cancer/Testis antigens are less frequently expressed in non- seminomatous germ cell tumors than in seminomas. *Cancer Immunity* (May 2013), Vol 13. P.10
28. Tseng Chen Y., Chui R., Lee P. Chromosome X- encoded cancer/testis antigens show distinctive expression patterns in developing gonads and in testicular seminoma. *Human Reproduction*, Vol. 26, No. 12 pp 3232-3243, 2011
29. Pascale S, Rajpert E., Spagnoli C. The Cancer- Testis Gene NY-ESO-1 is expressed in Normal Fetal and Adult Testes and Spermatocytic Seminomas and Testicular Carcinoma in Situ. *Laboratory Investigation*. Jun 2002. Vol. 82 (6) 775-780
30. Caballero O., Chen Y. Cancer/testis (CT) antigens: Potential targets for immunotherapy. *Cancer Sci*. Nov 2009. Vol. 100, no.11, 2014-2021
31. Tureci O., Chen Y., Sahin U. Expression os SSX genes in Human Tumors. *Int. J. Cancer*: 77, 19-23 (1998)