



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO DR EDUARDO LICEAGA

**“EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS TESTICULARES DE CÁNCER EN PACIENTES CON
LINFOMA HODGKIN Y SU CORRELACIÓN CLÍNICA”**

TESIS

PARA OPTAR AL GRADO DE ESPECIALISTA EN HEMATOLOGIA

PRESENTA

DRA LINETH MAGALY HODGSON REYES

DIRECTOR DE TESIS

DRA IRMA OLARTE CARRILLO
DR CHRISTIAN OMAR RAMOS PEÑAFIEL

CO DIRECTOR DE TESIS

DR ADOLFO TOVAR MARTINEZ

SERVICIO DE HEMATOLOGIA AGOSTO 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.

Dr. Lino E. Cardiel Marmolejo
Director de Educación y Capacitación en Salud
Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”

Dr. Juan Collazo Jaloma
Jefe del Servicio de Hematología
Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”

Dr. Christian Omar Ramos Peñafiel
Profesor Titular de Posgrado de la Especialidad de Hematología
Jefe del área clínica del Servicio de Hematología
Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”

Dra. Lineth Magaly Hodgson Reyes
Residente de Hematología
Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”

INDICE

<i>AGRADECIMIENTO</i>	
<i>DEDICATORIA</i>	
<i>RESUMEN</i>	7,8
<i>ANTECEDENTES</i>	9
<i>MARCO TEORICO</i>	12
<i>INTRODUCCION</i>	
<i>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</i>	21
<i>JUSTIFICACION</i>	22
<i>OBJETIVOS</i>	23
<i>GENERAL</i>	
<i>ESPECIFICOS</i>	
<i>HIPOTESIS</i>	24
<i>MATERIAL Y METODOS</i>	25
<i>TIPO DE DISEÑO</i>	
<i>VARIABLES DEPENDIENTE E INDEPENDIENTE</i>	
<i>CRITERIOS DE INCLUSIÓN</i>	
<i>CRITERIOS DE EXCLUSIÓN</i>	
<i>CRITERIOS DE ELIMINACIÓN</i>	
<i>POBLACIÓN DE ESTUDIO</i>	
<i>PROCEDIMIENTO PARA DETECCIÓN DE ANTIGENOS TESTICULARES DE CANCER</i>	
<i>MEDIANTE REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA</i>	26
<i>OPERACIONALIZACION DE VARIABLES</i>	30
<i>CONSIDERACIONES ÉTICAS</i>	32
<i>ANALISIS ESTADISTICO</i>	32
<i>RESULTADO</i>	33
<i>DISCUSION DE RESULTADOS</i>	40
<i>CONCLUSIONES</i>	44
<i>RECOMENDACIONES</i>	45
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	46
<i>ANEXOS</i>	51

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme vida.

A mi madre Zulema Geronima Reyes Treminio por su amor incondicional. Te amo mami.

A mi Familia por enviarme cada día sus bendiciones.

A mis amigos José Ivan, Suyen, Fátima, Olga, Arlen, Eveling, Rosalba, Jeacqueline, Jorge por darme ánimos.

A todos mis maestros, en especial al Dr. Mario Gutiérrez por haberme recibido en su sede, al Dr. Juan Collazo Jaloma jefe del área de Hematología, Dr. Christian Omar Ramos Peñafiel, por su paciencia, conocimientos brindados y por permitirme desarrollar su idea, Dra. Guadalupe León por su cariño, gracias. A Lemy por su apoyo durante estos tres años.

A los doctores Irma Olarte y Adolfo Tovar y al Equipo de Biología molecular Rafael, Adrián, Iveth, Anel por conocimientos brindados y por su apoyo en el procesamiento de cada una de las muestras.

AGRADECIMIENTOS

Al Ejército de Nicaragua a quienes agradezco beca otorgada para realización de estudios de Especialización en Hematología.

Al Gobierno de México por beca de excelencia otorgada a través de Secretaria de Relaciones Exteriores.

Este trabajo fue apoyado por CONACYT con el número de proyecto 162269 así como por la Dirección de Investigación del Hospital General de México con los números de registro DIC/09/04/03/131, DIC/08/204/04/017, DIC/12/204/05/01.

DEDICATORIA

A los Pacientes del Servicio de Hematología quienes nos brindan su confianza al poner sus vidas en nuestras manos, a ellos cuyo bienestar es el motivo de nuestra lucha diaria, de nuestro esfuerzo por ser cada día mejores médicos, mejores seres humanos.

RESUMEN

El Linfoma Hodgkin (LH) es una neoplasia que se caracteriza por infiltración linfática de células tumorales (células de Hodgkin y Reed-Sternberg) rodeadas de un infiltrado celular inflamatorio. La mayoría de subtipos se asocia con el virus de Epstein-Barr.

El estándar de tratamiento incluye el uso de quimioterapia principalmente esquema ABVD (doxorubicina, bleomicina, vinblastina y dacarbazina) con o sin radioterapia, reportándose una supervivencia de hasta un 98%.

Existen pocos marcadores moleculares que puedan identificar poblaciones con riesgo de falla al tratamiento. Los Antígenos Testiculares de Cáncer son moléculas que se expresan de forma normal en células germinales pero de forma anormal en diversas células tumorales. Se ha reportado la expresión de estos marcadores en pacientes con linfoma de Hodgkin avanzado hasta en 28% (Inaoka y col) teniendo MAGE-A y el MAGE-C1/CT7 mayor frecuencia. El investigar la expresión de Antígenos testiculares es de utilidad como marcador pronóstico en diversas neoplasias (pulmón, mama, linfoma, leucemias), siendo un blanco ideal para inmunoterapia.

En este estudio se determinó una frecuencia de expresión de los Antígenos Testiculares de Cáncer (MAGE A3) del 37.5% en un total de 24 pacientes atendidos en la clínica de linfoma Hodgkin en el Hospital general de México. no fue reportado ningún caso positivo para NYESO-1, Se realizó un análisis de correlación clínica en donde no se encontró relación estadísticamente significativa entre la presencia de los genes MAGE A3 y los parámetros clínicos para esta enfermedad, el continuar con la búsqueda de marcadores moleculares en neoplasias malignas como Linfoma Hodgkin permitirá en un futuro modificaciones tanto pronósticas como terapéuticas así como el seguimiento a pacientes como marcadores de progresión y monitoreo de respuesta.

Palabras Clave: Linfoma Hodgkin, Antígenos testiculares, Familia de genes MAGE A, Expresión de MAGE A-3, RT-PCR.

SUMMARY

Hodgkin lymphoma (HL) is a neoplasm characterized by lymphocytic infiltration of tumor cells (Hodgkin and Reed-Sternberg) surrounded by an inflammatory cell infiltrate. Most subtypes is associated with Epstein-Barr virus.

The standard treatment includes the use of chemotherapy scheme primarily ABVD (doxorubicin, bleomycin, vinblastine, and dacarbazine) with or without radiotherapy, reporting a survival of up to 98%.

There are few molecular markers that can identify populations at risk of treatment failure. Testicular Cancer Antigens are molecules of which are expressed in normal cells but germinal abnormally in various tumor cells. It has been reported the expression of these markers in patients with advanced Hodgkin lymphoma by up to 28% (Inaoka et al) having MAGE-A and MAGE-C1 / CT7 more frequently. The testicular investigate the expression of antigens is useful as a prognostic marker in various cancers (lung, breast, lymphoma, leukemia), being an ideal target for immunotherapy.

In this study a frequency of expression of testicular cancer antigens (MAGE A3) of 37.5% was determined in a total of 24 patients seen at the clinic Hodgkin lymphoma in the General Hospital of Mexico. was not it reported any positive NYESO-1 case, an analysis of clinical correlation where no statistically significant relationship between the presence of the MAGE A3 gene and clinical parameters for this disease was found was performed, continuing the search for molecular markers in malignancies such as Hodgkin lymphoma in the future will allow both prognostic and therapeutic modifications as well as monitoring patients as markers of progression and response monitoring.

Keywords: Hodgkin lymphoma, testicular antigens, MAGE A family of genes, expression of MAGE A-3, RT-PCR.

ANTECEDENTES

Han sido publicados a nivel mundial estudios de detección de MAGE en neoplasias hematológicas cabe mencionar el reporte del 2010 del Dr. Han MH y colaboradores su objetivo fue reportar la detección de células circulantes de linfoma, en pacientes con linfoma no hodgkin usando la expresión de genes MAGE A3 en sangre periférica, considerando que la expresión de genes MAGE A3 debería utilizarse como marcadores en células circulantes de linfoma, encontrando la expresión en 47.3% (45 de 95) de pacientes estudiados, no estando relacionada con supervivencia, siendo esto relativo posterior a 6 a 8 ciclos de quimioterapia hasta un 4.1%, concluyendo que la expresión de MAGE A3 es frecuente en linfoma no Hodgkin y disminuye después de quimioterapia efectiva, lo que sugiere que MAGE A3 es un marcador tumoral en Linfoma no Hodgkin, pero no confiere valor pronóstico ⁽¹⁾

Se han realizado estudios clínicos fase II en los cuales se ha utilizado inmunoterapia antígeno específica para generar una respuesta inmune en contra de MAGE A3, con el fin de erradicar la expresión de MAGE A3 por el tumor, es de mencionar el realizado en 182 pacientes con carcinoma de pulmón de células pequeñas, siendo el objetivo primario la evaluación de intervalo libre de enfermedad, con una media de seguimiento de 44 meses, observaron que en el 35% de pacientes que recibieron una vacuna basada en MAGE recombinante mostraron beneficios clínicos basados en inmunoterapia.

Otro estudio evalúa la actividad clínica de inmunoterapia basada en MAGE A3 en pacientes con melanoma metastásico, utilizado con 2 distintos estimulantes AS02B, AS15, con buen perfil de seguridad, sin reporte de eventos adversos inmunológicos hasta el momento.

Un estudio realizado en 2011 en la población Brasileña publicado en el BMC cáncer, estudiaron el patrón de expresión de antígenos testiculares en pacientes con Linfoma de Hodgkin, considerando la expresión de antígenos asociados a tumor como un blanco para inmunoterapia, aunque sea conocido la frecuencia de expresión de CT45 es menos conocido en su población la expresión de antígenos testiculares de cáncer tales como familia MAGE-A, MAGE-C1/CT7, MAGE-C2/CT10, NY-ESO1 y familia GAGE y lo relacionaron con pronóstico adverso ellos encontraron en 38 pacientes estudiados una expresión de 21.1%, siendo 18% correspondiente a familia MAGE-A y 13.2% MAGE.C1/CT7, asociándolo a estadio avanzado, sin diferencia significativa.

En la unidad de Hematología del Hospital General de México en 2005 fue realizado y publicado por Dra. Rozzen Fuller E. un estudio que analizaba la expresión de Gen MAGE

A y su correlación pronóstica en leucemia aguda linfoblástica, fueron evaluados un total de 47 pacientes no pudiendo integrar en aquella ocasión una relación pronóstica entre dicha patología y la presencia de MAGE A 3.

En la unidad de Hematología del Hospital General de México en 2007 fue realizado y publicado por Dra. Olarte I y colaboradores un estudio sobre la expresión de MAGE A3 como factor pronóstico adverso en pacientes con linfoma de células B difuso de células grandes, fueron evaluados 28 pacientes observando una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de MAGE A3 con estadios avanzados de la enfermedad, altos niveles de LDH, pobre respuesta al tratamiento y menor supervivencia. ⁽²⁾

Una evaluación similar fue realizada por I. Mendoza Salas y colaboradores en 2015 quienes estudiaron la frecuencia de los antígenos testiculares de cáncer en leucemia mieloide crónica (LMC), con un total de 10 muestras de individuos sanos y 65 muestras de médula ósea de pacientes con LMC reportando una presencia de MAGE A3 de 32.3%, siendo mayor la presencia de MAGE A4 hasta un 63%. ⁽³⁾

El campo de la inmunoterapia se ha vuelto muy activo en los últimos años, MAGE-A3 se considera como un antígeno asociado a tumor prometedor para la orientación selectiva de las células malignas con la inmunoterapia.

Los antígenos asociados a tumor, antígeno asociado a melanoma MAGE A3 fueron los primeros antígenos asociados a tumor en ser específicamente reconocidos por los linfocitos TCD8, estos antígenos no se expresan en tejido normal. ⁽⁴⁾

El gen *mage a-3* codifica un antígeno presente en un alto porcentaje de tumores, principalmente en melanomas, y ha sido uno de los más importantes blancos inmunológicos en el desarrollo de terapias contra el cáncer; este antígeno posee epítopes capaces de ser presentados por moléculas HLA I y HLA II.

Existe una vacuna que contiene la proteína recombinante *mage a3* unida a la proteína D de *Haemophilus influenzae* como acompañante de fusión y *as02b* (monofosforil lípido a-qs21) como adyuvante; esta vacuna ha demostrado aumentar la supervivencia libre de enfermedad en pacientes postquirúrgicos con melanoma estadio II y se encuentra actualmente en estudio clínico fase III.

Se menciona también la utilidad de la inmunoterapia en pacientes con mieloma múltiple posterior a trasplante, utilizando inmunización con MAGE A3/Poly-ICLC seguido de transferencia adoptiva de células T autólogas de vacunas preparadas y coestimuladas. Esto correspondió a un ensayo clínico fase II, donde combinaba una vacuna multipéptido

MAGE-A3 (compuesto GL-0817) con poli-ICLC (Hiltonol) , macrófagos y granulocitos factor estimulante de colonias (GM-CSF) ± Montanide. Las infusiones de células T fueron bien tolerados, reacciones del sitio de inyección de la vacuna se produjeron en > 90% de los pacientes, la supervivencia global a 2 años fue del 74% [intervalo de confianza del 95% (IC), el 54% -100%] y 2 años de supervivencia libre de eventos fue del 56% (IC del 95%, 37% -85%). Se concluyó en este caso una alta frecuencia de respuestas de células T en la vacuna específica se generaron después del trasplante mediante la combinación de células T autólogas coestimuladas con una vacuna MAGE-A3-poli ICLC más factores estimulantes de crecimiento de granulocitos y macrófagos. ⁽²⁸⁾

MARCO TEORICO

INTRODUCCION

El Linfoma Hodgkin (LH) es una neoplasia caracterizada por la infiltración linfática de células tumorales [células de Hodgkin (CH) y Reed-Sternberg (HRS)] rodeada de un infiltrado celular inflamatorio compuesto de células plasmáticas, eosinófilos e histiocitos⁽⁵⁾.

No están claramente definidos los factores para desarrollar esta enfermedad y la causa, continúa siendo no conocida, se han observado factores asociados tales como factores familiares, inmunosupresión y exposición a virus, en la mayor parte de los subtipos de Linfoma Hodgkin existe genoma del virus de Epstein-Barr (EBV)⁽⁶⁾, su relación es principalmente influir en la reprogramación así como en la regulación de diferentes vías de señalización celular implicadas con la activación del Factor Nuclear-kB. Otras enfermedades infecciosas en las que podemos mencionar varicela, sarampión, rubeola, tos ferina, se asocian negativamente con el riesgo de linfoma Hodgkin y son posiblemente de protección. También hay una asociación con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) en que los pacientes infectados por el VIH, tienen un riesgo significativamente mayor de linfoma Hodgkin en comparación con la población general, Asociándose el HIV con estadios avanzados, sitios inusuales de presentación y pobre tasa de respuesta al tratamiento.

En cuanto a manifestaciones clínicas la mayoría de pacientes se presenta al diagnóstico con linfadenopatías supra diafragmáticas, están comúnmente presentes las adenopatías cervicales, mediastinales anteriores, supraclaviculares y nódulos linfáticos axilares, debe considerar que es poco frecuente el involucro de adenopatías inguinales. Un tercio de pacientes presenta síntomas sistémicos tales como fiebre, sudoración nocturna y pérdida de peso y muchos pacientes también presentan prurito crónico. A menudo la enfermedad puede involucrar grupos linfáticos contiguos, puede también afectar tejido extranodal por invasión directa o por diseminación por vía hematógena, los sitios extra nodales, más comúnmente involucrados son bazo, pulmón, hígado y medula ósea.

El diagnostico debe realizarse por biopsia excisional del tejido linfático afectado, esta nos permitirá de forma adecuada evaluar la arquitectura del ganglio linfático.

La estratificación de riesgo en estadios de la enfermedad es crítica para la selección de la terapia apropiada. El sistema de estadios está basado en la zona involucrada de nódulos linfáticos, uno o más o ambos lados del diafragma , el número de sitios involucrados, la

presencia de una masa Bulky, involucro extranodal contiguo, síntomas sistémicos (síntomas B presentes).

Estadio	Grupos pronósticos
I	<p>Compromiso en un solo sitio linfático (es decir, región ganglionar, anillo de Waldeyer, timo o bazo) (I).</p> <p>Compromiso localizado de un solo órgano extra linfático o sitio en ausencia de cualquier compromiso con ganglio linfático (IE) (poco común en el linfoma de Hodgkin).</p>
II	<p>Compromiso de ≥ 2 regiones de ganglios linfáticos del mismo lado del diafragma (II).</p> <p>Compromiso localizado en un solo órgano o sitio extra linfático en relación con un compromiso de ganglio linfático regional con compromiso de otras regiones de ganglios linfáticos del mismo lado del diafragma o sin este (IIE).</p> <p>El número de regiones comprometidas se pueden indicar mediante un número arábico, como por ejemplo, II₃.</p>
III	<p>Compromiso de regiones de ganglios linfáticos a ambos lados del diafragma (III), lo cual también podría verse acompañado por una extensión extra linfática en relación con un compromiso de ganglio linfático adyacente (IIIE) o por compromiso del bazo (IIIS) o ambos (IIIE, S).</p> <p>El compromiso esplénico se designa mediante la letra S.</p>
IV	<p>El compromiso difuso o diseminado de uno o más órganos extra linfáticos, relacionado con compromiso de ganglio linfático relacionado o sin este.</p>

Estadio	Grupos pronósticos
	<p>Compromiso de órgano extra linfático aislado en ausencia de compromiso con ganglio linfático regional adyacente pero en conjunción con enfermedad en sitio o sitios distantes.</p> <p>El estadio IV incluye cualquier compromiso del hígado o la médula ósea, pulmones (aparte de por extensión directa de otro sitio), o líquido cefalorraquídeo.</p>

En relación con la terapia inicial adaptada al riesgo, los principales factores para determinar la terapia inicial son el tipo histológico (Linfoma Hodgkin clásico, linfoma Hodgkin con predominio de linfocitos), estadio anatómico de la enfermedad (limitado o enfermedad avanzada), la presencia de características de pobre pronóstico, así como síntomas constitucionales, y masa Bulky (mayor a 10 cm de diámetro). El PET CT juega un roll importante en la decisión de terapia completa o de adicionar u omitir parte de la terapia. Un estudio positivo después del segundo ciclo de tratamiento puede resultar en intensificación de la terapia, un estudio positivo al final del tratamiento puede resultar en la adición de radioterapia de consolidación a los sitios positivos, incluso puede ser considerado hasta repetir la biopsia para confirmar o excluir una enfermedad persistente. ⁽⁷⁾

En la segunda mitad del siglo pasado la notable mejoría en los resultados generales de la terapéutica se ha convertido en un ejemplo de los éxitos de la oncología moderna. A finales de los años 50, incluso se reportó la curación con la radioterapia, la cual fue establecida para los años 70 como el tratamiento de la enfermedad localizada.

Durante la década de los 60 se demostró que la utilización de varios agentes quimioterapéuticos (mecloretamina, vincristina, procarbina, prednisona) combinados en un esquema (MOPP) era posible la erradicación de la enfermedad diseminada.

En los años 70 se consolidó la utilización del MOPP; se realizaron diversas modificaciones a este esquema con el objetivo de mantener su eficacia y reducir los efectos tóxicos, y se introdujo la combinación AVBD (adriamicina, bleomicina, vinblastina, dacarbazina) como un esquema de rescate, ya en los años 80 este esquema se utiliza como tratamiento de primera línea, objetivo aplicar muchas drogas en un corto periodo de tiempo y así reducir el desarrollo de la resistencia tumoral.

Una nueva era ha estado marcado por la última generación de los regímenes de múltiples fármacos intensificados como Stanford V, ChIVPP / EVA (clorambucil, vinblastina, procarbazona y prednisona / etopósido, vincristina y doxorubicina), MEC (meclorothamine, CCNU, vindesina, Alkeran , prednisona, epidoxorubicina, vincristina, procarbazona, vinblastina y bleomicina), y BEACOPP (bleomicina, etopósido, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, procarbazona y prednisona) que fueron introducidos para el tratamiento de Linfoma Hodgkin en estadio avanzado en la década del 90.

El estándar de tratamiento actual incluye el uso de quimioterapia basadas principalmente en el esquema ABVD (doxorubicina, bleomicina, vinblastina y dacarbazina) con o sin radioterapia (RT) 20 – 30 Gy, consiguiendo tasas de supervivencia del 98%. Otros esquemas (BEACOPP) han mostrado resultados semejantes al esquema AVBD-RT, pero mostrando una mayor toxicidad ⁽⁸⁾.

Existe una desventaja importante que pone en riesgo los logros clínicos: la toxicidad tardía resultante de la terapia. Al parecer, después de 20 o 30 años, los pacientes tienen un mayor riesgo de morir a causa de la toxicidad más que del linfoma Hodgkin. Las principales toxicidades finales asociadas al tratamiento son las neoplasias malignas secundarias (especialmente cáncer sólido, tal como cáncer de pulmón y cáncer de mama, leucemia mieloide y el síndrome mielodisplásico) y las enfermedades cardiovasculares (especialmente insuficiencia del ventrículo izquierdo y la enfermedad de las arterias coronarias).

La supervivencia global de los pacientes tratados es buena, lo que demuestra que incluso los pacientes con estadios avanzados de la enfermedad se pueden curar en un alto porcentaje. Incluso para el caso de una recaída, los pacientes con linfoma Hodgkin se pueden recuperar mediante la quimioterapia de alta dosis y trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos.

Se han utilizado parámetros de laboratorio que reflejen la carga tumoral en linfoma de Hodgkin la lactato deshidrogenasa, es el parámetro de laboratorio que refleja la carga tumoral más fielmente, teniendo una relación lineal, a mayor valor, mayor tamaño del linfoma.

Diversas variables se han utilizado para predecir el pronóstico e identificar de forma temprana poblaciones con riesgo de falla terapéutica, Hasenclever y colaboradores diseñaron un índice pronóstico el cual utilizaba diversos parámetros clínicos y bioquímicos (albúmina < 4g/dL, estadio IV, edad > de 45 años, hemoglobina < 10.5g/dl, leucocitos > 15 x 10³/μl y linfopenia, género masculino) estratificando el pronóstico acorde al número de factores implicados (supervivencia libre de progresión a 5 años de acuerdo

con el número de factores de riesgo: 0 factor: 84%, 1 factor: 77% , 2 factores: 67% , 3 factores: 60% , 4 factores: 51% , 5 factores: 42%.

Estudios de imagen como la tomografía por emisión de positrones (PET-CT) es actualmente la mejor herramienta tanto para evaluar la respuesta como el monitoreo del tratamiento ⁽⁹⁾.

En cuanto a respuesta al tratamiento, se considera Remisión completa (RC) en pacientes con linfoma de Hodgkin aquellos pacientes que cuentan con 1) Ausencia de cualquier evidencia clínica de enfermedad o síntomas relacionados posterior al tratamiento , 2) Presencia de un PET-scan negativo al término del tratamiento, 3) En aquellos pacientes con un PET-scan negativo previo al tratamiento la presencia de crecimientos ganglionares los cuales hayan regresado a la normalidad (< 1.5 cm en su eje transversal para aquellos ganglios linfáticos con > de 1.5cm previo al inicio de tratamiento). 4) Bazo o Hígado no palpables y con estudios de imagen negativos (Tomografía Axial Computada) posterior al tratamiento.

Se define como Remisión Parcial (RP) a la reducción del más del 50% de la tumoración inicial sin aumento de los ganglios afectados y un PET-scan positivo al final de tratamiento. La enfermedad estable se considera en aquellos pacientes sin RC o RP, pero sin la aparición de nuevos ganglios linfáticos. La progresión o recaída se considera en aquellos casos que cursan con nuevas lesiones o que aumentaron > 1.5 veces su tamaño en cualquier eje con un PET-scan positivo.

A pesar de los avances en los estudios de imagen existen pocos marcadores moleculares que puedan identificar poblaciones con riesgo de falla al tratamiento.

CELULAS CIRCULANTES DE TUMOR

El evento de aparición de enfermedad metastásica en los tumores sólidos es el responsable del 90% de las muertes relacionadas con los cánceres. El cuerpo de conocimiento actual respecto al proceso de diseminación hematológica tumoral sugiere que los clones de células cancerosas que atraviesan el endotelio circulan por el torrente circulatorio hasta que, o son eliminadas por los mecanismos de respuesta inmune, o encuentran en un microambiente apropiado en el que residir en un estado latente y eventualmente adquirir la capacitación para proliferar en un momento posterior. Por tanto, implícito al concepto de metástasis se integra el proceso de generación de células tumorales circulantes (CTC) que atraviesan la circulación y colonizan los órganos distantes. Esta capacidad de metástasis de los tumores sólidos a un sitio distante ha sido muy bien descrita en los linfomas

Las células circulantes de tumor deberán superar varias fases antes de producir colonias de metástasis:

1. extravasarse de la circulación a los órganos diana.
2. proliferar.
3. Evadir la respuesta inmunológica tisular.
4. Superar las dificultades metabólicas.

De hecho, se estima que sólo una de cada 10.000 CTC está capacitada para formar una metástasis.

Se considera la utilidad clínica de las células circulantes de tumor ya que estas se encuentran fácilmente disponibles en sangre periférica.

La determinación de CTC ayudaría extraordinariamente a estudiar aspectos fundamentales en lo referente al diagnóstico como a la estadificación y al pronóstico.

La determinación de CTC en los laboratorios clínicos es un anhelo insatisfecho durante muchísimo tiempo, la complejidad en su detección se debe a su escasa presencia en el torrente sanguíneo, los métodos de detección de CTC basados en el ADN libre circulante, RT-PCR, o mejor RT-PCR cuantitativa, muestran una mayor sensibilidad que los basados en la citometría.

ANTIGENOS TESTICULARES DE CANCER

Los Antígenos Testiculares de Cáncer (CTAs) son moléculas que se expresan de forma normal en células germinales pero de forma anormal se expresan en diversas células tumorales ⁽¹⁰⁾. Los antígenos MAGE-A fueron identificados inicialmente en melanoma, los genes de esta familia, se encontraron en una variedad de cánceres a pesar de que su expresión estaba limitada a células germinales de testículo, ovario y placenta.

Todos los genes de la familia MAGE-A tienen una proteína codificada por un solo exón precedidos por varios exones no codificantes, estos genes están codificados en el cromosoma X y pertenecen al denominado grupo MAGE clase I, debido a lo anterior se les han atribuido funciones similares.

Muchos de ellos como MAGE-C2/CT10 se han implicado en la recurrencia y falla al tratamiento. Recientemente Inaoka y colaboradores reportaron en 38 muestras de Linfoma Hodgkin la expresión de diversos antígenos testiculares presentando una mayor expresión en aquellos pacientes con enfermedad avanzada (28.6%). La expresión de los genes de la familia MAGE-A y el MAGE-C1/CT7 fueron los que se expresaron con mayor frecuencia ⁽¹²⁾.

En las últimas décadas se ha demostrado ampliamente que las células cancerosas pueden ser reconocidos (y en circunstancias seleccionadas incluso eliminado) por el sistema inmune del huésped. El antígeno asociado a tumor (TAA) de la familia antígeno de melanoma A3 (MAGE-A3) fue el primer antígeno asociado a tumor humano encontrado para ser reconocido específicamente por las células T CD8 +. MAGE-A3, acoplados al CPH clase I. La ausencia de la expresión en tejidos normales asegura una respuesta inmune contra el tumor, la expresión en tejidos normales, asegura una respuesta inmune contra el tumor, la expresión en tejidos normales está restringida a células germinales masculinas de la fase temprana de la espermatogénesis, específicamente en espermatogonia y espermatocito primario.

Existen más de 100 antígenos testiculares de cáncer reportados en la literatura mundial, pero las funciones biológicas de la mayoría son desconocidas, recientes estudios proveen alguna evidencia de que tienen propiedades antiapoptóticas, en lugar de la regulación de la proliferación celular o la adherencia en el cáncer y podría explicar la persistencia de la enfermedad residual mínima en algunos tumores malignos incluso en el linfoma Hodgkin donde la cura potencial es muy alta.

Estos antígenos testiculares de cáncer están clasificadas de acuerdo con el nivel de conservación de la secuencia central de aminoácidos en dos tipos: mage tipo I, al que pertenecen los subgrupos mage-a, mage-b y mage-c, que se expresan en células tumorales de pulmón, cabeza, cuello, vejiga, mama, cáncer gástrico y colorrectal, entre otros; y mage tipo II, al que pertenecen los subgrupos mage-d, mage-e, mage-f, mage-g, mage-h, mage-l2 y Necdin, que son codificadas por genes presentes en los cromosomas X, 3 y 15 y que se expresan en algunos tejidos normales y su función está relacionada con procesos de ubiquitinación de proteínas.

La frecuencia de expresión es altamente variable en diferentes tipos de tumor, son considerados tumores con alta expresión de los antígenos por ejemplo el melanoma, cáncer de ovario, cáncer pulmonar, mientras algunas malignidades hematopoyéticas, riñón, colon y cáncer de páncreas son considerados tumores con baja frecuencia de expresión de dichos antígenos.

Ha sido reportada en relación con las malignidades hematológicas alguna excepción, por ejemplo en el mieloma múltiple donde la expresión del antígeno CT7/MAGE-C1 es alta, y en linfoma Hodgkin la expresión de CT45.

Otros antígenos testiculares de cáncer son los genes BAGE, GAGE, LAGE y NY-ESO-1, estos junto con el MAGE codifican para los antígenos que son reconocidos en diversas

células transformadas neoplásicamente por linfocitos T CD8 (+) autólogos, citolíticos. de los antígenos testiculares se ha demostrado la presencia de BAGE en pacientes con cirrosis (29,33,39)

El antígeno testicular de cáncer el NY-ESO-1, es considerado como uno de los antígenos más inmunogénicos aislado, induce respuestas inmunes espontáneas del huésped en el 50% de los pacientes con neoplasias que lo expresan. (34,35)

NY-ESO-1 es otro de los antígenos asociados a tumor considerado importante candidato para inmuno-terapia; su expresión ha sido evidenciada por RT-PCR de mRNA en el 30 % de los cánceres de pulmón, vejiga y melanomas, 42 % de tumores de mama y 65 % de carcinomas medulares de tiroides, entre otros.

La frecuencia de anticuerpos anti-NY-ESO-1 en sueros de pacientes con tumores que expresan este gen es del 25 al 50 % y se ha observado una relación directa entre la evolución del tumor y el título de estos anticuerpos. La presencia de anticuerpos en sueros de pacientes con tumores NY-ESO-1 positivos demuestra la capacidad de este antígeno para inducir una respuesta inmunológica mediada por linfocitos CD4⁺ y CD8⁺. (31,32)

El antígeno NY-ESO-1 ha sido utilizado en diversas inmunoterapias contra el cáncer. Observándose una importante reacción humoral y celular en pacientes con melanoma maligno a quienes se inyectó intradérmicamente la proteína recombinante NY-ESO-1 (36).

Su inmunogenicidad excepcional, junto con su amplia distribución entre muchos tipos de cáncer lo hace un muy buen candidato a vacuna, con el potencial de ser utilizado en las vacunas contra muchos tipos de tumores malignos. (34, 35,36)

Las funciones de estos genes aún no están del todo descifradas pero en investigaciones realizadas se ha demostrado su relación con ciclos de proliferación y apoptosis en las células tumorales.

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN MAGE

La forma en la que se regula su expresión es a través de un mecanismo de metilación, este fue descrito en la línea celular de melanoma MZ2 MEL que expresa MAGE A1 (12)

La expresión de las proteínas mage tipo I, al igual que la de otros antígenos testiculares de cáncer, está inhibida en el tejido normal por mecanismos epigenéticos de represión transcripcional por hipermetilación del gen promotor; diversos autores han demostrado que la acetilación a nivel de las histonas y la desmetilación del DNA juegan un papel

importante en la expresión de estas proteínas en las células tumorales. A nivel funcional mage-Actúa como inhibidor de p53, al interferir con su función de regulador transcripcional de genes relacionados con la reparación o eliminación apoptótica de células dañadas, favoreciendo la formación del tumor.

LOCALIZACIÓN DEL GEN MAGE

Los genes de la familia MAGE fueron descritos por De Plaen y cols en 1991 en melanoma en donde según sus reportes tienen una frecuencia del 60% para esta neoplasia, Se encuentran localizados en el cromosoma X en la región q28 (genes MAGE A), p21.3 (MAGE B), q26 (MAGE-C), y p11 (MAGE-D).⁽¹⁴⁾

Los antígenos testiculares de cáncer más frecuentemente expresados en tumores son mage a1, mage a3, ny-eso-1, ssx-2 y ssx-4.

FAMILIA MAGE A

Comprende 12 genes que comparten una identidad de 60 a 98% en su secuencia codificante, localizados enteramente en el último exón, codifican proteínas de 300 a 370 aminoácidos, con un peso molecular de 46 KDa, siete genes MAGE A se encontraron expresados en una gran porción de tumores de varios orígenes histológicos (MAGE A1, A2, A3, A4, A6, A10, A12). Se ha reportado la identificación del gen MAGE A-3 a nivel citoplasmático y a nivel nuclear.⁽¹⁵⁾

Entre los principales tumores en los que se ha reportado la expresión de Gen MAGE se encuentran cáncer de pulmón, carcinoma gástrico, carcinoma de esófago, carcinoma hepatocelular, cáncer mamario, carcinoma colorectal, cáncer de ovario, linfoma, mieloma entre otros.⁽¹⁶⁾

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México se espera para 2020 un total de 1837 nuevos casos de Linfoma Hodgkin, la sobrevida esperada a cinco años para estos pacientes es mayor al 80%; el estadio clínico al diagnóstico, la edad del paciente, la respuesta al tratamiento, la recaída tras la primera línea, la toxicidad de los fármacos, la aparición a largo plazo de segundas neoplasias, son puntos en consideración al evaluar el pronóstico de estos pacientes.

Actualmente el mayor entendimiento de la inmunogenicidad del tumor y la dinámica de sus relaciones con el sistema inmunológico ha permitido el desarrollo de terapias contra el cáncer basadas en el uso de anticuerpos o en el diseño de vacunas, en las que el descubrimiento y detallado conocimiento de los antígenos asociados a tumor juega un papel fundamental. Sin embargo, en la mayoría de estas terapias solo ha sido posible un aumento en la sobrevida de los pacientes.

En búsqueda de Antígenos Asociados a tumor han sido evaluados marcadores en diferentes neoplasias, muy pocos de estos marcadores moleculares han demostrado identificar poblaciones con riesgo de falla al tratamiento, dentro de este grupo de marcadores los antígenos testiculares de cáncer son moléculas que se expresan de forma normal en células germinales pero de forma anormal en diversas células tumorales, siendo reportada la expresión de estos en melanoma, cáncer de pulmón , mama, leucemias y linfomas. La identificación de varios antígenos asociados a tumor ha permitido el desarrollo de modernas vacunas antitumorales, las que se encuentran en etapa de experimentación.

No se conoce la expresión de este marcador molecular en nuestra población y si es de utilidad pronostica, nos hemos planteado el identificar al mismo y evaluar su utilidad en nuestra población , nos planteamos la siguiente pregunta de investigación ¿Cuál es la expresión de antígenos testiculares de cáncer (MAGE A3) en pacientes con Linfoma Hodgkin y su correlacion clínica en pacientes atendidos en el servicio de hematología en el periodo comprendido entre Diciembre del 2000 a Diciembre 2015 en el Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga?

JUSTIFICACION

Diversas variables se han utilizado para predecir el pronóstico e identificar de forma temprana poblaciones con riesgo de falla terapéutica en pacientes con linfoma de Hodgkin, Hasenclever y colaboradores diseñaron un índice pronóstico el cual utiliza diversos parámetros clínicos y bioquímicos, estratificando el pronóstico acorde al número de factores implicados. Estudios de imagen como la tomografía por emisión de positrones (PET-CT) es actualmente la mejor herramienta tanto para evaluar la respuesta como el monitoreo del tratamiento. A pesar de los avances en los estudios de imagen existen pocos marcadores moleculares que puedan identificar poblaciones con riesgo de falla al tratamiento o recaída.

Se han descrito los antígenos asociados a tumor de estos los antígenos testiculares del cáncer son los que se han reportado con mayor frecuencia mencionando cifras de expresión de hasta un 28%, la familia de Genes MAGE son los más frecuentes, estos marcadores moleculares han sido demostrados a nivel internacional como marcadores pronósticos y de evolución en enfermedades malignas tales como cáncer de pulmón , cáncer de mama, leucemias y linfomas, sin embargo aún se desconoce la frecuencia y la relación que pudieran tener estos genes en la población Mexicana en pacientes con enfermedad de Hodgkin, pretendemos con este estudio, conocer la expresión de este Gen (MAGE A3) en nuestra población de pacientes con Linfoma Hodgkin, teniendo en cuenta la utilidad pronostica de la expresión de estos antígenos testiculares en este grupo de pacientes.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia de expresión de los antígenos testiculares de cáncer y su correlación con la clínica en pacientes con linfoma Hodgkin diagnosticados en la clínica de linfoma Hodgkin del Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Describir características demográficas del grupo de estudio (edad, género)
2. Describir características clínicas de valor pronóstico en el grupo de estudio (estadio clínico, tratamiento recibido, escala de Hansenclever, PET final de tratamiento, inmuno histoquímica).
3. Identificar la presencia de MAGE A3 y NY-ESO 1 en el grupo de pacientes incluidos en este estudio.
4. Correlacionar presencia de MAGE A3 y NY-ESO 1 factores pronósticos de pacientes con linfoma Hodgkin.

HIPOTESIS

Han sido publicados a nivel mundial estudios de detección de MAGE y NY-ESO1 en neoplasias hematológicas siendo la expresión de estos, cifras desde 20% hasta 47%, en linfoma no Hodgkin por ejemplo se han reportado cifras más altas, considerado la utilidad de estos marcadores en células circulantes, de forma semejante se ha reportado la expresión de estos marcadores en diferentes neoplasias sólidas como el sarcoma, tumor de mama y pulmón.

En linfoma Hodgkin la frecuencia de expresión del antígeno testicular de cáncer (MAGE A3) es alrededor del 21% y se ha asociado a estadios avanzados y peor pronóstico. En la Unidad de Hematología del Hospital General de México se realizan desde el 2005 análisis de la expresión de los genes MAGE A3 y NY-ESO1, en diferentes neoplasias mencionando leucemia mieloide crónica, linfoma no Hodgkin, Leucemia linfoblástica aguda, no conocemos aun la expresión de dichos marcadores en Linfoma Hodgkin, es objetivo de este estudio el determinar la frecuencia de los mismos en nuestra población, siendo nuestra hipótesis: Si encontramos la expresión de los antígenos testiculares de cáncer (MAGE A3, NY-ESO1) en pacientes con linfoma Hodgkin entonces podría estar relacionado con recaídas y falla al tratamiento a corto tiempo de seguimiento.

MATERIAL Y METODOS

TIPO DE DISEÑO

Se realizó un estudio de tipo Analítico, Experimental, Ambispectivo y Transversal

VARIABLES

Variables independientes: Expresión de MAGE A3 y NY-ESO1

Variable dependiente: Variables de pronóstico clínico (Estadio clínico, respuesta a tratamiento, recaída)

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1. Pacientes mayores de 16 años.
2. Con diagnóstico de Linfoma Hodgkin basado en estudio histopatológico del ganglio linfático, corroborado mediante inmuno- histoquímica (marcadores Cd15, Cd30, Cd 45, Cd20 y EBV) en el periodo señalado.
3. Pacientes que acepten toma de muestra de sangre periférica para el estudio.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

1. Pacientes diagnosticados con linfoma Hodgkin que no se hayan dado seguimiento en nuestro centro.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

1. Material insuficiente para la expresión del genes

CONTROLES POSITIVOS

Tejido Testicular

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.

Línea Celular

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 cultivó 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.

CONTROL NEGATIVO

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.

POBLACIÓN DE ESTUDIO

El universo correspondió a un total de 70 pacientes atendidos en la clínica de Linfoma Hodgkin del Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga en el periodo de Diciembre del año 2000 a Diciembre del año 2015, la muestra fue elegida por conveniencia, siendo incluidos un total de 24 pacientes, a los cuales se les tomo muestra de sangre periférica previo consentimiento informado.

El procedimiento de separación de células mononucleares, aislamiento de mRNA integridad, pureza y cuantificación del RNA, detección de los antígenos testiculares de cáncer mediante reacción en cadena de la polimerasa, fue realizado por expertos en biología molecular del área de laboratorio de biología molecular del Hospital General de México. A continuación se detalla la técnica utilizada:

SEPARACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES

Fundamento: Es una técnica de centrifugación por gradiente de densidad para separar las células mononucleares (linfocitos, monocitos, blastos, etc.) de otras células de la sangre. Durante la centrifugación se van formando varias capas, el sedimento que está formado principalmente por granulocitos y eritrocitos ha migrado a través del gradiente de densidad que es mayor al del ficoll, la parte superior está constituida por ficoll, le continua una capa en la interfase que corresponde a las células mononucleares (linfocitos, monocitos, blastos) y finalmente la capa del plasma.

La separación de células se realiza utilizando el reactivo Ficoll el cual tiene una densidad de 1.077 g/cm³ este separa las células en fases plasma, células mononucleares, ficoll, eritrocitos respectivamente.

Las muestras de sangre periférica de pacientes con linfoma Hodgkin se trataron con el siguiente procedimiento:

En un tubo de 15,0 mL se realizó una dilución 1:2 de la sangre total con PBS 1X (Phosphate Buffer Solution). En otro tubo limpio se agregaron 3,0 mL de ficoll y se vertió lentamente la dilución de sangre procurando no mezclar las fases. Se centrifugó a 140 g durante 30 min. Se separó la capa de las células mononucleares y se pasaron a un tubo nuevo de 15 mL el cual contenía PBS 1X. Se lavaron las células a 250 g durante 7 min. Se

decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron nuevamente con PBS 1X. Se transfirieron las células a tubos eppendorf de 1,5 mL. Una vez aisladas y lavadas las células mononucleares se almacenaron a -80°C hasta el momento del análisis por RT-PCR.

AISLAMIENTO DE mRNA

El RNA aislado se obtuvo por lisis alcalina utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen).

FUNDAMENTO: Las células son lisadas con el reactivo Trizol el cual contiene fenol e isotiocianato de guanidina los cuales solubilizan las células, lisan la membrana plasmática y las proteínas pasan de su estado nativo a desnaturalizado conduciendo a un ácido nucleico intacto.

El procedimiento fue el siguiente:

Se adicionó 1,0 mL del reactivo Trizol a la muestra. Se lisaron las células mediante agitación constante. Se incubaron durante 10 min en hielo. Una vez lisadas las células se adicionaron 200 μL de cloroformo y se agitó hasta mezclar las fases. Se dejó reposar durante 5 min en hielo. Nuevamente se mezcló y se centrifugó a 9000 g durante 15 min. Se recuperó la fase acuosa y se transfirió a un tubo eppendorf nuevo de 1,5 mL. Posteriormente se adicionaron 500 μL de etanol absoluto y se mezcló por inversión. Se dejó incubando toda la noche a -20°C ., al terminar la incubación se centrifugó a 9000 g durante 15 min. Se decantó el sobrenadante, se observó un “pellet” blanco el cual corresponde al RNA. Se adicionó etanol al 75% y se mezcló por inversión 5 veces para después centrifugar a 2600 g durante 6 min. Se decantó el sobrenadante y se dejó secar el remanente de etanol colocando el eppendorf boca abajo y procurando que el “pellet” no quede totalmente seco. Se adicionaron de 10-40 μL de agua inyectable según el tamaño del “pellet” y se alineó el RNA a 70°C . Una vez alineado se guardó a -80°C .

INTEGRIDAD, PUREZA Y CUANTIFICACIÓN DEL RNA

INTEGRIDAD

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

Procedimiento:

Se pesaron 0,3 grs de agarosa. Se disolvieron en 30 mL de TAE 1X. se calentó hasta completa disolución. Se dejó enfriar un poco y se adicionaron 5 μL de bromuro de etidio. Se vació el contenido en el molde para gel y se dejó solidificar.

La cámara de electroforesis se llenó con TAE 1X. Para cargar las muestras en los pozos del gel se tomaron 2 μL de RNA y se diluyeron con 2 μL de Loading Buffer.

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

CUANTIFICACIÓN Y PUREZA

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

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

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

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

Pureza = A260nm/ A280nm

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

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

DETECCIÓN DE LOS ANTIGENOS TESTICULARES DE CANCER MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.

Síntesis de cDNA

El cDNA de los donadores sanos, 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.

Para la PCR se utilizó 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.

Los primers para los genes MAGE-A3 y NY-ESO fueron descritos en Olarte , 2012. La misma secuencia de primers se utilizó para amplificar las muestras de los pacientes del HGM. Como control se utilizó el gen constitutivo GAPDH. La secuencia de los primers utilizados así como la longitud esperada del producto de PCR se muestra en la Tabla 1

La estandarización se llevó a cabo utilizando diversas concentraciones de primer, así como de temperaturas de alineación, dicha estandarización se llevó a cabo con tejido testicular, y la línea celular K562 los cuales son los controles positivos.

La misma amplificación se corroboró en los donadores sanos en donde no existió amplificación de los genes.

Tabla 1. Secuencia de Primers

MAGE A3	A3 FORWARD	TGGAGGACCAGAGGCCCC
	A3 REVERSE	GGACGATTATCAGGAGGCCTGC
Longitud 725 pares de bases.		
Condiciones:		
	96 °C - 1 min.	
	60 °C - 45 segundos.	
	72 °C - 1 min.	
	30 ciclos.	
NYESO-1	NY-ESO 1 FORWARD	CCCCACCGCCTCCCGTG
	NY-ESO 1 REVERSE	CTGGCCACTCGTGCTGGGA
Longitud 307 pares de bases		
Condiciones:		
	96 °C - 1 min.	
	67 °C - 45 segundos.	
	72 °C - 1 min.	
	30 ciclos.	

DEFINICIÓN OPERACIONAL DE LAS VARIABLES

VARIABLE	DEFINICION OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICION	VALORES
Genero	Conjunto de peculiaridades que caracterizan los individuos de una especie dividiéndolos en masculino o femenino	Cualitativa	Nominal (dicotómica)	Femenino Masculino
Edad	Tiempo que ha vivido el paciente desde el nacimiento hasta el momento del diagnostico	cuantitativa	continua	Menor de 28 28-48 Mayor de 48 años
Clasificación del linfoma Hodgkin (estirpe)	Clasificación histológica, del linfoma Hodgkin, en base a la modificación de la OMS.	Cualitativa	politómica	1. Nodular con predominio linfocitario 2. Clásico: Esclerosis nodular, Celularidad mixta, Rico en linfocitos Depleción linfocitaria
Inmuno histoquímica de Linfoma Hodgkin	Procedimiento histopatológico que permite identificar antígenos presentes en las células, para identificar a que tejido pertenece, en este caso a que variedad de linfoma Hodgkin corresponde.	Cualitativa	politómica	CD30 CD15 CD45 CD20 VEB
Estadio clínico	Características que permiten definir la localización del tumor y describir el grado de diseminación del mismo en números romanos del uno al cuatro (I, II, III o IV).	Cualitativa	Ordinal	Temprano I-II Avanzado III-IV

Escala de Hasenclever	Sistema internacional pronóstico para grupos de riesgo con enfermedad avanzada, incluye variables con impacto pronóstico adverso y permite calcular la supervivencia libre de progresión a 5 años.	cuantitativa	Ordinal	Factores de riesgo 0-2 Factores de riesgo 3-5
Niveles de Lactato deshidrogenasa en sangre	Prueba que permite la cuantificación de la enzima Lactato deshidrogenasa, enzima presente en prácticamente todas las células del organismo y se libera de estas células hacia la sangre cuando existe lesión o destrucción celular o tisular.	Cuantitativa	Ordinal	Menor a 250 Mayor a 250
Esquema de tratamiento	Tratamiento contra la enfermedad de Hodgkin indicado	Cualitativa	politómica	ABVD BEACOP RADIOTERAPIA OTRO
Respuesta al tratamiento según pet ct final	Respuesta metabólica al tratamiento indicado para linfoma Hodgkin, evaluado en base a PET-CT mediante disminución en las cifras de captación de la fluoro-2-desoxi-D-glucosa en una región del PET CT en base a valor de captación estándar (SUVs).	Cualitativa	politómica	Respuesta completa Respuesta parcial Enfermedad estable Progresión
MAGE A-3 por RT-PCR	Expresión del Gen MAGE a-3 y NY-ESO 1 en pacientes con linfoma Hodgkin a través de RT-PCR.	Cualitativa	Nominal (dicotómica)	Expresión No Expresión

NY-ESO1 por RT-PCR	Expresión del Gen NY-ESO 1 en pacientes con linfoma Hodgkin a través de RT- PCR.	Cualitativa	Nominal (dicotómica)	Expresión No expresión
Recaída	Nueva aparición del linfoma Hodgkin en pacientes que alcanzaron una respuesta completa a primera línea de tratamiento.	Cualitativa	Nominal (dicotómica)	Presente Ausente

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este estudio se ajusta a las normas éticas institucionales y a la Ley General de Salud en materia de experimentación en seres humanos, y así como a la declaración de Helsinki, con modificación en el congreso de Tokio, Japón en 1983.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico fue basado en el software SPSS versión 20. De forma inicial se realizó estadística descriptiva para establecer medias, medianas y rangos. El análisis de correlación de Pearson se estableció entre las variables cualitativas (lactato deshidrogenasa y RQ-PCR para MAGE-A3 y NY-ESO 1 etc.). Para el contraste de hipótesis entre la expresión de MAGE-A3 y NY-ESO 1 la respuesta al tratamiento se utilizó el test chi-cuadrado, considerándose significativo a un valor menor o igual a 0.05 (95%, IC).

RESULTADOS

Caracterización de la muestra de estudio

Se incluyeron un total de 24 pacientes con diagnóstico de linfoma Hodgkin atendidos en la clínica de Linfoma Hodgkin en el servicio de Hematología del Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga.

La confirmación diagnóstica fue basada en datos histológicos e inmunológicos incorporados en el expediente clínico.

De los 24 pacientes, 16 pacientes (67%) correspondieron al sexo masculino y 8 pacientes (33%) al sexo femenino. Grafico 1

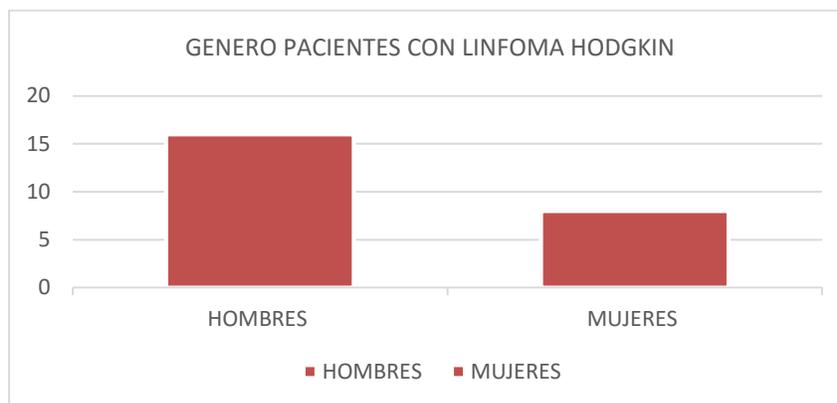


Grafico 1.
Fuente expediente clínico.

La mediana de edad fue de 28 años, siendo la edad mínima de 16 años y la máxima 48 años. Gráfico 2

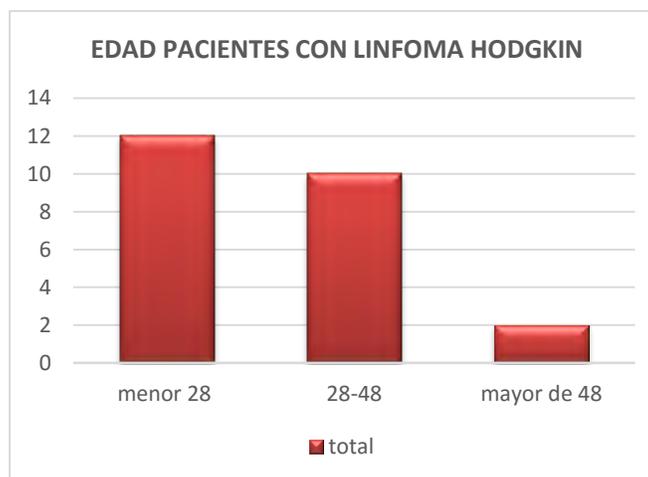


Grafico 2

Fuente expediente clinico

En la poblacion estudiada predomino el linfoma Hodgkin de tipo celularidad Mixta en 66.7% (16 pacientes), seguido en frecuencia de esclerosis nodular 29.1% (7 pacientes) y menos frecuente rico en linfocitos en 4.17% (1 paciente). Grafico 3

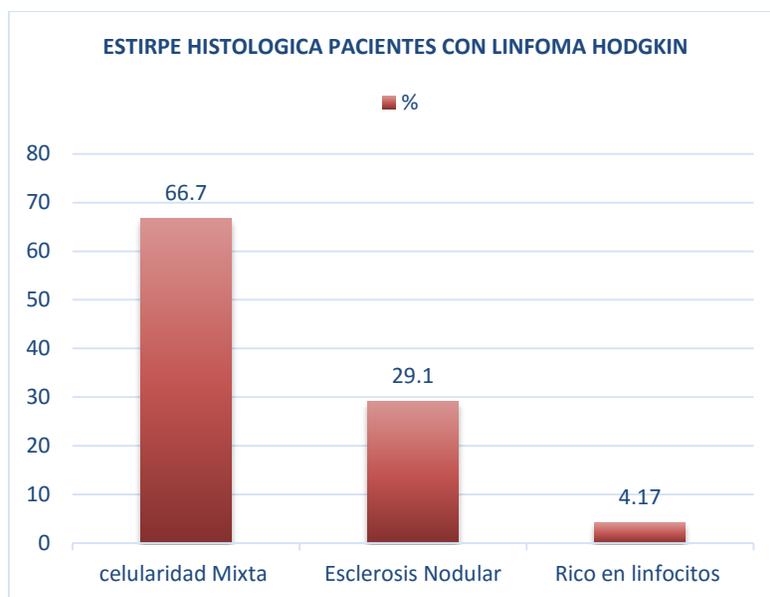


Grafico 3

Fuente expediente clinico

En cuanto a inmunohistoquímica se evaluó la presencia de Cd15, Cd 30 y Cd 20 , el de mayor frecuencia fue Cd 30 en 71 % de pacientes , seguido de Cd 15 en 62% y Cd 20 fue positivo en un 37% de pacientes.

La presencia de Virus de Epstein Bar fue de 50%.

En referencia a estadios clinicos de los 24 pacientes con linfoma Hodgkin el 34% correspondio a estadios tempranos (I y II) y el 66% restante estadios avanzados (III y IV). Gráfico 4

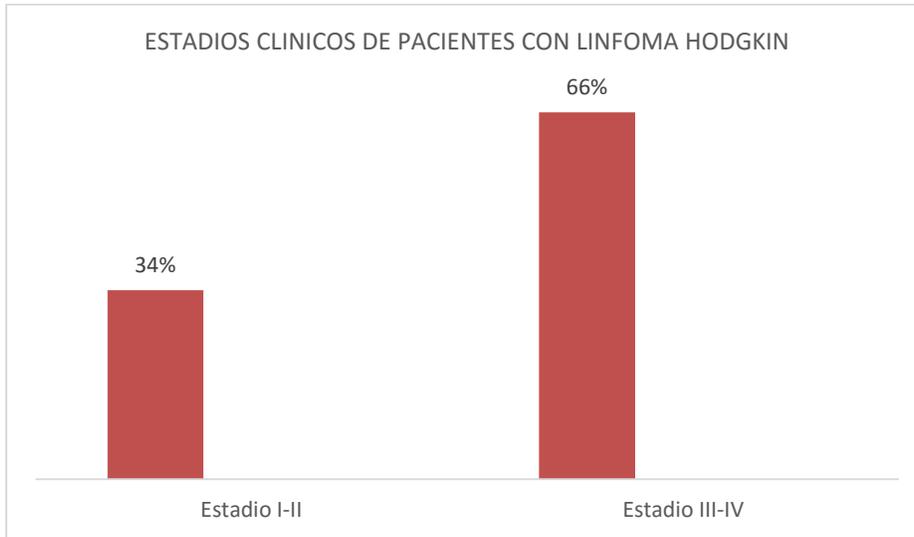


Grafico 4
Fuente expediente clinico.

Se utilizo el escore pronostico de Hasenclever , para fines de estudio, dividimos el escore de 0 a 2 y 3 a 5 , encontramos en nuestro grupo de pacientes que el 33% (8 pacientes) , tendra un pronostico adverso con una sobrevivida calculada de menos del 60%.

Evaluamos la cifra de LDH al diagnostico del total de pacientes , la mediana encontrada fue de 246 mg/dl, siendo el valor minimo encontrado de 80 y un maximo de 672 mg /dl , con un valor reportado extremo en 2058 mg/dl , el 54% de pacientes presento cifras de LDH alta (mayor de 250 mg/dl). Gráfico 5



Grafico 5
Fuente expediente clinico

El 92 % (22 Pacientes) Iniciaron esquema de quimioterapia ABVD en primera linea , un 8% (2 pacientes) no inicio ningun tratamiento y 4% (1 paciente) Recibio esquema inicial con MOPP.

De los pacientes que iniciaron tratamiento el 50 % (11 pacientes) presento respuesta completa a primera linea al evaluar el Pet ct final de tratamiento, 18% (4 pacientes) respuesta parcial , 18% (4 pacientes) enfermedad estable y 13% (3 pacientes) mostraron datos de progresion . Solo 6 pacientes del total que recibieron tratamiento (22 pacientes) presentaron recaida, correspondiendo al 27%.

En cuanto a si recibieron o no radioterapia 11 pacientes (50%) si recibieron radioterapia.

Expresión de los Antígenos Testiculares de Cáncer

Se realizó la extracción de RNA según la metodología descrita, tanto en controles como en pacientes con linfoma. En la figura 1 se muestra una imagen representativa de la extracción de RNA. Figura 1

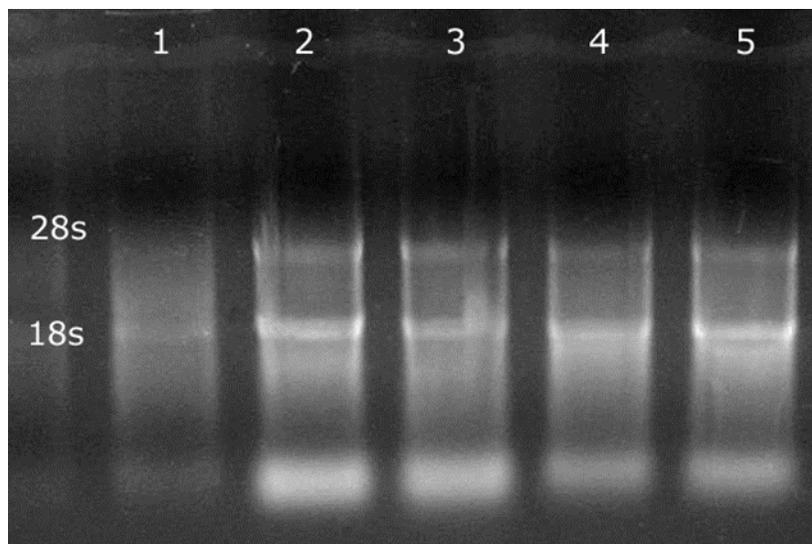
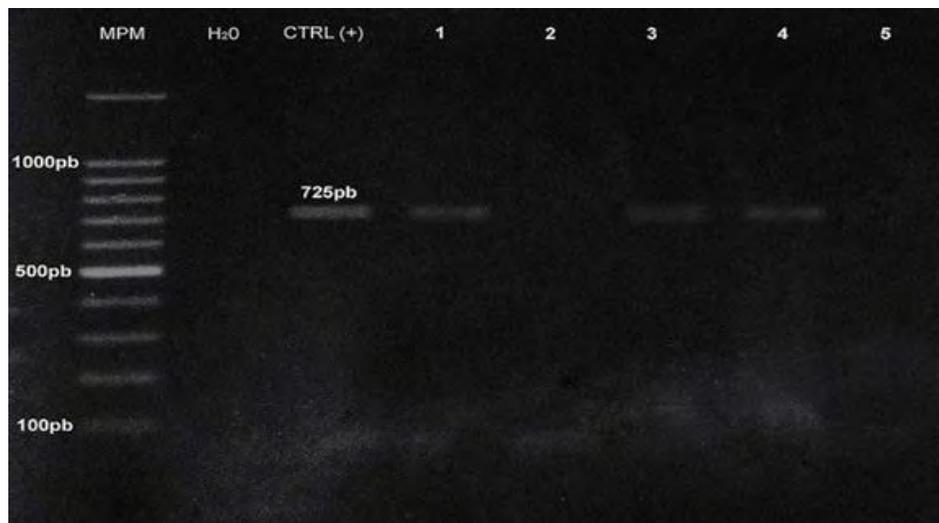


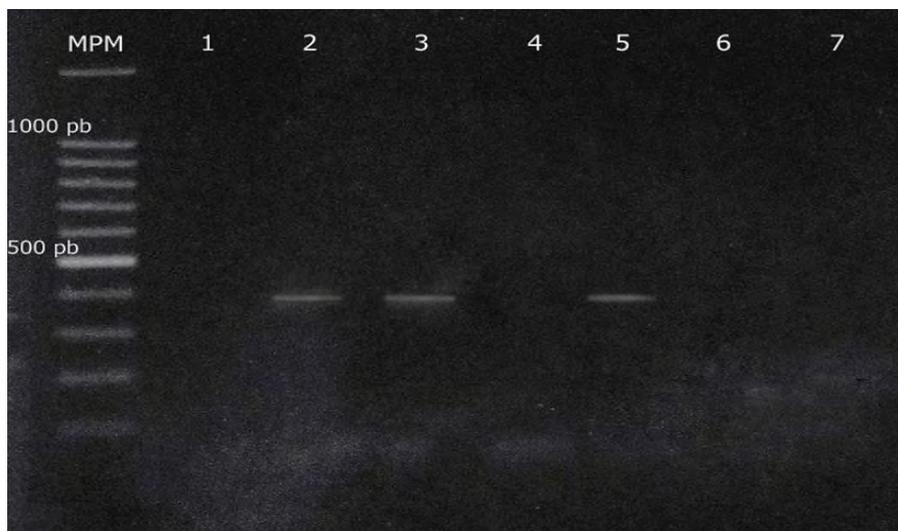
Figura 1. Verificación de la integridad del RNA en 5 pacientes con LH. 18s: Banda perteneciente a rRNA de la subunidad 18s. 28s: Banda perteneciente a rRNA de la subunidad 28s. Gel de agarosa al 1.5% en buffer TAE.

En el análisis de antígenos testiculares mediante PCR no se encontró expresión en ningún paciente para el gen NY-ESO1. La expresión de MAGE A3 fue de 37.5% (9 pacientes). En la Figura 2 (A) se muestra la amplificación del gen MAGE A3 en el control positivo y

en algunos pacientes representativos. En la figura 2 (B) pacientes representativos carriles 2, 3 y 5 positivos para MAGE A3.



A



B

Figura 2. Amplificación del gen MAGE-A3. A. Se muestra MPM: Marcador de peso molecular. H2O control de reacción. Control positivo en tejido testicular y carril 1 K562. Carriles 3 y 4 pacientes positivos. B MPM: Marcador de peso molecular , Pacientes representativos carriles 2,3 y 5 positivos. Gel de agarosa al 1.5% en buffer TAE.

Frecuencias de expresión y Correlación clínica del gen MAGE A3 y factores clínicos

Tabla 2. Frecuencias de expresión y correlación clínica del gen MAGE A3 y factores clínicos

		MAGEA3			
		Negativo		Positivo	
		Recuento	% del N de la tabla	Recuento	% del N de la tabla
Edad	menores 28	8	33.33	4	16.67
	28-48	6	25.00	4	16.67
	mayor 48	1	4.17	1	4.17
Sexo	masculino	10	41.67	6	25.00
	femenino	5	20.83	3	12.50
CD15	ausente	4	16.67	5	20.83
	presente	11	45.83	4	16.67
CD30	ausente	5	20.83	2	8.33
	presente	10	41.67	7	29.17
CD20	ausente	9	37.50	6	25.00
	presente	6	25.00	3	12.50
EBV	ausente	6	25.00	6	25.00
	presente	9	37.50	3	12.50
DHLcat	menor 250	7	29.17	4	16.67
	mayor 250	8	33.33	5	20.83

fuentes expedientes clínicos

No se encontró ningún paciente positivo para NY-ESO 1 en los pacientes analizados, en el caso del gen MAGE A3 se encontró una frecuencia de 37.5% (9/24). Como se puede apreciar en la tabla 2, 8 de los 9 pacientes se encontraron en rangos de edad menores a 28 y de 28 a 48 años. La mayor parte de los pacientes positivos fueron del sexo masculino, en 7 pacientes se encontró presente el CD30.

Posterior al análisis estadístico no se encontró una correlación significativa entre la expresión de MAGE A3, y las principales variables clínicas pronósticas, al contrastar MAGE A 3 con respuesta al tratamiento no presentó una diferencia significativa ($p=0.224$, 95% IC), al contrastar el puntaje pronóstico según escala de Hasenclever (> 2 o < 2 valores) tampoco se mostró un contraste significativo ($p=0.371$, 95% IC). Lo mismo ocurrió al contrastar con estadios clínico y recaída. Tabla 2

De los casos positivos para MAGE A3 un 66% fue positivo para Epstein Bar y un 44% presentó cifras de LDH altos.

Del total de pacientes, 12% (3 pacientes) fallecieron en el periodo de seguimiento, de estos 8.33% fueron también positivos a MAGE A3. ($p=0.264$, 95% IC),

VARIABLES		MAGEA3				Chi cuadrada de Pearson Grado de libertad Significancia
		NEGATIVO		POSITIVO		
		Recuento	% del N de la tabla	Recuento	% del N de la tabla	
Estirpe	Celularidad Mixta	11	45.83	5	20.83	2.01904762
	Esclerosis nodular	3	12.50	4	16.67	2
	Rico en linfocitos	1	4.17	0	0.00	0.36439246
RT	Sin RT	8	33.33	5	20.83	0.01118881
	Con RT	7	29.17	4	16.67	0.91575915
Respuesta	remisión completa	7	29.17	4	16.67	5.67272727
	remisión parcial	3	12.50	1	4.17	4
	progresión	3	12.50	0	0.00	0.22495865
	enfermedad estable	2	8.33	2	8.33	
	sin tratamiento	0	0.00	2	8.33	
EC2		1	4.17	0	0.00	0.74248366
	I-II	4	16.67	2	8.33	2
	III-IV	10	41.67	7	29.17	0.68987709
HPS	menor de 2	11	45.83	5	20.83	0.8
	mayor a 2	4	16.67	4	16.67	0.37109337
Recaída	no	11	45.83	7	29.17	0.05925926
	si	4	16.67	2	8.33	0.80767056
Estado	vivo	14	58.33	7	29.17	1.24444444
	muerto	1	4.17	2	8.33	0.26461622

Fuente expediente clínico.

DISCUSION DE RESULTADOS

Se analizaron 24 pacientes con diagnóstico de linfoma Hodgkin atendidos en la clínica de Linfoma Hodgkin en el servicio de Hematología del Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga, dicho diagnóstico fue confirmado basado en datos histológicos e inmunológicos, incorporados en el expediente clínico.

En nuestro estudio predominó el sexo masculino con una mediana de edad de 28 años, nuestros resultados no difieren con reportes internacionales, en Estados Unidos se reporta que hasta un 85% de linfoma de Hodgkin es reportado en varones, con una curva de incidencia bimodal: 15 a 34 años y después de los 50 años. La American Cancer Society estimó para este año (2016), 8500 nuevos casos de los cuales 4790 serán hombres ⁽¹⁷⁾. En México hasta el 2003 se reportaron 935 casos, con mayor incidencia en el grupo de varones de 15 a 19 años, Siendo el número de casos esperados para 2020 de 1837 casos en su mayoría varones ⁽¹⁸⁾.

En relación con la estirpe encontramos que en la población estudiada predomina el tipo celularidad Mixta seguida de esclerosis nodular, los datos difieren con lo reportado a nivel internacional donde se reporta la estirpe predominante esclerosis nodular en más del 60%. Existe coincidencia entre nuestros datos y los reportados en 2011 de centros de referencia en México INCAN e ICMNNSZ reportan celularidad mixta como la estirpe más frecuente de linfoma Hodgkin. Nos llama la atención un estudio reportado en el Hospital Español a 4 años de seguimiento, ellos concuerdan con reportes internacionales siendo la estirpe esclerosis nodular más frecuente en un 56.60%.⁽¹⁹⁾

El diagnóstico de linfoma de Hodgkin clásico requiere identificar células de Reed-Sternberg en el entorno celular apropiado y con características inmuno histoquímicas propias; es decir, que las células de Reed-Sternberg sean positivas al CD30, al CD15 y negativas para el CD45 y el EMA, y en ocasiones positivas a marcadores B, lo esperado en cuanto a expresión positiva es un predominio de CD 30 contra CD 15. En nuestro estudio en cuanto a inmuno histoquímica se evaluó la presencia de CD15, CD 30 y CD 20, el de mayor frecuencia fue CD 30 en 71 % de pacientes, seguido de CD 15 siendo CD 20 positivo en un tercio de pacientes, debe recordarse que la ausencia de CD 15 está relacionada a un curso malo en relación con aquellos casos con CD 15 positivo. ⁽²⁰⁾

La presencia de Virus de Epstein Bar (EBV) fue confirmada en la mitad de los pacientes estudiados lo que coincide con datos reportados internacionalmente donde la relación del

linfoma Hodgkin con virus de Epstein Barr es de 40% siendo más frecuente en Estados Unidos y Europa. Lo reportado en México no dista de los reportes internacionales. ⁽²¹⁾

En referencia a estadios clínicos se menciona que hasta un 80% de casos deberían ser identificados en estadios localizados, nuestras cifras difieren de los reportes internacionales, encontramos la mayoría de casos estadificados como III y IV, estadios avanzados están asociados a pronóstico desfavorable, En un estudio chileno de 682 pacientes con diagnóstico de linfoma de Hodgkin, se encontró un 40% de pacientes en etapas tempranas, estas cifras son mayores a la reportada en nuestro estudio ^(21,25)

Con la escala pronóstica de Hasenclever, evaluamos variables con impacto pronóstico adverso: edad mayor de 50 años, sexo masculino, estadio IV, Hb menor de 10 g/dL, albúmina menor de 4 g/dL, leucocitos mayor o igual a $15 \times 10^9/L$, linfocitos menor de $0.6 \times 10^9/L$ (o menor del 8% en el recuento diferencial) la escala permite el cálculo de la supervivencia libre de progresión a 5 años, para fines de nuestro estudio dividimos el score de 0 a 2 para diferenciar aquellos con una supervivencia libre de progresión a 5 años mayor de 67% y 3 a 5 para aquellos con una supervivencia menor al 60% a 5 años. Encontramos en nuestro grupo de pacientes que el 33% (8 pacientes), tendrá un pronóstico adverso con una sobrevida calculada de menos del 60%.

Las cifras de LDH en pacientes con linfoma de Hodgkin están directamente relacionadas con el tamaño del tumor, encontramos que la mayoría de pacientes presentan cifras de LDH altas, incluso reportamos una cifra extrema de 2058 mg/dl, siendo esto adverso en cuanto a pronóstico en nuestro grupo de pacientes. En relación a seguimientos de pacientes cifras altas de LDH son un marcador pronóstico de recaída.

El esquema de quimioterapia ABVD fue utilizado en primera línea, un paciente recibió esquema inicial con MOPP y 2 pacientes debido a su condición clínica no iniciaron ningún esquema de tratamiento. En cuanto a si recibieron o no radioterapia el 50% si recibió radioterapia. El esquema ABVD mas radioterapia es el tratamiento estándar, actualmente en uso. Ambos tratamientos son una buena alternativa, con la ventaja de no utilizar agentes alquilantes, responsables de potenciales complicaciones como infertilidad, mielodisplasia y leucemia secundaria.

La respuesta completa a primera línea de tratamiento correspondió al 50%, evaluada con Pet ct final de tratamiento, fue encontrado un porcentaje de recaída de 27%, hasta hace algunos años la evaluación de la respuesta en pacientes con linfoma de Hodgkin se llevó a cabo principalmente mediante tomografía computarizada, recientemente dado su

sensibilidad y especificidad utilizamos la tomografía por emisión de positrones fluorodeoxiglucosa (FDG-PET).⁽²¹⁾ En un grupo de estudio de Riguel J Inaoka, de 38 pacientes con linfoma de Hodgkin en Brasil, reportaron una cifra de respuesta al tratamiento en pacientes sin antígenos testiculares de cáncer de un 80% y en pacientes con antígenos de cáncer negativo de 20% reportando la relación como estadísticamente significativa, de 38 pacientes ellos encontraron un 18% de positividad. En nuestro estudio la respuesta al tratamiento fue menor, no demostrándose una relación significativa con la presencia de MAGE A3.^(16,22)

La expresión de MAGE A3 fue en nuestros pacientes de 37.5%, en un estudio realizado en 2011 por el Dr. Riguel J Inaoka en el Departamento de Patología de la Universidad Federal de Sao Paulo al estudiar 38 pacientes con linfoma Hodgkin ellos reportan una expresión menor a la nuestra siendo del 21 %, cabe señalar que en sus casos encontraron mayor positividad en etapas avanzadas en comparación con etapas iniciales de la enfermedad, coincidiendo con nuestro estudio.⁽²³⁾

En relación con NY-ESO1 en el análisis de antígenos testiculares mediante PCR no se encontró expresión en ningún paciente para este gen, esto coincide con el reporte mencionado previamente publicado por Inaoka y col en el BMC en 2011, en una población brasileña donde reportan negatividad para CT10/MAGE-C2, GAGE and NY-ESO-1 en 38 casos de linfoma Hodgkin revisados⁽²³⁾. Esto podría explicarse dado NY-ESO 1 es más bien un marcador intracelular, por lo que es mucho más probable su identificación en tumores sólidos tipo esofágico, liposarcoma entre otros.

No se encontró una correlación significativa entre la expresión de MAGE A3, y las principales variables clínicas pronósticas, al contrastar MAGE A 3 con respuesta al tratamiento no presentó una diferencia significativa ($p=0.224$, 95% IC), al contrastar el puntaje pronóstico según escala de Hansenclever (> 2 o < 2 valores) tampoco se mostró un contraste significativo ($p=0.371$, 95% IC). Lo mismo ocurrió al contrastar con estadios clínicos y recaída.

De los casos positivos para MAGE A3 un 66% fue positivo para Epstein Bar y un 44% también presentó cifras de LDH altos, En relación con Epstein Bar cabe mencionar la importancia de su prevalencia asociado a celularidad mixta, en estudios reportados donde predomina el estirpe clínico de escleritis nodular, la prevalencia de Epstein Bar es mayor.

Del total de pacientes, 12% (3 pacientes) fallecieron en el periodo de seguimiento, de estos la mayoría fueron también positivos a MAGE A3. ($p=0.264$, 95% IC), aunque, no fue estadísticamente significativo muy probablemente por el pequeño número de pacientes.

El estimado de mortalidad de Linfoma de Hodgkin en Estados Unidos cada año es de 1300 casos. Se espera en la mayoría de pacientes con diagnóstico de Linfoma Hodgkin una supervivencia libre de enfermedad que supere al 80% a 5 años de seguimiento. La tasa de supervivencia relativa a un año para todos los pacientes diagnosticados con enfermedad de Hodgkin alcanza un 92%, siendo las tasas de supervivencia a 5 años y 10 años alrededor de 86% y 80% respectivamente, considerando la tasa de mortalidad en nuestro estudio no difiere de lo esperado a nivel internacional y no dista de lo reportado a nivel nacional, mencionando un estudio realizado en el INCMNSZ en este reportan de 156 pacientes estudiados un total de 15 eventos fatales, con una remisión completa en el total de pacientes de 61.6%.⁽²⁵⁾

Se observó una tendencia entre la expresión de antígenos testiculares de cáncer MAGE A3 con mortalidad, pronóstico avanzado y recaída, pero la asociación no fue estadísticamente significativa. Por lo que no podríamos utilizarlo como una herramienta pronóstica en nuestros pacientes con linfoma de Hodgkin. Como sabemos el marcador pronóstico ideal en cáncer es aquel que me permita evaluar preguntas tales como ¿Puede el paciente alcanzar o no alcanzar la remisión del cáncer? ¿Cuál es el mejor tratamiento? ¿Cuál ha sido la respuesta al tratamiento? ¿Puede el paciente tener una recaída después haber logrado respuesta completa y ésta ser anticipada antes de que se haga clínica? por ende un marcador ideal debe ser altamente específico para un determinado tumor, debe permitir la detección del cáncer aun con enfermedad oculta es decir estar presente incluso en estadios iniciales, y por último debe ser muy sensible para evitar falsos negativos. En nuestro estudio ni MAGE A3, ni NYESO-1 cumplieron estas características.

CONCLUSIONES

1. La expresión de Antígenos testiculares de cáncer (Mage A3) fue de 37,5 % en sangre periférica de pacientes con Linfoma de Hodgkin.
2. No se encontró una relación estadísticamente significativa entre la expresión de antígenos testiculares de cáncer en pacientes con linfoma Hodgkin, al correlacionar MAGE A3 con las principales variables pronósticas (edad 28 años, sexo masculino, estadio clínico, respuesta al tratamiento, recaída).
3. No es posible utilizarlo como herramienta pronóstica en sangre periférica

RECOMENDACIONES

A pesar de no poder establecer con nuestro estudio una correlación estadísticamente significativa entre variables pronósticas y la expresión de MAGE A3, si pudimos observar una tendencia en la presentación del mismo al asociarlo con mortalidad, estadio avanzado y recaída, consideramos el número de pacientes pudo influir en los resultados; Consideramos la importancia de estudiar la expresión de antígenos MAGE A3 en nuestra población con neoplasias malignas en particular el linfoma Hodgkin recomendamos se continúe con la línea de investigación y abrimos puertas para nuevo estudios en los que se incremente el número de pacientes y se prolongue el periodo de seguimiento.

BIBLIOGRAFIA

1. Han, H.; Eom, S.; Park, S.; Yun, T.; et al. 2010. Detection Of circulating cells in patients with non Hodgkin Lymphoma using MAGE A3 gene expression in peripheral blood. *Leuk Res.* 34 (9): 1127-31
2. Olarte, I.; Martínez, A.; Ramos, C.; et al. 2011. MAGE A3 expresión is an adverse pronostic factor in diffuse large B_ cell Lymphoma. *Hematology.* 16(6): 368-72.
3. Mendoza, I.; Olarte, I.; Miranda, E.; et L. 2015. Frecuency of cáncer testis antigens in chronic myeloid leukemia. *Rev Med Hosp Gen Mexico .* 2015, 1-9.
4. Vincent, Brichard.; Quentin, G. 2013. MAGE A3 Specific anticancer immunotherapy in the clinical practice. *Oncoinmunology.* October. 2(10) 25995-1.
5. Farrell, K.; Jarrett, F. 2011. The molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma. *Histopatology.* 58 (1): 15 – 25
6. Küppers, R. 2009. The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat Rev Cancer.* 9(1): 15 -27
7. Schwarzer, R.; Jundt, F. 2011. Notch and NF-kB signaling pathways in the biology of classical Hodgkin lymphoma. *Curr Mol Med.* 2011; 11 (3): 236 – 245
8. Bauer, K.; Skoetz, N.; Monsef, I.; et al. 2011. Comparison of chemotherapy including escalated BEACOPP versus chemotherapy including ABVD for patients with early unfavourable or advanced stage Hodgkin lymphoma. *Cochrane Database Syst Rev.* 10(8).
9. Stephen, A. 2012. Hodgkin Lymphoma: Update on diagnosis risk-stratification and management. annual clinical updates in hematological malignancies: a continuing medical education series. *American Journal de Hematology.* 1096-1103.

10. Armitage, O. 2011. The importance of testing PET- directed therapy in patients with Hodgkin lymphoma. *Curr Hematol Malig Rep.* 6 (3): 155-1
11. Xiao, J.; Hong, ch. 2004. Biological functions of melanoma –associated antigens. *World J Gastroenterol.* 10 (13): 1849-1853.
12. De Plaen, E; Arden, K.; Traversari, C.; Gaforio, J.; et al. 1994. Structure, chromosomal localization and expression of 12 genes of the MAGE family. *Inmunogen.* 55, 176-184.
13. Olarte, I. 2007, Tesis Unam: Expresión del Gen MAGE en células de linfoma.
14. Jungbluth, A.; Baiocchi, O. et al. 2011. 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 cáncer.* 11:416
15. Cancer Facts & Figures 2016. Atlanta, Ga: American Cancer Society.
16. Globocan 2008 <http://www-dep.iarc.fr>
17. Salcedo, J.; Avilés, A.; Carballo, A.; et al. 2004-2007. Linfomas en México clasificación morfológica y por inmunohistoquímica Hospital Español de México.
18. Lara-Torres, C; Ortiz-Hidalgo, C.; 2009. Diagnóstico histopatológico e inmunohistoquímico del linfoma de Hodgkin y su diagnóstico diferencial. *Patología.* 47(1):35-45.
19. Mojar- Betancourt, A. 2000. Enfermedad de Hodgkin y virus de Epstein-Barr en México; más evidencias de su posible asociación causal. *Rev Invest Clin.* 52(4): 467-468.
20. Brepoels, L1.; Stroobants, S.; De Wever, W.; et al. 2007. Hodgkin lymphoma: Response assessment by revised International Workshop Criteria. *Leuk Lymphoma.* 48(8):1539-47.
21. Riguel, I.; Achim, J.; Otávio, B. 2011. Una visión general de la expresión de antígenos testiculares de cáncer en el linfoma de Hodgkin clásico (CHL)

identifica la familia MAGE A y MAGE-C1 como los antígenos más frecuentemente expresados en un conjunto de pacientes Brasileños CHL. BMC Cáncer. 11:416.

22. Cabrera, M.; García, H.; Lois, V.; et al; 2007. Hernán Linfoma de Hodgkin en Chile. Experiencia de 15 años del Programa Nacional de Cáncer del Adulto. Rev. Med Chile.135: 341-350.
23. Armillas, F., Aguayo, A.; Crespo, E. 2011. Experiencia del INCMNSZ con linfoma de Hodgkin Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Revista de Hematología.12(3)
24. Corrales, C.; Barbosa, A.; Medina, C.; et al. 2011. Linfoma de Hodgkin. Características clínicas, bioquímicas y factores asociados a mortalidad en pacientes mexicanos del Instituto Nacional de Cancerología. Revista de Hematología. 12(3).
25. Sarmiento, L. 2015. Antígenos asociados a tumor y su potencial uso en el tratamiento del cáncer. Revista Científica Salud Uninorte.31(1).
26. Rapoport, P.; Aqui, A.; Stadtmauer, A.; et al. 2014. Combination immunotherapy after ASCT for multiple myeloma using MAGE-A3/Poly-ICLC immunizations followed by adoptive transfer of vaccine-primed and costimulated autologous T cells. Clin Cancer Res. 20(5): 1355-65.
27. Olarte-Carrillo, I. 2012. 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. Tesis de Doctorado, UNAM.
28. Old, L. 2001. Cancer/testis (CT) antigens- a new link between gametogenesis and cancer. Cancer Immun.1-9.

29. Atanackovic, D.; Altorki, N.; Stockert, E.; et al. 2004. Vaccine-induced CD4+ T cell responses to MAGE-3 protein in lung cancer patients. *J Immunol.*172: 3289-3296.
30. Bedrosian, I.; Mick, R.; Xu, S.; et al. 2003. Intranodal Administration of Peptide-Pulsed Mature Dendritic Cell Vaccines Results in Superior CD8 T-Cell Function in Melanoma Patients.*J Clin Oncol.* (21):3826-3835.
31. Napoletano, C., Bellati, F.; Tarquini, E.; et al. 2008. MAGE-A and NY-ESO1 expression in cervical cancer: prognostic factors and effects of chemotherapy. *Am J Obstet Gynecol.* 198(1):1-7.
32. Andrade. C.; Vettore,L.; Felix,S. et al. 2008. Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients. *Cancer Immunol.* 1; 82.
33. Andrade, C.; Vettore, L.; Regis, M.; et al. 2009. Frequency and prognostic relevance of cancer testis antigen 45 expression in multiple myeloma. *Exp Hematol.*37 (4):446-9.
34. Nicholaou, T.; Ebert, L.; Davis, ID.; et al. 2006. Directions in the immune targeting of cancer: lessons learned from the cancer-testis Ag NYESO1.*Immunol Cell Biol.*84 (3):303-17.
35. Nakada, T.; Noguchi., Y; Satoh, S.; et al. 2003. NY-ESO1 mRNA expression and immunogenicity in advanced prostate cancer. *Cancer Immun.* 3: 10–21.
36. Bujas, T.; Marusic, Z.; Peric Balja, M.; et al. 2011. MAGE-A3/4 and NY-ESO1 antigens expression in metastatic esophageal squamous cell carcinoma. *Eur J Histochem.* 21;55(1).
37. Van Rhee, F.; Szmania, M.; Zhan, F.; et al. 2005. NY-ESO1 is highly expressed in poor-prognosis multiple myeloma and induces spontaneous humoral and cellular immune responses. *Blood.* 05: 3939–44.
38. Gure A,O.; Chua, R.; Williamson, B.; et al.2005. Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.*11: 8055–8065.

39. Hofmann, M.; Ruschenburg, I. 2002.mRNA detection of tumor-rejection genes BAGE, GAGE, and MAGE in peritoneal fluid from patients with ovarian carcinoma as a potential diagnostic tool.Cancer. 96(3):187-93.
40. Yakirevich, E.; Sabo, E.; Lavie, O.; et al. 2003. Expression of the MAGE-A4 and NY-ESO1 cancer-testis antigens in serous ovarian neoplasms. Clin Cancer Res. 9(17):6453-60.
41. Bellati. F.; Napoletano, C.; Tarquini, E. 2007. Cáncer testis antigen expression in primary and recurrent vulvar cancer: association with prognostic factors. Eur J Cáncer. 43(17):2621-7.
42. Olivier, C.; Carballido, J. 2010. Células tumorales circulantes: aislamiento, cuantificación y relevancia de su traslación a la práctica asistencial Actas Urol Esp; 34(1).

Anexo I

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN MÉDICA.

Título: “Expresión de los Antígenos Testiculares de Cáncer en pacientes con Linfoma Hodgkin y su correlación clínica”

Hoja 1 de 2

Investigador principal: Dra. Irma Olarte Carrillo

Sede donde se realizará el Estudio: Servicio de Hematología Unidad 111D clínica de linfoma Hodgkin, Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”.

Identificación del participante (sólo anotar iniciales)

Nombre _____ Apellido _____ ECU _____

Identificación en el estudio LH número _____ (números consecutivos 1 al 13 asignados por el investigador).

Por medio del presente manifiesto haber sido informado sobre el tipo de procedimiento que se realizara en mi persona, siendo esta una investigación con riesgo mínimo donde se me realizara toma de muestra de sangre periférica 5 ml en tubo con EDTA, con el objeto de identificar la expresión del Gen MAGE A-3 (Antígeno testicular de cáncer), el cual se expresa en tumores y podría en un futuro ser un blanco de tratamiento en mi enfermedad.

Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto. Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, quedara un número de registro en su expediente para posteriormente explicarle el resultado de su prueba.

1. Objetivo del estudio: a usted se le está invitando a participar en un estudio de investigación que tiene como objetivo determinar la expresión de antígenos testiculares de cáncer en pacientes con Linfoma Hodgkin y su correlación clínica,
2. Riesgos: Riesgo mínimo, ya que solo se realizara por personal entrenado toma de muestra de sangre periférica, el resto de datos se tomarán del expediente clínico,
3. Beneficios: en un futuro contribuir al tratamiento de la enfermedad de Hodgkin, identificando la expresión de blancos para inmunoterapia.
4. Alternativas: Estudio de investigación, la muestra solo puede ser recolectada de pacientes con diagnóstico de Linfoma de Hodgkin con seguimiento en nuestro centro, que autoricen dicho procedimiento.

Procedimiento: se le solicitará únicamente su colaboración para la toma de muestras. El resto de datos para realizar el análisis del estudio se tomarán de su expediente clínico correspondiente.

Aclaraciones: su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria. No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted en caso de no aceptar la invitación.

“Expresión de los Antígenos Testiculares de Cáncer en pacientes con Linfoma Hodgkin y su correlación clínica”

Hoja 2 de 2

Si decide participar en el estudio, considere que puede retirarse en el momento que así lo desee, su decisión será respetada.

No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio. No recibirá pago por su participación.

En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador responsable. La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.

Yo (anotar firma) _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación.

Testigo Parentesco _____ iniciales _____ Firma _____

Testigo Parentesco _____ iniciales _____ Firma _____

Firma Investigador que recolecta la muestra

He explicado al participante (iniciales) _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.

Si tiene alguna duda favor de comunicarse con el investigador principal del estudio: Dr. Christian Omar Ramos Peñafiel 5523351588 o Dra. Irma Olarte Carrillo, 5512254523 disponibles las 24 horas. En caso de dudas relacionadas con la protección de participantes en proyectos de investigación de este hospital, comunicarse con la presidenta del comité de ética en investigación con la Dra. María Georgina Andrade Morales.

Anexo II

Formato de Excel de recolección de datos

Expresión de antígenos testiculares de cáncer en pacientes con linfoma Hodgkin y su correlacion clínica

Nombre	Y-eso1	NY-ESO1	AGE a3	do mage a3	Edad (yrs)	Sexo 1. N	Fecha de Dx	Tiempo de	ECOG	WBC	linfocitos	Hb	plaqueta	DHL	albumina

.	1. RC	2. RP	Ultima fecha	1. vivo	2. mu	1RC	días	.	SLE	ECOG 1. men	Primera Remi	Recaida 1. si	DHL 1. norma	Albumina 1. b	1. I/11	2. III/	CD20	Sexo 1. Masc	.	Hasenlever	Prognosis Score 1: < 2	2 > 2	.	.	