



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
CURSO DE ESPECIALIZACIÓN EN UROLOGÍA  
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO DR. EDUARDO LICEAGA  
UNIDAD 105 A**

**TÍTULO  
DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE ANTIGENOS TESTICULARES EN PLASMA  
Y TEJIDO TESTICULAR DE PACIENTES CON CÁNCER TESTICULAR DEL  
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO**

**TESIS DE POSGRADO PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALIDAD EN:  
UROLOGÍA**

**PRESENTA  
DR. ELI JALIL CAMILO MARTINEZ**

**ASESOR DE TESIS:**

---

**DR. HUGO ARTURO MANZANILLA GARCIA  
MEDICO URÓLOGO ADSCRITO AL SERVICIO DE UROLOGÍA  
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO**

---

**DR. ADOLFO MARTINEZ TOVAR  
COASESOR DE TESIS  
CORDINADOR DE INVESTIGACIÓN DEL SERVICIO DE HEMATOLOGÍA HOSPITAL  
GENERAL DE MÉXICO**

---

**DR. LEOPOLDO MATEO GARDUÑO ARTEAGA  
JEFE DE ENSEÑANZA Y DEL SERVICIO DE UROLOGÍA  
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO**

**CIUDAD DE MÉXICO A 3 DE AGOSTO DE 2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## TITULO

**DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE ANTIGENOS  
TESTICULARES EN PLASMA Y TEJIDO TESTICULAR DE  
PACIENTES CON CÁNCER TESTICULAR DEL HOSPITAL  
GENERAL DE MÉXICO**

## ÍNDICE

Título .....	2
Resumen del protocolo.....	4
Marco Teórico .....	9
Planteamiento del Problema.....	16
Justificación.....	17
Hipótesis.....	17
Objetivos.....	17
Metodología.....	17
Resultados.....	22
Conclusión.....	25
Cronograma de actividades.....	25
Bibliografía.....	26

## **3.0 RESUMEN DEL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN**

### **3.1 Planteamiento del Problema**

El tumor testicular, patología que afecta predominantemente a jóvenes entre la segunda y tercera décadas de la vida, cuenta con múltiples marcadores séricos como la gonadotropina beta coriónica humana, la alfafetoproteína y la deshidrogenasa láctica; sin embargo se expresa una vez la enfermedad ha mostrado datos clínicos. Los antígenos testiculares se expresan de forma temprana en células malignas totipotenciales, dentro de los cuales se encuentra el cáncer testicular. De existir marcadores tempranos, antes que la enfermedad se muestre clínicamente podríamos abordar a pacientes de forma oportuna. Y al servir éstos como dianas de terapéutica focal se podría evitar la toxicidad asociada a quimioterapéuticos actuales. Encontrar diferencias cuantitativas de los niveles de antígenos testiculares en las diversas variedades histológicas nos ayudaría a discriminar entre ellas y ofrecer un tratamiento e incluso pronóstico personalizado.

¿La expresión cuantitativa de MAGE A4 y SSX1 en sangre periférica y tejido testicular difiere entre las diversas variantes histológicas del cáncer testicular?

### **3.2 Objetivo primario del estudio**

Correlacionar niveles cuantitativos de MAGE A4 y SSX1 en tejido testicular y sangre periférica de pacientes con las diversas variedades histológicas del tumor testicular

### **3.3 Hipótesis**

De existir diferencia en la expresión cuantitativa de antígenos testiculares en plasma y tejido testicular entre las variantes histológicas de cáncer testicular, entonces su determinación ayudará a generar puntos de corte para hacer un diagnóstico oportuno de cáncer testicular y su estirpe histológica.

### **3.4 Metodología**

#### **a) Procesamiento de muestra de sangre periférica**

Se recolectaron aproximadamente 4mL de sangre periférica de cada paciente. La muestra fue diluida en una proporción 1:1 en solución de lisis de eritrocitos (solución hipertónica) con el fin de aislar los leucocitos totales de la muestra. Una vez homogenizada e incubada a 4°C durante 8 minutos, la muestra fue centrifugada a

2500rpm durante 5 minutos. El pellet resultante de la centrifugación fue lavado en PBS (solución buffer de fosfatos) y dispuesto en microtubos de 1.5mL. En cada uno de los tubos se agregó un volumen equivalente a  $1 \times 10^6$  células y se centrifugaron a 2500rpm durante 5 minutos. Los botones celulares obtenidos de esta centrifugación fueron resuspendidos en 500 $\mu$ L de Trizol® y almacenados a -80°C hasta ser utilizados.

#### **b) Procesamiento de muestra de tejido testicular tumoral**

El tejido testicular obtenido fue seccionado en porciones de aproximadamente 5mm y disgregado en Trizol® a 4°C mediante un disruptor de tejidos (*TissueRuptor*, Quiagen®). El tejido disgregado fue dispuesto en volúmenes de 500 $\mu$ L en microtubos de 1.5mL e inmediatamente congelado a -80°C hasta ser utilizado.

#### **c) Extracción de RNA**

La metodología descrita a continuación se realizó a 4°C y fue la misma tanto para tejido testicular como para sangre periférica. A los 500 $\mu$ L de lisado celular en Trizol, se les agregaron 200 $\mu$ L de cloroformo grado biología molecular y se homogenizó la solución en vórtex. Una vez homogenizada, la solución fue incubada durante 10 minutos y posteriormente centrifugada a 12,000rpm durante 15 minutos. De esta centrifugación se obtuvieron 2 fases: una fase orgánica (fondo del tubo), que contenía proteínas, detritos celulares y DNA; y una fase acuosa (porción superior), en donde se encontraba solubilizado el RNA total. Esta fase acuosa fue cuidadosamente extraída y transferida a un nuevo tubo al cual se le agregó 1mL de etanol absoluto grado biología molecular y se homogenizó completamente. La solución fue incubada durante 1 noche a -20°C. Posterior a la incubación, se realizó una ultracentrifugación a 12,000rpm durante 15 minutos, teniendo como resultado un pellet de RNA total al fondo del tubo. Este pellet fue lavado con etanol al 75% y centrifugado de nuevo, a 8,000rpm por 8 minutos. El RNA después fue resuspendido en agua libre de nucleasas (NFW) e incubado a 70°C durante 10 minutos con la finalidad de alinear la cadena de RNA. Una vez alineado, se realizó una cuantificación en espectrofotómetro UV-visible y se verificó la integridad del RNA mediante una electroforesis en gel de agarosa. Posterior a la verificación se procedió a realizar la síntesis de DNA complementario (cDNA).

#### **d) Síntesis de cDNA**

Un volumen equivalente a 2 $\mu$ g de RNA total fue transferido a un microtubo de 0.6mL. Se agregó 1 $\mu$ L de Oligo dT y agua inyectable c.b.p. 11 $\mu$ L de volumen total. Esta solución fue homogenizada e incubada a 70°C durante 10 minutos. Posteriormente se añadieron 5 $\mu$ L de buffer 5X (250mM Tris-HCL, 500mM KCl, 25mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT, pH=8.4), 3  $\mu$ L de solución de dNTP 10 $\mu$ M y 1 $\mu$ L de enzima transcriptasa reversa MMLV (200u/ $\mu$ L). De igual manera, esta solución fue homogenizada con micropipeta y se incubó a 37°C durante 50 minutos. Pasado este tiempo, se realizó otra incubación a 70°C durante 10 minutos para inactivar la enzima. La síntesis de cDNA fue verificada mediante una PCR en punto final de los genes constitutivos beta 2-microglobulina (B2MG) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

### e) qRT-PCR de los genes ATC

Se realizó la amplificación y cuantificación de los genes MAGE-A4 y SSX-1 mediante ensayos de PCR en tiempo real en un equipo StepOne™ (Applied Biosystems) empleando la metodología SYBR Green® (Applied Biosystems). Las reacciones se realizaron a 20µL totales, empleando 1.5µL de cDNA, 10µL de SYBR Green® Master Mix, 0.4µL de oligos cebadores para el caso de SSX1 y 0.7µL de oligos cebadores para el caso de MAGEA4, y agua libre de nucleasas c.b.p. un volumen de 20µL totales. Se empleó un perfil térmico de: 95°C durante 10 minutos para activar a la polimerasa, 40 ciclos de 95°C/30 segundos, 60°C/1 minuto, 72°C/45 segundos, en los cuales se dio la amplificación; y 4°C durante 10 minutos.

Para la cuantificación relativa se empleó un método  $\Delta\Delta CT$ , utilizándose la línea celular K562 (eritroleucemia) como control de referencia y el gen GAPDH como gen endógeno.

Oligo	Secuencia	Longitud del producto
MAGE A4 Forward	GAGCAGACAGGCCAACCG	446pb
MAGE A4 Reverse	AAGGACTCTGCGTCAGGC	
SSX1 Forward	AAGCCAGCAGAGGAGGAAAA	97pb
SSX1 Reverse	TATTTGCTTTTCCTGGGGGG	

### 3.5 Resultados

Dentro de nuestro universo de trabajo, se seleccionaron 22 pacientes con diagnóstico histopatológico de cáncer testicular, con un rango de edad que comprende desde los 18 a los 54 años de edad, una media de 29 años, una mediana de 25 años. Ubicando a los pacientes por décadas de la vida, la mayor parte de nuestros pacientes se encuentran en la tercera década de la vida comprendiendo un total de 9/22 pacientes (40.9%).

EDAD DE LOS PACIENTES	
<b>Media</b>	29 años
<b>Mediana</b>	25 años
<b>Mínimo</b>	18 años
<b>Máxima</b>	54 años

EDAD POR DECADAS	RECuento DE PACIENTES
<b>Menor o igual a 20 años</b>	6
<b>De 21 a 30 años</b>	9
<b>De 31 a 40 años</b>	5
<b>De 41 a 50 años</b>	1
<b>De 51 a 60 años</b>	1

Respecto al diagnóstico histopatológico la mayor correspondieron al diagnóstico de seminoma clásico, un total de 11/22 pacientes (50%). Así mismo la mayoría de nuestros pacientes no presentó metástasis en otros sitios, únicamente 1 de los 22 (4.5%) pacientes mostró metástasis en pulmón, y 15 pacientes de los 22 no mostraron metástasis ganglionares (68.18%). El estadio clínico más frecuente es IB con un total de 8 pacientes (36.36%) seguido del IA con 7 pacientes (31.81%).

DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO	RECuento DE PACIENTES
Seminoma	11
Mixto	10
Teratoma	1

Estadio clínico	Recuento de pacientes
IA	7
IB	8
IIB	2
IIC	2
IIIC	3

		Recuento de pacientes
Radiografía de tórax	Sin metástasis pulmonar	21
	Con metástasis pulmonar	1
Tomografía axial computada de abdomen y pelvis	Sin evidencia de metástasis (N0)	15
	Ganglios menores de 2 cm (N1)	3
	Ganglios mayores de 2 cm Menores de 5 cm (N2)	4
	Ganglios mayores de 5 cm (N3)	0

Para determinar la expresión de antígenos testiculares, MAGE A4 y SSX1 tanto en tejido como en sangre periférica de pacientes con diagnóstico de cáncer testicular confirmado por histopatología, se utilizó la prueba estadística de Chi cuadrada, con un alfa de 0.05, encontrando una pobre expresión de los mismos si se toma en cuenta todas las esitirpes histopatológicas, sin signifancia estadística ( $p=0.59$  para sangre periférica y  $p= 0.24$  para tejido testicular); Aunque se puede ver una clara tendencia de expresión en aquellos pacientes con seminoma puro como diagnóstico. En el caso del gen SSX1 se realizaron puntos de corte de 0.5, determinando como sin expresión a aquellos pacientes que mostraron en sangre periférica  $<0.5$  y con expresión a aquellos pacientes donde la determinación del gen se encontró por encima de dicho punto de corte. En la contraparte de expresión del mismo gen en tejido se categorizó en tres grupos distintos, sin expresión, expresión de 0.1 a 0.5 y mayor de 0.5

Diagnóstico Histopatológico	SSX1spCAT		SSX1tejCAT		
	Sin expresión	Exp > 0.5	Sin expresión	0.1 - 0.5	Exp > 0.5
seminoma	10	1	1	3	7
mixto	10	0	5	1	4
teratoma	1	0	0	0	1
carcinoma embrionario	0	0	0	0	0
coriocarcinoma	0	0	0	0	0
saco vitelino	0	0	0	0	0
quiste eidermoide	0	0	0	0	0
atrofia	0	0	0	0	0
neoplasia intraepitelial de células germinal	0	0	0	0	0
orquiepididimitis	0	0	0	0	0

En cuanto a la expresión de MAGE A4 se realizaron 3 puntos de corte tanto para sangre periférica como para tejido. Siendo en los primeros los puntos de corte de sin expresión, de 0.1 a 0.5 y expresión de más de 0.5. Aunque se muestra que en los pacientes con expresión de > 0.5 pertenecen únicamente a seminoma, no existe una diferencia estadísticamente significativa. Para la expresión del gen en tejido testicular se tomaron los mismos puntos de corte, prácticamente sin mostrar diferencias significativas entre las variantes histológicas.

Diagnóstico Histopatológico	MAGEA4spCAT			MAGEA4tejCAT		
	Sin expresión	0.1 - 0.5	exp > 0.5	Sin expresión	0.1 - 0.5	exp > 0.5
	Recuento	Recuent o	Recuent o	Recuento	Recuent o	Recuent o
seminoma	9	0	2	4	4	3
mixto	9	1	0	5	3	2
teratoma	1	0	0	0	1	0
carcinoma embrionario	0	0	0	0	0	0
coriocarcinoma	0	0	0	0	0	0
saco vitelino	0	0	0	0	0	0
quiste eidermoide	0	0	0	0	0	0
atrofia	0	0	0	0	0	0
neoplasia intraepitelial de células germinal	0	0	0	0	0	0
orquiepididimitis	0	0	0	0	0	0

Palabras clave: antígenos, cáncer, testículo

## 4.0 DESARROLLO DEL PROYECTO

### 4.1 antecedentes

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. Aproximadamente 95% de ellos pertenecen a tumores de células germinales A partir de la terapia a base de

cisplatino se aumentó la sobrevida libre de enfermedad del 80-90% incluso con enfermedad metastásica. (1)

En México se registra un aproximado de 110 mil casos nuevos de cáncer registrados por año, y ocupan el tercer lugar en la lista de las principales causas de muerte en el país. 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. (3)

## EPIDEMIOLOGÍA Y ETIOLOGIA

La incidencia de cáncer testicular varía dependiendo de la zona geográfica. Siendo mayor en los países de Escandinavia, Alemania, Suiza y Nueva Zelanda, y parece estar aumentando a nivel mundial, esto probablemente consecuencia de la prevención y a los métodos diagnósticos. Actualmente el seminoma localizado es la variante más frecuente a la presentación, representando aproximadamente 50% de los hombres con tumores de células germinales. (3)

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. (4) El testículo contralateral también guarda ligero incremento de padecer cáncer de testículo, con un riesgo relativo de 1.74. (5) 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. (6)

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. (7)

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. (8)

## CLASIFICACIÓN ANATOMOPATOLÓGICA

### Clasificación Histológica de los tumores testiculares (9)

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. 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.

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. Su sensibilidad es de prácticamente 100%. (10)

## MARCADORES TUMORALES

Entre ellos se encuentran la alfa feto proteína, hormona gonadotropina coriónica y la deshidrogenasa láctica. Su medición es imprescindible para el diagnóstico, pronóstico, tratamiento y monitoreo postquirúrgico.

### Alfa Feto Proteína

La alfa feto proteína (AFP) es una glucoproteína de 70,000 Kd generalmente se produce en el hígado, saco vitelino y el tracto gastrointestinal del feto. Su concentración después del nacimiento solo se encuentra en concentraciones bajas. En los tumores testiculares, puede producirse por el carcinoma embrionario puro, los tumores del saco vitelino o por tumores combinados. 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. (2)

### 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 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 avanzados. 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). (2)

#### 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 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.

Orientan sobre la naturaleza histológica del tumor, la AFP hacia un tumor no seminomatoso, una normalización de la b-HCG tras la orquiectomía radical es un elemento indicativo de seminoma puro. En la evaluación de una respuesta terapéutica después de un tratamiento eficaz, los marcadores deben ser negativos.

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 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 CANCER (ATC)

Los antígenos testiculares de cáncer son moléculas específicas de tumores donde se ha demostrado su expresión en diferentes neoplasias. 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. (21)

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. (21)

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. (21)

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. (22)

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. (23)

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. (24)

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. (26)

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. (28)

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. (29)

#### 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 trascricional o por un evento regulatorio como es la hipometilación (26,28)

#### 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. (27,28)

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 espermatocitos 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. (28)

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. (28)

## 4.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El tumor testicular, patología que afecta predominantemente a jóvenes entre la segunda y tercera décadas de la vida, cuenta con múltiples marcadores séricos como la gonadotropina beta coriónica humana, la alfafetoproteína y la deshidrogenasa láctica; sin embargo se expresa una vez la enfermedad ha mostrado datos clínicos. Los antígenos testiculares se expresan de forma temprana en células malignas totipotenciales, dentro de los cuales se encuentra el cáncer testicular. De existir marcadores tempranos, antes que la enfermedad se muestre clínicamente podríamos abordar a pacientes de forma oportuna. Y al servir éstos como dianas de terapéutica focal se podría evitar la toxicidad asociada a quimioterapéuticos actuales. Encontrar diferencias cuantitativas de los niveles de antígenos testiculares en las diversas variedades histológicas nos ayudaría a discriminar entre ellas y ofrecer un tratamiento e incluso pronóstico personalizado.

¿La expresión cuantitativa de MAGE A4 y SSX1 en sangre periférica y tejido testicular difiere en pacientes con las diversas variantes histológicas de cáncer testicular?

## 4.3 JUSTIFICACIÓN

Considerando el alto impacto que tiene el cáncer testicular en la población joven, sus altas tasas de remisión y curación con quimioterapia actual; a pesar de un diagnóstico retrasado muchas veces por tabú del paciente o error diagnóstico inicial. Resulta lógico y atractivo que al realizar un diagnóstico temprano y focalizar la terapia exclusivamente a las células neoplásicas conferirá un pronóstico excepcional al paciente. Poder determinar además el estirpe histopatológico generando diversos puntos de corte de los niveles de antígenos testiculares nos permitirá planificar de forma más íntegra el abordaje terapéutico y definir de forma más precisa el desarrollo de la patología en el transcurso del tiempo.

#### **4.4 OBJETIVO PRIMARIO DEL ESTUDIO**

Correlacionar niveles cuantitativos de MAGE A4 y SSX1 en tejido testicular y sangre periférica de pacientes con las diversas variedades histológicas del tumor testicular

#### **4.5 HIPÓTESIS**

De existir diferencia en la expresión cuantitativa de antígenos testiculares en plasma y tejido testicular entre las variantes histológicas de cáncer testicular, entonces su determinación ayudará a generar puntos de corte para hacer un diagnóstico oportuno de cáncer testicular y su estirpe histológica.

#### **4.6 MATERIALES Y MÉTODOS**

Tipo de Estudio: transversal, prospectivo, analítico, observacional

#### **4.7 POBLACIÓN Y TAMAÑO DE LA MUESTRA**

El universo de trabajo son los pacientes que se someten orquiectomía radical con la sospecha de cáncer testicular en el Hospital General de México de Septiembre del 2016 a Mayo del 2017

#### **4.8 CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

- Pacientes sometidos a orquiectomía radical con sospecha clínica de cáncer testicular
- Pacientes con determinación de marcadores séricos tumorales
- Mayores de edad
- Paciente de nacionalidad mexicana

#### **4.9 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

- Pacientes cuyo consentimiento para la toma de muestra sanguínea no sea otorgado
- Pacientes menores de edad
- Paciente cuya pieza histopatológica haya sido sumergida en formaldehído

- Diagnóstico de otro tipo de cáncer antes o durante el periodo que se lleve a cabo el estudio
- Pacientes con diagnóstico histopatológico fuera de nuestro hospital

#### 4.10 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- Pacientes con muestra sanguínea lisada o coagulada
- Pacientes con muestra de tejido testicular insuficiente para la obtención de adecuado material genético
- Paciente cuyo diagnóstico histopatológico no corresponda a cáncer testicular

#### 4.11 DEFINICIÓN DE VARIABLES

Variable	Escala
Edad	Cuantitativa discreta
Estirpe histopatológica	Cualitativa nominal
Expresión de MAGE A4	Cuantitativa discreta Dicotómica nominal
Expresión de SSX-1	Cuantitativa discreta Dicotómica nominal

##### VARIABLES INDEPENDIENTES

- Estirpe histopatológica
- Edad

##### VARIABLES DEPENDIENTES

- Expresión de SSX-1
- Expresión de MAGE A4

##### DESCRIPCIÓN DE CADA VARIABLE PARA TODOS LOS DISEÑOS

- Edad: tiempo que ha vivido una persona en años, desde su nacimiento
- Estirpe histopatológica: variante histológica de cáncer testicular, se definieron en el estudio como seminoma, teratoma, carcinoma embrionario, coriocarcinoma, saco vitelino, neoplasia intraepitelial de

células germinales cuando el componente fue exclusivamente de esa variante histológica. Si presentaban más de una variante se clasificó como mixto (no seminomatoso).

- Gen MAGE 4: antígeno testicular, demostrando su expresión cuantitativa mediante amplificación con PCR en tiempo real
- Gen SSX1: antígeno testicular, demostrando su expresión cuantitativa mediante amplificación con PCR en tiempo real

#### 4.11 PROCEDIMIENTO

##### a) Procesamiento de muestra de sangre periférica

Se recolectaron aproximadamente 4mL de sangre periférica de cada paciente. La muestra fue diluida en una proporción 1:1 en solución de lisis de eritrocitos (solución hipertónica) con el fin de aislar los leucocitos totales de la muestra. Una vez homogenizada e incubada a 4°C durante 8 minutos, la muestra fue centrifugada a 2500rpm durante 5 minutos. El pellet resultante de la centrifugación fue lavado en PBS (solución buffer de fosfatos) y dispuesto en microtubos de 1.5mL. En cada uno de los tubos se agregó un volumen equivalente a  $1 \times 10^6$  células y se centrifugaron a 2500rpm durante 5 minutos. Los botones celulares obtenidos de esta centrifugación fueron resuspendidos en 500 $\mu$ L de Trizol® y almacenados a -80°C hasta ser utilizados.

##### b) Procesamiento de muestra de tejido testicular tumoral

El tejido testicular obtenido fue seccionado en porciones de aproximadamente 5mm y disgregado en Trizol® a 4°C mediante un disruptor de tejidos (*TissueRuptor*, Quiagen®). El tejido disgregado fue dispuesto en volúmenes de 500 $\mu$ L en microtubos de 1.5mL e inmediatamente congelado a -80°C hasta ser utilizado.

##### c) Extracción de RNA

La metodología descrita a continuación se realizó a 4°C y fue la misma tanto para tejido testicular como para sangre periférica. A los 500 $\mu$ L de lisado celular en Trizol, se les agregaron 200 $\mu$ L de cloroformo grado biología molecular y se homogenizó la solución en vortex. Una vez homogenizada, la solución fue incubada durante 10 minutos y posteriormente centrifugada a 12,000rpm durante 15 minutos. De esta centrifugación se obtuvieron 2 fases: una fase orgánica (fondo del tubo), que contenía proteínas, detritos celulares y DNA; y una fase acuosa (porción superior), en donde se encontraba solubilizado el RNA total. Esta fase acuosa fue cuidadosamente extraída y transferida a un nuevo tubo al cual se le agregó 1mL de etanol absoluto grado biología molecular y se homogenizó completamente. La solución fue incubada durante

1 noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posterior a la incubación, se realizó una ultracentrifugación a 12,000rpm durante 15 minutos, teniendo como resultado un pellet de RNA total al fondo del tubo. Este pellet fue lavado con etanol al 75% y centrifugado de nuevo, a 8,000rpm por 8 minutos. El RNA después fue resuspendido en agua libre de nucleasas (NFW) e incubado a  $70^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos con la finalidad de alinear la cadena de RNA. Una vez alineado, se realizó una cuantificación en espectrofotómetro UV-visible y se verificó la integridad del RNA mediante una electroforesis en gel de agarosa. Posterior a la verificación se procedió a realizar la síntesis de DNA complementario (cDNA).

#### d) Síntesis de cDNA

Un volumen equivalente a  $2\mu\text{g}$  de RNA total fue transferido a un microtubo de 0.6mL. Se agregó  $1\mu\text{L}$  de Oligo dT y agua inyectable c.b.p.  $11\mu\text{L}$  de volumen total. Esta solución fue homogenizada e incubada a  $70^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos. Posteriormente se añadieron  $5\mu\text{L}$  de buffer 5X (250mM Tris-HCL, 500mM KCl, 25mM  $\text{MgCl}_2$ , 10mM DTT, pH=8.4),  $3\mu\text{L}$  de solución de dNTP  $10\mu\text{M}$  y  $1\mu\text{L}$  de enzima transcriptasa reversa MMLV ( $200\text{u}/\mu\text{L}$ ). De igual manera, esta solución fue homogenizada con micropipeta y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 50 minutos. Pasado este tiempo, se realizó otra incubación a  $70^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos para inactivar la enzima. La síntesis de cDNA fue verificada mediante una PCR en punto final de los genes constitutivos beta 2-microglobulina (B2MG) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

#### e) qRT-PCR de los genes ATC

Se realizó la amplificación y cuantificación de los genes MAGE-A4 y SSX-1 mediante ensayos de PCR en tiempo real en un equipo StepOne™ (Applied Biosystems) empleando la metodología SYBR Green® (Applied Biosystems). Las reacciones se realizaron a  $20\mu\text{L}$  totales, empleando  $1.5\mu\text{L}$  de cDNA,  $10\mu\text{L}$  de SYBR Green® Master Mix,  $0.4\mu\text{L}$  de oligos cebadores para el caso de SSX1 y  $0.7\mu\text{L}$  de oligos cebadores para el caso de MAGEA4, y agua libre de nucleasas c.b.p. un volumen de  $20\mu\text{L}$  totales. Se empleó un perfil térmico de:  $95^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos para activar a la polimerasa, 40 ciclos de  $95^{\circ}\text{C}/30$  segundos,  $60^{\circ}\text{C}/1$  minuto,  $72^{\circ}\text{C}/45$  segundos, en los cuales se dio la amplificación; y  $4^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos.

Para la cuantificación relativa se empleó un método  $\Delta\Delta\text{CT}$ , utilizándose la línea celular K562 (eritroleucemia) como control de referencia y el gen GAPDH como gen endógeno.

Oligo	Secuencia	Longitud del producto
MAGE A4 Forward	GAGCAGACAGGCCAACCG	446pb
MAGE A4 Reverse	AAGGACTCTGCGTCAGGC	
SSX1 Forward	AAGCCAGCAGAGGAGGAAAA	

## RESULTADOS

Dentro de nuestro universo de trabajo, se seleccionaron 22 pacientes con diagnóstico histopatológico de cáncer testicular, con un rango de edad que comprende desde los 18 a los 54 años de edad, una media de 29 años, una mediana de 25 años. Ubicando a los pacientes por décadas de la vida, la mayor parte de nuestros pacientes se encuentran en la tercera década de la vida comprendiendo un total de 9/22 pacientes (40.9%).

EDAD POR DECADAS	RECuento DE PACIENTES
Menor o igual a 20 años	6
De 21 a 30 años	9
De 31 a 40 años	5
De 41 a 50 años	1
De 51 a 60 años	1

Estadio clínico	Recuento de pacientes
IA	7
IB	8
IIB	2
IIC	2
IIIC	3

Respecto al diagnóstico histopatológico la mayor correspondieron al diagnóstico de seminoma clásico, un total de 11/22 pacientes (50%). Así mismo la mayoría de nuestros pacientes no presentó metástasis en otros sitios, únicamente 1 de los 22 (4.5%) pacientes mostró metástasis en pulmón, y 15 pacientes de los 22 no mostraron metástasis ganglionares (68.18%). El estadio clínico más frecuente es IB con un total de 8 pacientes (36.36%) seguido del IA con 7 pacientes (31.81%).

DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO	RECuento DE PACIENTES
Seminoma	11
Mixto	10
Teratoma	1

		Recuento de pacientes
Radiografía de tórax	Sin metástasis pulmonar	21
	Con metástasis pulmonar	1
Tomografía axial computada de abdomen y pelvis	Sin evidencia de metástasis (N0)	15
	Ganglios menores de 2 cm (N1)	3
	Ganglios mayores de 2 cm Menores de 5 cm (N2)	4
	Ganglios mayores de 5 cm (N3)	0

Para determinar la expresión de antígenos testiculares, MAGE A4 y SSX1 tanto en tejido como en sangre periférica de pacientes con diagnóstico de cáncer testicular confirmado por histopatología, se utilizó la prueba estadística de Chi cuadrada, con un alfa de 0.05, encontrando una pobre expresión de los mismos si se toma en cuenta todas las esitirpes histopatológicas, sin significancia estadística ( $p=0.59$  para sangre periférica y  $p= 0.24$  para tejido testicular); Aunque se puede ver una clara tendencia de expresión en aquellos pacientes con seminoma puro como diagnóstico. En el caso del gen SSX1 se realizaron puntos de corte de 0.5, determinando como sin expresión a aquellos pacientes que mostraron en sangre periférica  $<0.5$  y con expresión a aquellos pacientes donde la determinación del gen se encontró por encima de dicho punto de corte. En la contraparte de expresión del mismo gen en tejido se categorizó en tres grupos distintos, sin expresión, expresión de 0.1 a 0.5 y mayor de 0.5

Diagnóstico Histopatológico	SSX1spCAT		SSX1tejCAT		
	Sin expresión	Exp > 0.5	Sin expresión	0.1 - 0.5	Exp > 0.5
seminoma	10	1	1	3	7
mixto	10	0	5	1	4
teratoma	1	0	0	0	1
carcinoma embrionario	0	0	0	0	0
coriocarcinoma	0	0	0	0	0
saco vitelino	0	0	0	0	0
quiste eidermoide	0	0	0	0	0
atrofia	0	0	0	0	0
neoplasia intraepitelial de células germinal	0	0	0	0	0
orquiepididimitis	0	0	0	0	0

En cuanto a la expresión de MAGE A4 se realizaron 3 puntos de corte tanto para sangre periférica como para tejido. Siendo en los primeros los puntos de corte de sin expresión, de 0.1 a 0.5 y expresión de más de 0.5. Aunque se muestra que en los pacientes con expresión de > 0.5 pertenecen únicamente a seminoma, no existe una diferencia estadísticamente significativa. Para la expresión del gen en tejido testicular se tomaron los mismos puntos de corte, prácticamente sin mostrar diferencias significativas entre las variantes histológicas.

Diagnóstico Histopatológico	MAGEA4spCAT			MAGEA4tejCAT		
	Sin expresión	0.1 - 0.5	exp > 0.5	Sin expresión	0.1 - 0.5	exp > 0.5
	Recuento	Recuent o	Recuent o	Recuento	Recuent o	Recuent o
seminoma	9	0	2	4	4	3
mixto	9	1	0	5	3	2
teratoma	1	0	0	0	1	0
carcinoma embrionario	0	0	0	0	0	0
coriocarcinoma	0	0	0	0	0	0
saco vitelino	0	0	0	0	0	0
quiste eidermoide	0	0	0	0	0	0
atrofia	0	0	0	0	0	0
neoplasia intraepitelial de células germinal	0	0	0	0	0	0
orquiepididimitis	0	0	0	0	0	0

## CONCLUSIONES

La expresión de los antígenos testiculares SSX1 y MAGE A4 tanto en sangre periférica como en tejido testicular no muestra diferencias significativas, al ser comparadas todas entre sí, entre las diversas variantes histológicas; por lo tanto no nos son útiles para discernir entre ellas. Aunque existe una tendencia de expresión, en sangre periférica y tejido testicular, de SSX1 en pacientes con diagnóstico histopatológico de seminoma. Las debilidades del estudio son que no se cuenta con determinaciones suficientes en pacientes sin diagnóstico de cáncer testicular; probablemente multicausal, siendo las más importantes que existen pocas entidades nosológicas que nos obliguen a tomar muestras de tejido suficientes y también por la pobre disponibilidad en varios centros nosológicos. Así mismo, ampliar la muestra de nuestra población de estudio y analizar en una relación dicotómica las estirpes histopatológicas, en seminoma y no seminoma; tal vez arrojaría muestras positivas para el seminoma, observando la tendencia que se demostró en nuestra población.

Por el momento, dados los resultados de nuestra investigación, aún no se pueden utilizar de forma fiable los antígenos testiculares para realizar un diagnóstico oportuno de cáncer testicular, ni estadísticamente poseen una predilección en su expresión entre las distintas estirpes histopatológicas.

### 5.0 CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

- Fecha de inicio: Septiembre 2016.
- Fecha de término: Agosto 2017

	Septiembre 2016 a Mayo 2017	Septiembre 2016 a Junio 2017	Julio 2017	Agosto 2017
Reclutamiento de pacientes				
Análisis de muestras				
Procesamiento de datos				
Elaboración informe y divulgación				

## BIBLIOGRAFÍA

1. Campbell- Walsh, Urology, Tenth Edition, Elsevier, 2011, Male genitalia, Chapter 31
2. 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
3. Chaganti RS., Houldsworth J., Genetics and Biology in Adult Human Male Germ Cell Tumor, Cancer Res. 2000 Mar 15;60(6):1475-82
4. Wood HM., Elder JS., Cryptorchidism and testicular cáncer: separating fact from fiction. J Urol 2009 Feb; 18 (12): 452-61
5. 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
6. 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
7. 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
8. 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
9. WHO Histological Classification of Testis Tumors. Epstein JL., Sesterhenn IA., Eble UN., Sauter G. 2004: 250-262

10. Guy L., Vedrine N., Exploración clínica y laboratorio de Testículo; 2008; Elsevier Masson, SAS. E- 18-601-613
11. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines), Testicular Cancer. Version 2016.
12. 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.
13. Albers P., Albercht W., Algaba C. Guidelines on Testicular Cancer. European Association of Urology (2015)
14. 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
15. Kollmannsberger C<sup>1</sup>, Tandstad T<sup>2</sup>, Bedard PL<sup>2</sup>, Cohn-Cedermark G<sup>2</sup>. 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.
16. 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
17. 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
18. Classen J., Schimideberger 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
19. 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.
20. 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.
21. Linley AJ., Ahmad M., Rees RC. Tumor Associated antigens: considerations for their use in tumor immunotherapy. Int J Hematol. 2011: 93; 263-73
22. 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)
23. Hara I., Hara S., Miyake H. Expression of MAGE genes in testicular germ cell tumors. Urology 1999; 53: 843-847
24. Bode P., Thielken A., Brandt S. Cancer Testis Antigen Expression in Testicular Germ Cell Tumorigenesis. Modern Pathology (2014) 27, 899-905
25. 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
26. Tseng Chen Y., Chui R., Lee P. Chromosome X- encoded cáncer/testis antigens show distinctive expression patterns in developing gonads and in testicular seminoma. Human Reproduction, Vol. 26, No. 12 pp 3232-3243, 2011

27. 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
28. Caballero O., Chen Y. Cancer/testis (CT) antigens: Potential targets for immunotherapy. Cancer Sci. Nov 2009. Vol. 100, no.11, 2014-2021
29. Tureci O., Chen Y., Sahin U. Expression os SSX genes in Human Tumors. Int. J. Cancer: 77, 19-23 (1998)