



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

POSGRADO EN BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS
ANTÍGENOS TESTICULARES DE CÁNCER
EN LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA**

T E S I S

QUE COMO UNO DE LOS REQUISITOS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

Q.F.B. IVETH MENDOZA SALAS

DIRECTORES:

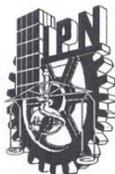
DR. ADOLFO MARTINEZ TOVAR

DR. ALFONSO MENDEZ TENORIO



MÉXICO D.F.

JUNIO 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 8:00 horas del día 20 del mes de junio del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la ENCB-IPN para examinar la tesis titulada:

Análisis de la expresión de los antígenos testiculares de cáncer en leucemia mieloide crónica

Presentada por la alumna:

Mendoza	Salas	Iveth							
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)							
		Con registro:	A	0	9	0	3	4	0

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Biomedicina y Biotecnología Molecular

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director de tesis

Dr. Alfonso Méndez Tenorio

Dr. Adolfo Martínez Tovar

Dr. Rogelio Maldonado Rodríguez

Dr. Jorge Francisco Cerna Cortés

Dr. Juan Carlos Santiago Hernández

Dra. Eva Ramón Gallegos

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Manuel Jesús Piñón López





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 20 del mes junio del año 2011, la que suscribe Iveth Mendoza Salas alumna del Programa de Biomedicina y Biotecnología Molecular con número de registro A090340, adscrito a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Adolfo Martínez Tovar y Dr. Alfonso Méndez Tenorio, cede los derechos del trabajo intitulado: "Análisis de la expresión de los antígenos testiculares de cáncer en leucemia mieloide crónica" al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones amendezt@ipn.mx, mtadolfo@starmedia.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Atentamente,



Iveth Mendoza Salas
Nombre y firma de la alumna



Dr. Adolfo Martínez Tovar
Nombre y firma del Director de tesis



Dr. Alfonso Méndez Tenorio
Nombre y firma del Director de tesis

EL PRESENTE TRABAJO FUE DESARROLLADO EN EL LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DEL SERVICIO DE HEMATOLOGIA DEL HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO O.D. BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. ADOLFO MARTÍNEZ TOVAR Y EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINFORMÁTICA GENÓMICA DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DE LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

A MIS PADRES

Por darme la maravillosa vida, por proporcionarme las herramientas para triunfar en ella, por su inmenso amor, por su esfuerzo, dedicación y por brindarme la familia más hermosa. Gracias mamá y papá por ser mi ejemplo de vida. Los amo.

A MI HERMANITA ITZEL

Porque con tu ternura y alegría me alientas a ser mejor, para ser tu ejemplo, para que te sientas orgullosa de su hermana mayor que te adora.

A MI ABUELITA

Por sus bendiciones y mimos en todas las etapas de mi vida, por recibirme siempre con una sonrisa y un arroz con leche cuando regresaba a casa tras días de ausencia.

A MAMA CLEMEN

Por ser mi apoyo desde que nací, porque me quiere como una madre y le correspondo como hija, por su increíble buen humor, porque es una tía sin igual.

A MIS AMIGOS

Any y Josh por nuestras geniales cenas "Gourmet" por estar conmigo todos los días y alentarme. Ana Silvia porque con tu peculiar forma de ser siempre consigues robarme una carcajada y me animas en todo momento. A mis amigos de la Uni, porque sus porras, porque a pesar de la distancia, los kilómetros se vuelven centímetros. A los amigueishons Sofi, Paco y por supuesto mi querido Abraham por compartir esta experiencia llamada Maestría entre bromas, estrés y más. A mi Shan, Irlanda, por tu alegría e hiperactividad, por ser mi cómplice en todo y la mancuerna perfecta en el trabajo en equipo, porque contigo todo es fácil.

A LA MAESTRA IRMA Y AL DR. ADOLFO

Por mostrarme el valor del trabajo en equipo y brindarme conocimiento y su confianza. Por su apoyo tanto en lo personal como en lo laboral, sencillamente por ser los mejores maestros. Sin ustedes nada de esto sería posible.

A MIS MAESTROS

Por brindarme su conocimiento en todo momento y hacer de la maestría una realidad.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	iv
RESUMEN	v
ABREVIATURAS	v
ABSTRACT	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 LEUCEMIA.....	1
1.1.1 LEUCEMIAS AGUDAS.....	1
1.1.1.1 DEFINICIÓN.....	1
1.1.1.2 ETIOLOGÍA	1
1.1.1.3 CLASIFICACIÓN.....	2
1.1.1.4 DIAGNÓSTICO	3
1.1.1.5 TRATAMIENTO.....	3
1.1.2 LEUCEMIAS CRÓNICAS.....	4
1.1.2.1 DEFINICIÓN.....	4
1.1.2.1 DIAGNÓSTICO	4
1.1.3 LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA.....	5
1.1.3.1 DEFINICIÓN.....	5
1.1.3.2 ETIOLOGÍA DE LA LMC	6
1.1.3.3 BCR/ABL Y EL CROMOSOMA FILADELFIA.....	6
1.1.3.4 MANIFESTACIONES CLÍNICAS	9
1.1.3.5 DIAGNÓSTICO	10
1.1.3.6 TRATAMIENTO.....	11
1.1.3.6.1 TRATAMIENTOS CONVENCIONALES.....	11
1.1.3.6.2 INHIBIDORES DE LA TIROSINA CINASA	12
1.2 ANTÍGENOS ASOCIADOS A TUMOR.....	13
1.3 ANTÍGENOS TESTICULARES DE CÁNCER	15
1.3.1 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS ATC.....	18
1.3.2 ANTÍGENOS ASOCIADOS A MELANOMA (MAGE).....	20
1.3.3 OTROS ANTÍGENOS TESTICULARES DE CÁNCER	21
1.3.4 EXPRESIÓN DE LOS ANTÍGENOS TESTICULARES DE CÁNCER EN NEOPLASIAS	22
1.3.5 INMUNOTERAPIA CON ANTÍGENOS TESTICULARES DE CÁNCER	24
2. JUSTIFICACIÓN	25
3. HIPÓTESIS	26

4. OBJETIVOS	26
4.1 OBJETIVO GENERAL	26
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	26
5.0 MATERIALES Y MÉTODOS	27
5.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN	27
5.2 CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN	27
5.3 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN.....	27
5.4 MATERIAL BIOLÓGICO	27
5.4.1 TEJIDO TESTICULAR	28
5.4.2 LÍNEAS CELULARES	28
5.4.3 INDIVIDUOS SANOS.....	29
5.4.4 PACIENTES.....	29
5.5 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	29
5.5.1 SEPARACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES	29
5.5.2 AISLAMIENTO DE mRNA.....	31
5.5.3 INTEGRIDAD, PUREZA Y CUANTIFICACIÓN DEL RNA	32
5.5.3.1 INTEGRIDAD	32
5.5.3.2 CUANTIFICACIÓN Y PUREZA	33
5.5.4 RT-PCR	34
5.5.5 DETECCIÓN DE LOS ATC MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.....	34
5.5.6 SECUENCIACIÓN DE LOS ATC	37
5.5.7 DETECCIÓN DE PROTEÍNA	37
5.5.7.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES.....	37
5.5.7.2 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA	38
5.5.7.3 TRANSFERENCIA	38
5.5.7.4 REVELADO CROMOGÉNICO	39
6.0 RESULTADOS	40
6.1 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS ATC EN TEJIDO TESTICULAR.....	40
6.2 SECUENCIACIÓN DE LOS ATC	40
6.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS ATC EN INDIVIDUOS SANOS	41
6.4 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS ATC EN LÍNEAS CELULARES	43
6.5 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS ANTÍGENOS TESTICULARES DE CÁNCER EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA.....	44
6.6 DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA MAGE-A3.....	50
6.7 CORRELACIÓN CLÍNICA DE LOS ATC EN LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA	52
6.8 DETECCIÓN DE LOS ANTÍGENOS TESTICULARES DE CÁNCER EN DIFERENTES ESQUEMAS DE TRATAMIENTO ANTINEOPLÁSICO	58
7. DISCUSIÓN	60
8. CONCLUSIONES	66
9. PERSPECTIVAS	67
10. REFERENCIAS	68
11. ANEXOS	76

INDICE DE FIGURAS

1: Representación esquemática de la translocación 9;22 y del reordenamiento BCR/ABL	7
2: Mecanismo del BCR/ABL en la célula neoplásica	8
3: Frotis de sangre periférica de una LMC en fase crónica	10
4: Mecanismo del Imatinib sobre BCR/ABL	12
5: Regulación de la expresión de los antígenos testiculares de cáncer	19
6: Separación de CMN mediante gradiente de densidad 1.077 g/cm ³	30
7: Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados por RT-PCR en tejido testicular	40
8: RNA ribosomal. Observación por electroforesis	41
9: Electroforesis del análisis de la expresión de los genes MAGE por RT-PCR en individuos sanos	42
10: Porcentaje de hombres y mujeres incluidos en el estudio	45
11: Expresión de los ATC en 65 pacientes con leucemia mieloide crónica	45
12: Fase en la que se encontraban los pacientes al momento de ser diagnosticados con Leucemia Mieloide Crónica	46
13: Electroforesis del análisis de la expresión de los genes MAGE por RT-PCR en pacientes con LMC	47
14: Detección de las proteínas β -ACTINA y MAGE	51

INDICE DE TABLAS

1: Clasificación FAB de las Leucemias Mieloides Agudas	2
2: Clasificación FAB de las Leucemias Linfoblásticas Agudas	3
3: Familia de antígenos testiculares de cáncer en el cromosoma X	16
4: Familia de antígenos testiculares de cáncer en otros cromosomas	17
5: Líneas celulares hematológicas y su enfermedad de origen	28
6: Secuencias de los primers utilizados para la detección de los genes MAGE	35
7: Volúmenes de los reactivos para PCR estandarizados	36
8: Condiciones de amplificación para los ATC	36
9: Anticuerpos utilizados en Western-Blot	39
10: Expresión de los antígenos testiculares de cáncer en 8 líneas celulares hematológicas	43
11: Expresión de los ATC en 65 pacientes con leucemia mieloide crónica	48
12: Expresión de los antígenos testiculares de cáncer en muestras de pacientes con leucemia mieloide crónica	50
13: Características del grupo estudiado	53
14: Características clínicas de los pacientes y correlación con la expresión de los genes MAGE-A3,-MAGE-B2 y MAGE-C1	55
15: Características clínicas de los pacientes y correlación con la expresión de los genes MAGE-A4.....	56
16: Características clínicas de los pacientes y correlación con la expresión de los genes BAGE-1, GAGE-2, LAGE-1 y NY-ESO-1	57
17: Frecuencia de los antígenos testiculares de cáncer (ATC) en pacientes tratados con inhibidores de tirosina cinasa y con los tratamientos convencionales	59

ABREVIATURAS

ATC: Antígenos Testiculares de Cáncer

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario (chain deoxirribonucleic acid)

CMN: Células Mononucleares

DAB: 3,3'-Diaminobenzidina

dNTP: desoxinucleotido Trifosfato

EDTA: Ácido etildiaminotetracético

g: Fuerza centrífuga relativa, en unidades g

INF- α : Interferón Alfa

KDa: Kilodaltons

LMC: Leucemia Mieloide Crónica

LMA: Leucemia Mieloblástica Aguda

LLA: Leucemia Linfobástica Aguda

LTC: Linfocito T citotóxico

MAGE: Antígenos asociados a Melanoma (Melanoma Antigens asociated)

mRNA: Acido Ribonucleico mensajero (messenger Ribonucleic acid)

MM: Mieloma Múltiple

M-MLV: Virus de Leucemia Murina de Maloney (Maloney Murine leukemya virus)

pb: Pares de bases

PBS: Solucion salina amortiguadora de fosfatos (Phospate buffer solution)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polimerase Chain Reaction)

RT: Transcriptasa Reversa (Reverse Transcriptase)

SMD: Síndrome mielodisplásico

RESUMEN

Los antígenos testiculares de cáncer (ATC) están expresados en diversos cánceres, pero no en tejido adulto normal, con excepción de células germinales de testículo, por esta característica son considerados como blancos para inmunoterapia. El objetivo de este trabajo fue estudiar el papel de estos ATC en inmunoterapia y la relación entre su expresión y el comportamiento biológico en leucemia mieloide crónica (LMC). Se identificaron 8 ATC (MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-B2, MAGE-C1, BAGE-1, GAGE-2, LAGE-1 and NY-ESO-1) en 8 líneas celulares hematológicas (K562, HL-60, Molt-4, Reh, Jurkat, Raji, Ramos, U-937), 10 muestras de médula ósea (MO) de individuos sanos y 65 muestras de MO de pacientes con LMC, mediante reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa reversa (RT-PCR) y Western-blot. En líneas celulares se detectó expresión de los ATC, la cual fue nula en individuos sanos. K562 expresó los 8 HL-60: MAGE-A3, MAGE-B2 y GAGE-2, en Reh: MAGE-A3, en U-937: GAGE-2, las 4 líneas restantes no expresaron ninguno de los ATC. Las frecuencias en los pacientes con LMC fueron: MAGE-A3 32,3%, MAGE-B2 1,5%, MAGE-C1 3,0%, MAGE-A4 63,6%, BAGE-1 6,6%, GAGE-2 20,0%, LAGE-1 13,3% y NY-ESO-1 36,6%. La correlación entre la expresión de los genes y los parámetros clinicopatológicos fue, MAGE-A3 en sexo con una $p=0,018$, MAGE-C1: leucocitos $p=0,014$ y plaquetas $p=0,002$ y finalmente LAGE-1 plaquetas $p=0,001$. Se detectó la proteína MAGE-A3 en los pacientes positivos a nivel de mRNA. Además, se analizaron 10 muestras de pacientes bajo tratamientos convencionales (Hidroxiurea e interferon alfa) y 13 con inhibidores de tirosina cinasa (Imatinib, Nilotibib, Dasatinib). Había una expresión aumentada para ambos tratamientos de MAGE-A3, en inhibidores de tirosina cinasa 69,2% y convencionales 50,0%, de MAGE-A4 53,8% y 20,0%, NY-ESO-1 0% y 20,0% respectivamente. Los ATC podían utilizarse como antígenos específicos en inmunoterapia en LMC, siendo de gran importancia en enfermedad la mínima residual y en aquellos pacientes que son resistentes a la quimioterapia.

ABSTRACT

Cancer-testis antigens (CTAs) are expressed in a variety of cancers, but not in normal adult tissues, except for germ cells of the testis, and hence appear to be ideal targets for immunotherapy. The objective was to study the role of cancer-testis antigens as targets for immunotherapy and the relationship between corresponding gene expression and biologic behavior of chronic myeloid leukemia (CML). We screened 8 hematologic cell lines (K562, HL-60, Molt-4, Reh, Jurkat, Raji, Ramos, U-937), bone marrow (BM) samples from 10 healthy donors, testicular tissue and 65 CML patients by transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and western-blot for the expression of 8 CTAs (MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-B2, MAGE-C1, BAGE-1, GAGE-2, LAGE-1 and NY-ESO-1). In hematologic cell lines we detected the expression that were absent from normal BM, in K562 was detected all CTA, in HL-60 was detected MAGE-A3, MAGE-B2 and GAGE-2, in Reh MAGE-A3, in U-937 GAGE-2 the rest of cell lines expressed none CTA. The frequencies at which CTAs were found to be expressed in CML patients were MAGE-A3 32,3%, MAGE-B2 1,5%, MAGE-C1 3,0%, MAGE-A4 63,6%, BAGE-1 6,6%, GAGE-2 20,0%, LAGE-1 13,3% and NY-ESO-1 36,6%. In these samples, the expression of some genes correlated with several clinicopathological parameters, leucocytes and platelets for MAGE-C1 $p=0.014$, $p=0,002$ respectively, sex for MAGE-A3 $p=0,018$ and finally platelets for LAGE-1 $p=0,001$. There was no relationship between CTAs expression and prognosis. The MAGE-A3 protein was detected in some positive samples of mRNA. In addition, we examined some CML samples treated with 10 conventional chemotherapeutics (Hydrea and INF- α) and 13 Tyrosine kinase inhibitors (Imatinib, Nilotinib and Dasatinib). There was an increased expression of MAGE-A3 in both tyrosine kinase inhibitors (69,2%) and conventional treatments (50,0%), MAGE-A4 53,8% and 20,0%, NY-ESO-1 0% and 20,0%. These genes serve as targets for antigen-specific immunotherapy in CML. CTAs antigen-specific immunotherapy might represent a promising approach for the eradication of residual therapy-resistant leukemic cells due to its frequent expression and stability under imatinib treatment.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LEUCEMIA

La leucemia es una enfermedad neoplásica progresiva del sistema hematopoyético, caracterizada por la proliferación no regulada de las células progenitoras. Incluye a un grupo heterogéneo de neoplasias que difieren respecto a su agresividad, célula de origen, características clínicas y respuesta al tratamiento (McKenzie, 2002). La enfermedad se clasifica en dos grupos con base en la agresividad de la enfermedad: leucemias agudas y leucemias crónicas

1.1.1 LEUCEMIAS AGUDAS

1.1.1.1 DEFINICIÓN

Las leucemias agudas son proliferaciones clonales malignas de células hematopoyéticas inmaduras de tipo blástico que pueden afectar médula ósea, sangre periférica y otros tejidos (Sanz-Sabrafen, 2001).

1.1.1.2 ETIOLOGÍA

La etiología de las leucemias agudas se desconoce. Los factores genéticos tienen una gran importancia. Diversas enfermedades congénitas, como la anemia de Fanconi, la ataxia talangiectásica y el síndrome de Down, entre otros, se asocian con un riesgo leucémico incrementado. (Butturini, 1992). Entre los factores externos involucrados, la radiación ocupa un lugar importante, el aumento de pacientes con leucemia observado después de las explosiones atómicas y el tratamiento radioterápico así lo demuestran. El benceno (Bollati *et al.*, 2007) es el leucemógeno químico más conocido, como se ha demostrado por el aumento de leucemias agudas en trabajadores de industrias que lo manejan. Por último, no se ha demostrado de forma convincente una etiología vírica.

1.1.1.3 CLASIFICACIÓN

Hay dos categorías principales de leucemias agudas, clasificadas de acuerdo con el origen celular del defecto primario de la célula progenitora. Si la alteración ocurre en la célula progenitora mieloide la leucemia se clasifica como Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA), si afecta a una célula progenitora linfoide, adquiere el nombre de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA). Los parámetros más confiables para definir a las células neoplásicas y clasificar las leucemias agudas en categorías y subgrupos principales son combinaciones del criterio morfológico FAB (French American-British, 2008) (tabla 1 y 2).

Tabla 1. Clasificación FAB de las leucemias mieloides agudas.

CLASIFICACIÓN	CARACTERÍSTICAS
M0	Leucemia mieloblástica aguda sin diferenciación localizada.
M1	Leucemia mieloblástica aguda sin maduración.
M2	Leucemia mieloblástica aguda con maduración.
M3	Leucemia promielocítica aguda (con translocación t(15;17)).
M4	Leucemia mielomonocítica aguda.
M4 eo	Leucemia mielomonocítica aguda con eosinofilia en médula ósea.
M5	Leucemia monocítica aguda (LMoA).
M5a	LMoA sin diferenciación (mieloblástica).
M5b	LMoA con diferenciación (monocítica).
M6	Eritroleucemia aguda; son precursoras de globulos rojos.
M7	Leucemia megacariocítica aguda.

Tabla 2. Clasificación FAB de las leucemias linfoides agudas.

CARACTERÍSTICAS CITOLÓGICAS	LLA-L1	LLA-L2	LLA-L3 (Tipo Burkitt)
Tamaño de la célula	Pequeñas	Grande heterogéneo	Grande homogéneo
Cromatina nuclear	Homogénea	Variable, heterogéneo	Finamente punteada y homogénea
Forma nuclear	Regular	Irregular	Regular-oval
Nucleolos	No visibles	Uno o mas, grandes	Prominentes
Cantidad de citoplasma	Escaso	Variable	Moderadamente abundante
Basofilia del citoplasma	Ligera	Variable	Muy intensa
Vacuulación citoplásmica	Variable	Variable	Prominente

1.1.1.4 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico se realiza mediante una biometría hemática y una toma de médula ósea, en ambos casos se tiñen para realizar el examen citomorfológico. Se incluye también un inmunofenotipo y estudios de biología molecular para la identificación de los genes afectados.

1.1.1.5 TRATAMIENTO

En cuanto al tratamiento se utiliza generalmente el ácido all-transretinoico (ATRA) en el caso de la LMA-M3 y el tiróxido de arsénico para el caso de la LMA. Para la LLA se utilizan Vincristina, Prednisona y Daunorubicina. En ambos tipos de leucemia aguda se puede manejar un trasplante de progenitores ya sea mieloide o linfoides según lo requiera el paciente (Thomas *et al.* 2004).

1.1.2 LEUCEMIAS CRÓNICAS

1.1.2.1 DEFINICIÓN

En las leucemias mieloides crónicas la médula exhibe una acumulación de elementos linfocíticos (Leucemia Linfocítica Crónica, LLC) o mieloides (Leucemia Mieloide Crónica, LMC) diferenciados. Estas células se vierten hacia el interior de la sangre periférica y producen leucocitosis, las cifras diferenciales (arriba de 50×10^3 UL) de la médula ósea y de la sangre periférica son similares con todas las etapas de maduración presentes (OMS, 2001).

Las leucemias crónicas progresan más lentamente, el curso de la enfermedad se mide en años más que en meses, como es el caso para las leucemias agudas.

1.1.2.2 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico se establece frecuentemente durante un examen físico en relación con molestias inespecíficas del paciente tales como pérdida de peso o debilidad.

1.1.3 LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

1.1.3.1 DEFINICIÓN

La leucemia mieloide crónica (LMC), el síndrome proliferativo crónico (SPC) de mayor importancia clínica por su frecuencia y pronóstico, es una proliferación de carácter clonal que tiene su origen en una célula madre (*stem cell*) pluripotencial común a las tres series hematopoyéticas (Fialkow *et al.*, 1978). El cuadro clínico, biológico e histológico de la enfermedad viene determinado por una intensa proliferación de la serie granulocítica en la médula ósea, la sangre periférica y otros órganos hematopoyéticos, fundamentalmente el bazo.

La LMC se caracteriza por una leucocitosis intensa, en la que están presentes todos los elementos madurativos de la granulopoyesis, acompañada a menudo de esplenomegalia y de una disminución de la fosfatasa alcalina granulocitaria (FAG).

Desde el punto de vista biológico, el hecho que confiere a la LMC una mayor personalidad es la presencia de una anomalía cromosómica en la médula ósea, (el cromosoma Filadelfia o Ph) (Nowell y Hungerford 1960), cuya contrapartida molecular es el gen BCR/ABL reflejo del intercambio de material genético entre los cromosomas 9 y 22 en las células hematopoyéticas. La enfermedad presenta, típicamente, un curso evolutivo bifásico en la fase inicial o crónica, fácil de controlar con diferentes medidas terapéuticas, sigue un periodo agudo final o crisis blástica, similar a una leucemia aguda, pero de pronóstico mucho más desfavorable por su resistencia al tratamiento. En muchos pacientes se intercala entre ambas fases un tercer período, la llamada fase de aceleración (Telegeev *et al.* 2004).

1.1.3.2 ETIOLOGÍA DE LA LMC

La etiología de la LMC se desconoce, aunque se ha observado un aumento de su incidencia tras la exposición a radiaciones ionizantes (en supervivientes de las explosiones atómicas, radiólogos y pacientes con espondilitis anquilosante tratados con radioterapia sobre la columna vertebral) o a ciertos agentes químicos como el benceno. No se ha podido demostrar la implicación del virus en la aparición de la enfermedad.

La presencia del cromosoma Ph en los precursores granulocíticos, eritrocíticos, megacariocíticos, en los linfocitos B y en algunos linfocitos T de los individuos con LMC, indica que el trastorno que da lugar a la enfermedad tiene lugar en una célula madre pluripotencial muy primitiva de la hematopoyesis (Fialkow *et al.*, 1978).

1.1.3.3 BCR/ABL Y EL CROMOSOMA FILADELFIA

El cromosoma Ph es un trastorno adquirido, el cual consiste en la pérdida de material del cromosoma 22 por translocación al cromosoma 9 (Rowely, 1973) $t(9;22)(q34;q11)$ (Bianchi *et al.* 1995). Está presente en las células del 100% de los pacientes con LMC (Bianchi *et al.* 1995). Dicha alteración citogenética no es exclusiva de la LMC, pues también se observa en el 20% de las leucemias agudas linfoblásticas del adulto, en el 5% de las leucemias agudas de la infancia y en menos del 3% de las leucemias agudas mieloblásticas.

Mediante técnicas de biología molecular se ha podido demostrar que la translocación entre los cromosomas 9 y 22 es recíproca, es decir, que el cromosoma 9 también transfiere parte del material genético de sus brazo largo al cromosoma 22. (De Klein *et al.*, 1982).

En este último, los puntos de ruptura se agrupan en una pequeña región de 5.8 kilobases denominada BCR por sus siglas en inglés *breakpoint cluster región* (región de fractura) (Groffe *et al.*, 1983), constituyendo el oncogén BCR/ABL al unirse a al material procedente del cromosoma 9 o protooncogén ABL (Heisterkamp *et al.*, 1983), (figura 1).

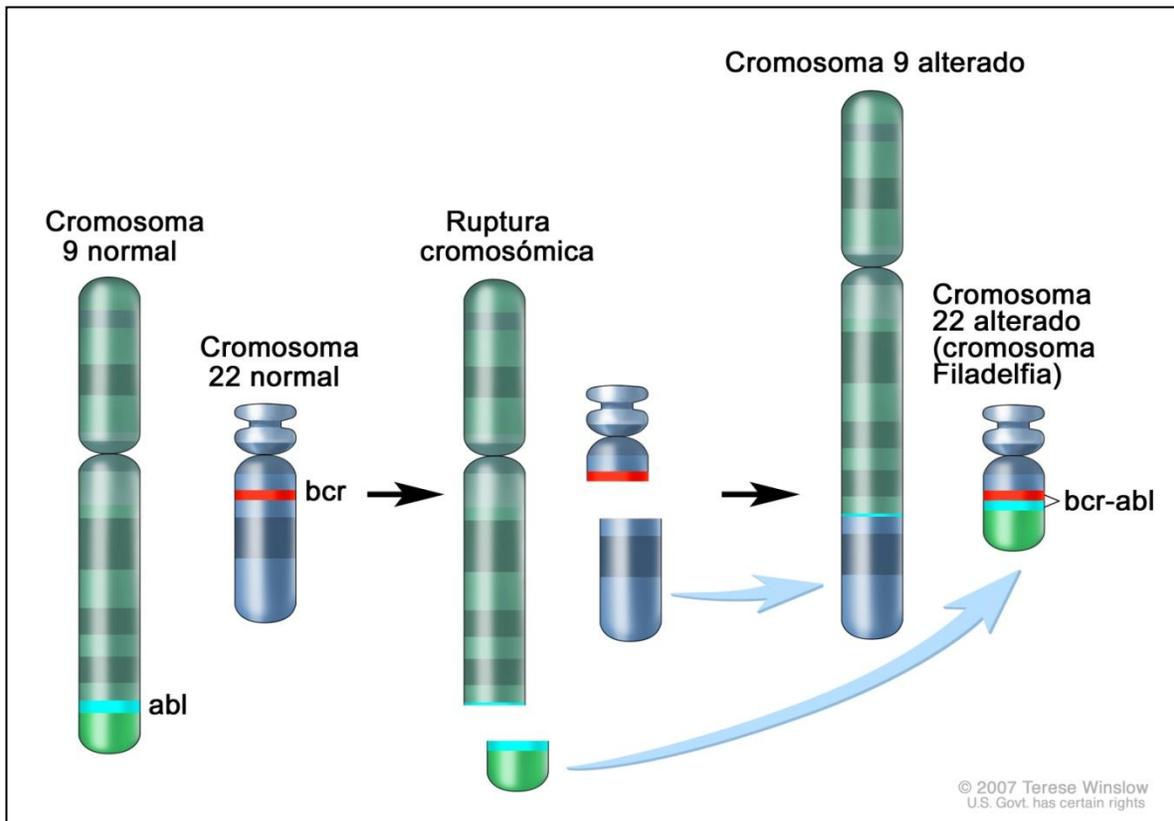


Figura 1. Representación esquemática de la translocación 9;22 y del reordenamiento BCR/ABL. Un fragmento del cromosoma 9 el cual lleva el gen ABL se une a la región BCR del cromosoma 22 lo cual dará como resultado la formación del cromosoma filadelfia.

El producto de BCR es una proteína serina treonina cinasa (Maru y Witte, 1991). La ruptura del gen ABL se localiza usualmente en el intron 5' del exón 2 (Shtivelman *et al.*, 1986).

EL oncogén BCR/ABL da lugar a un RNA mensajero quimérico de 8.5 kilobases, que codifica la síntesis de una proteína tirosincinasa de 210 kDa, encargada de regular el crecimiento y proliferación celular (figura 2), cuya actividad está aumentada (Shtivelman *et al.*, 1987). Esta proteína es la responsable de la transformación neoplásica de las células hematopoyéticas.

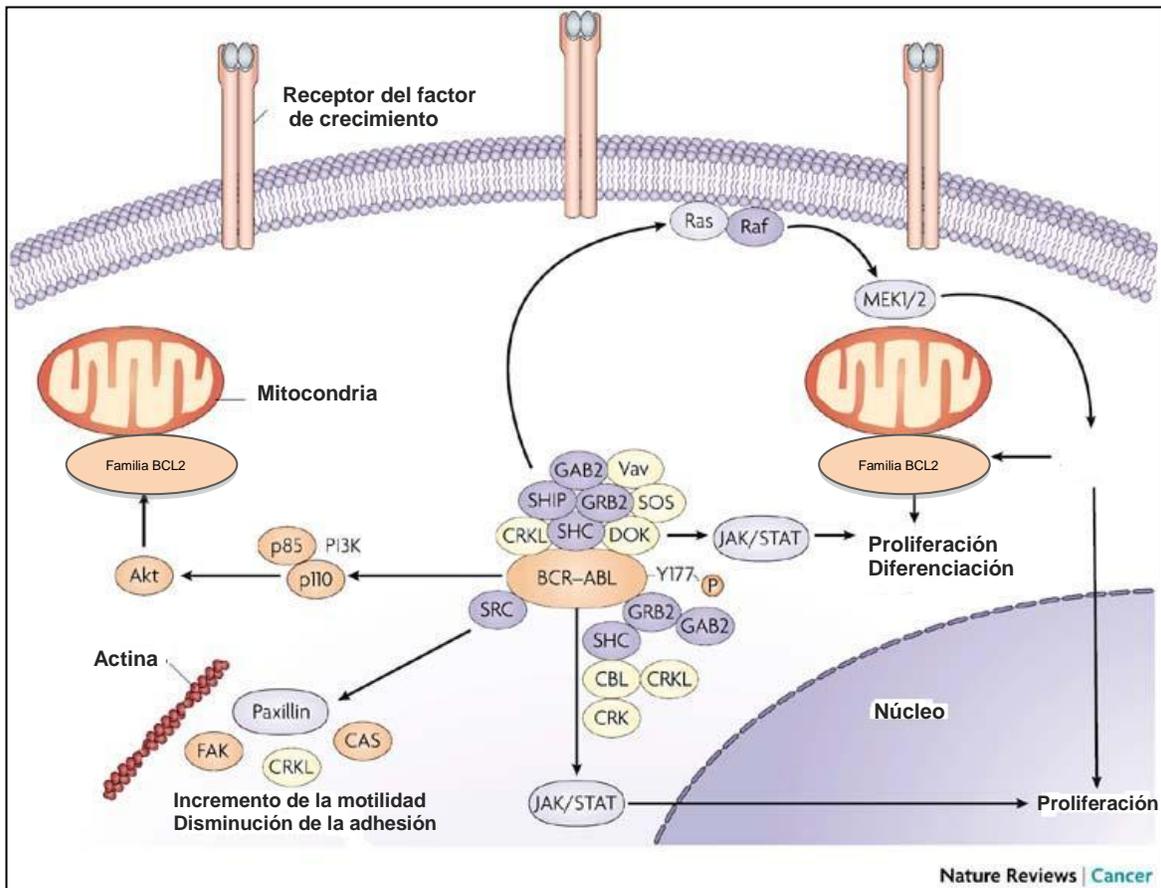


Figura 2. Mecanismo del BCR/ABL en la célula neoplásica. Mediante la activación de las vías JAK/STAT y BCL2 se logra la proliferación descontrolada de las células neoplásicas.

Existen otras formas de la proteína BCR/ABL, las principales son las siguientes: La p210 que, como ya se mencionó, se ha encontrado en la mayoría de los casos de LMC y en 50% de los casos de LLA, la p185 la cual solo se encuentra en LLA y la p230 que se encuentra en leucemia neutrofílica crónica (LNC) (Pane *et al.*, 1998; Martinelli *et al.*, 2002).

1.1.3.4 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La LMC se diagnóstica en el 100% de los pacientes en la llamada fase crónica, cuyo inicio es habitualmente insidioso. El diagnóstico de la enfermedad va precedido en muchos enfermos por un período de unos meses en los que presentan síntomas inespecíficos (astenia, anorexia, pérdida de peso, febrícula, sudoración nocturna), en relación con la existencia de un estado de hipermetabolismo debido al aumento del intercambio granulocitario, o molestias provocadas por la esplenomegalia. Otras manifestaciones clínicas como los dolores óseos, hemorragias, litiasis renal, crisis de gota o priapismo, son mucho menos frecuentes (Cervantes *et al.*, 1996).

En la exploración física, el dato más frecuente es la esplenomegalia. Dicho hallazgo se constata actualmente en el 60% de los pacientes, siendo variable el tamaño del bazo (desde un polo del bazo hasta la ocupación de todo el abdomen). En un tercio de los enfermos se detecta hepatomegalia moderada. El hallazgo de adenopatías, lesiones cutáneas infiltrativas u osteólisis en el estudio radiológico es raro y se debe sospechar en todos los casos de la existencia de una crisis blástica extramedular.

1.1.3.5 DIAGNÓSTICO

El cuadro clínico-hematológico de la LMC (leucocitosis granulocítica, con basofilia, disminución del índice de FAG y esplenomegalia) es tan típico que solo su observación permite, casi siempre, establecer con certeza el diagnóstico de la enfermedad. La demostración del cromosoma Ph en la médula ósea o del gen de fusión BCR/ABL en la sangre periférica confirman el diagnóstico (figura 3).

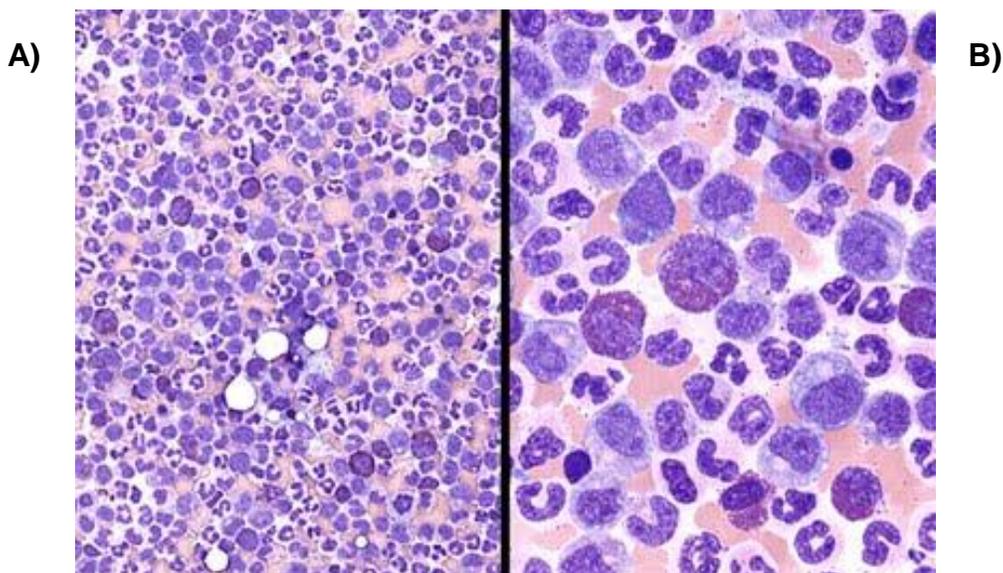


Figura 3. Frotis de sangre periférica de una LMC en fase crónica. A) Observación en 40X se aprecia un considerable número de células hematopoyéticas de todos los linajes y niveles de maduración, b) Acercamiento a 100X predominan los neutrofilos y se pueden observar blastos.

Se considera al cromosoma Ph como marcador genético de la LMC y su detección se ha usado para confirmar el diagnóstico y monitorear la enfermedad. Debido a que las técnicas citogenéticas tienen un límite de sensibilidad, se implementó una técnica más sensible, la reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa reversa (RT-PCR), para detectar el re-arreglo (Salto *et al.*, 2003).

1.1.3.6 TRATAMIENTO

Se distinguen dos tipos de tratamientos, los convencionales (INF- α , hidroxiurea, busulfán y trasplante de progenitores hematopoyéticos) y los más recientes, inhibidores de la transducción de señal tirocin-cinasa, imatinib y análogos que van dirigidos contra la proteína de BCR/ABL (Sanz *et al.*, 2001).

1.1.3.6.1 Tratamientos convencionales

La quimioterapia convencional proporciona a los pacientes una excelente calidad de vida y alarga su supervivencia pero no evita la aparición de la crisis blástica. El fármaco de elección es la **hidroxiurea**, inhibidor de la enzima ribonucleótido-reductasa que actúa bloqueando la síntesis de DNA, provocando la detención de las células en la fase S del ciclo celular.

Otro quimioterapéutico oral, el **busulfán**, fármaco alquilante de efecto radiomimético, constituyó durante muchos años la base del tratamiento convencional de la LMC, pero en la actualidad prácticamente ha dejado de utilizarse.

El **interferón alfa** (INF- α) constituía hasta hace poco el tratamiento de elección de la fase crónica de la LMC en los pacientes jóvenes sin donantes para el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos y en la mayoría de los enfermos restantes (de edad inferior a 70 años). Se trata de una glucoproteína con propiedades antiproliferativas, antivíricas e inmunomoduladoras, producida de manera natural por las células como respuesta a las infecciones víricas. Lo que hace más interesante al interferón es que, además de producir respuestas hematológicas (normalización de los valores hematológicos con desaparición de la sintomatología y esplenomegalia) es capaz de inducir respuestas citogenéticas, esto es, la disminución e incluso desaparición del cromosoma Ph.

El **transplante alogénico de progenitores hematopoyéticos** es la única modalidad terapéutica con capacidad curativa demostrada de la LMC (Luetkens *et al.*, 2010). Sus principales limitaciones son la edad de los pacientes y la disponibilidad de un donante histocompatible. Los resultados más favorables se obtienen cuando el transplante se efectúa en la fase crónica, en la que se consigue una supervivencia libre de enfermedad del 60% (Sokal *et al.*, 1984). Este porcentaje se reduce al 25% en la fase de aceleración y a menos del 10% en la crisis blástica.

1.1.3.6.2 Inhibidores de la tirosina cinasa

El Imatinib (antes STI571) y análogos (Nilotinib y Dasatinib) representan el avance más importante de los últimos años en el tratamiento de la LMC, constituyendo el paradigma de la terapéutica basada en el conocimiento de la biología y fisiopatología de una neoplasia. Se trata de un inhibidor de la transducción de señal específico de la proteína tirosina cinasa BCR/ABL. Actúa compitiendo con el ATP para unirse a la cinasa ABL, impidiendo así la fosforilación de la tirosina cinasa (figura 4). Ello da lugar a la pérdida de actividad de la función de la proteína y, como resultado, a la pérdida de viabilidad de las células leucémicas, que entran en apoptosis.

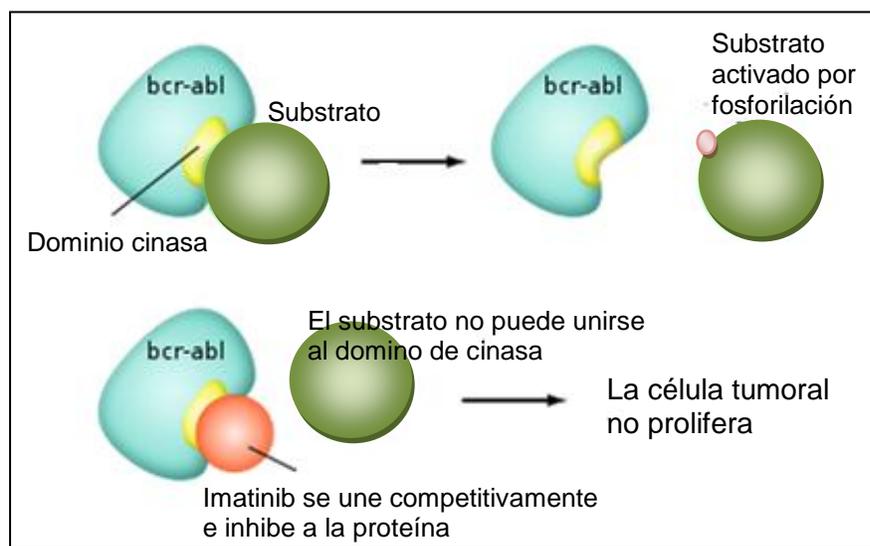


Figura 4. Mecanismo del Imatinib sobre BCR/ABL. El imatinib se une competitivamente al dominio cinasa impidiendo la proliferación de la proteína BCR/ABL.

La administración de Imatinib en dosis superiores a 300 mg/día induce respuestas hematológicas completas en la mayoría de los pacientes con LMC en fase crónica resistentes al INF- α o con intolerancia a este fármaco, con una tasa de respuesta completa molecular (RCM) del 60%, entre las que se incluyen un 41% de respuesta citogenética completa (RCC). En la fase crónica de un nuevo diagnóstico, la tasa de respuesta hematológica al Imatinib es del 95%, la de RCM del 87% y la de RCC del 76% a los 18 meses, lo que va acompañado de una tasa menos de progresión de la enfermedad respecto a la combinación de INF- α y Ara-C. Estos resultados han permitido establecer al Imatinib como el tratamiento de elección en la LMC de nuevo diagnóstico (O'Brien *et al.*, 2003).

Así como el Imatinib, **Nilotinib** es un inhibidor de la tirosina cinasa de primera línea que se dirige preferentemente a BCR/ABL in vitro y tiene una eficacia y seguridad demostradas en el tratamiento de la LMC en los adultos resistentes o intolerantes al menos a un tratamiento anterior, incluso Imatinib (Kantarjian *et al.*, 2006).

En lo que respecta a **Dasatinib** está indicado para el tratamiento de adultos con LMC en fase crónica, acelerada o blástica, con resistencia o intolerancia al tratamiento previo, incluido el Imatinib. Además, está indicado para el tratamiento de adultos con leucemia linfoblástica aguda (LLA) con cromosoma Ph+ y crisis blástica linfoide procedente de LMC con resistencia o intolerancia al tratamiento previo.

1.2 ANTÍGENOS ASOCIADOS A TUMOR

Además del oncogén BCR/ABL, las células de LMC sufren cambios (epigenéticos) en los patrones de metilación, que provocan el encendido de algunos genes tales como los antígenos asociados a tumor (AAT) los cuales han sido considerados como posibles blancos en la terapia contra el cáncer, especialmente inmunoterapia (Linley *et al.*, 2011), debido a que son péptidos que suelen ser presentados a los linfocitos T citotóxicos autólogos (LTCD8⁺) por la clase I de los antígenos leucocitarios humanos (HLA). Estos antígenos asociados a tumor podrían constituir un blanco para inmunoterapias específicas (Jones *et al.*, 1991; Chambost *et al.*, 2000).

Dentro de los AAT, existe una clase de antígenos llamados antígenos asociados a leucemia (AAL) que como su nombre lo indica, se han descubierto en enfermedades hematológicas principalmente en leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica y síndromes mielodisplásicos ([Guinn](#), *et al.*, 2005; Hoffman 2010).

Algunos ejemplos de AAL son las proteínas quiméricas, resultado de translocaciones cromosomales, por ejemplo PML-RAR α en leucemia promielocítica aguda y p210 (BCR/ABL) en leucemia mieloide crónica, la proteínasa 3, la cual está presente en células de leucemia pero también en promielocitos normales; la mucina MUC-1 en mieloma; la proteína PRAME que está sobreexpresada en varias leucemias agudas; proteínas virales tales como LMP1 y LMP2 en linfomas asociados con infecciones por el virus de Epstein-Barr, algunos otros como BAGE, OFA-iLRP, FLT3-ITD, G250, hTERT, RHAMM and WT-1, (Hoffman,2010), y finalmente antígenos testiculares de cáncer (ATC) los cuales se han encontrado activos en células tumorales pero no en células normales, a excepción de las germinales (Maio *et al.*, 2003).

La identificación de blancos moleculares es crucial para el desarrollo de inmunoterapias dirigidas hacia AAT. Los antígenos testiculares de cáncer son un grupo de genes que comprende alrededor de 40 familias, los cuales han sido considerados como blancos inmunoterapéuticos prometedores debido a la característica de activar el sistema inmune en pacientes con cáncer (Scanlan *et al.*, 2002).

1.3 ANTÍGENOS TESTICULARES DE CÁNCER

Los ATC son un grupo diverso de proteínas que están expresados de manera normal únicamente en tejido testicular y placenta y la razón por la cual no son reconocidos por los LTCD8⁺ es porque las células de estos tejidos no tienen en su superficie el HLA. Están presentes también en algunos tumores sólidos (Bao, *et al.*, 2011). Por lo anterior, se han considerado antígenos estrictamente específicos de tumor y su principal ventaja es que son reconocidos por los LTCD8⁺ los cual desencadena una respuesta inmune contra ellos.

Los genes de los ATC fueron identificados por diversas técnicas experimentales las cuales incluyen el SEREX (de las siglas en inglés clonación serológica de expresión), análisis de expresión de mRNA y clonación de los epítopes de los LTCD8⁺.

Conforman varias familias (tablas 3 y 4) y se encuentran ubicados a lo largo de todos los cromosomas. Una de las más importantes es la que corresponde a los genes MAGE (antígenos asociados a melanoma) la cual es de las más grandes e, históricamente, la primera en describirse (Artamova *et al.*, 2004).

Recientemente se ha propuesto que las proteínas de los ATC podrían estar implicadas en las vías de diferenciación de las células progenitoras o *stem cells* (Costa *et al.*, 2007).

Tabla 3. Familias pertenecientes a los ATC en el cromosoma X. Nat Rev Cancer 2005

Familia	Identificación CT	Número de genes en la familia	Cromosoma	Expresión durante la maduración germinal	Función
MAGE A	CT1	12	Xq28	Espermatogonia	Co-represor transcripcional
MAGE B	CT3	4	Xp21-p22	Migración de PGCs	desconocido
GAGE1	CT4	8	Xp11.4-p11.4	ND	desconocido
SSX	CT5	5	Xp11.23-p11.22	ND	Represor transcripcional
NY-ESO-1	CT6	3	Xq28	Espermatogonia	desconocido
MAGEC1	CT7	2	Xq26, Xq27.2	ND	desconocido
MAGEC2	CT10	1	Xq27	ND	desconocido
CTp11/SPANX	CT11	4	Xq27.1	Espermátidas	desconocido
XAGE1/GAGED	CT12	8	Xp11.22-p11.21	ND	desconocido
SAGE1	CT14	1	Xq26	ND	desconocido
PAGE5	CT16	2	Xp11.22	ND	desconocido
NA88	Ct18	1	Xp22.12	ND	desconocido
IL13RA1	CT19	1	Xq24	ND	Receptor de IL-13
CSAGE	CT24	2	Xq28	ND	desconocido
CAGE	CT26	1	Xp22.13	Espermátidas espermatozoides	Posible helicasa
HOM-TES-85	CT28	1	Xq23	ND	Posible proteína reguladora de transcripción
E2flike/HCA661	CT30	1	Xq26.2	ND	Factor de transcripción
NY-SAR-35	CT37	1	Xq28	ND	desconocido
FTHL17	CT38	1	Xp21	espermatoginia	Posible proteína de unión a ferritina
NXF2	CT39	1	Xq22.1	espermatogonia	Transportador de mRNA al citoplasma
TAF7L	CT40	1	Xq22.1	espermatogonia	Posible unión a la caja TATA
FATE1	CT43	1	Xq28	ND	desconocido

CAGE: cáncer antigen 1; CSAGE: chondrosarcoma-associated gene 1; FATE1: fetal and adult testis expressed 1; FTHL17: ferritin, heavy polypeptide-like 17; GAGE1: G antigen 1; IL13RA1: interleukin-13 receptor- α 1; MAGE: melanoma antigen; ND: no determinado. NXF2: nuclear RNA export factor 2; NY-ESO-1: New York oesophageal squamous cell carcinoma 1; NY-SAR-35: New York sarcoma 35; PAGE5: P antigen family member, 5; PGCs: primordial germ cells; SAGE1: sarcoma antigen 1; SPANX: sperm associated with de nucleus, X chromosome; SSX: sinovial sarcoma; TAF7L, TAF7-like RNA polymerase II; TATA box binding protein associated factor; XAGE1: Xantigen family, member 1.

Tabla 4. Familia de antígenos testiculares de cáncer en otros cromosomas. Nat Rev Cancer 2005

Familia	Identificación CT	Número de genes en la familia	Cromosoma	Expresión durante la maduración germinal	Función
BAGE	CT2	5	13	espermatogonia	Desconocido
SCP1	CT8	1	1p13-p12	espermatocito	Componente estructural de los complejos sinaptonemales
BRDT	CT9	1	1p22.1	ND	Posible proteína reguladora de transcripción
HAGE	CT13	1	6q12-q13	ND	Helicasa de RNA dependiente de ATP
ADAM2	CT15	1	8p11.2	Espermatocitos, espermatidas	Unión de la membrana del ovulo al esperma
LIP1	CT17	1	21q11.2	ND	Fosfolipasa asociada a membrana
TSP50	CT20	1	3p14-p12	espermatocito	Proteasa
CTAGE1	CT21	2	18p11.2	ND	Desconocido
SPA17	CT22	1	11q24.2	Espermatocito, round espermatidas	Unión del esperma a la zona pelúcida, Otras funciones de adhesión celular
OY-TES-1	CT23	1	12p13.31	espermatocitos, espermatidas	Unión a proacrosina para mediar la condensación del zimógeno através de la matriz aerosomal
DSCR8 ó MMA1	CT25	2	21q22.2	ND	Desconocido
BORIS	CT27	1	20q13.31	espermatocito	Contiene 11 dedos de zinc, posible proteína de regulación transcripcional
AF15q14 ó D40	CT29	1	15q14	ND	Posible supresor de proliferación celular
PLU-1	CT31	1	1q32.1	espermatogonia	Represión transcripcional
LDHC	CT32	1	11p15.6- p15.3	espermatocito	cataliza la conversión de L-lactato y NAD a piruvato y NADH en el paso final de la glucólisis anaerobia
MORC	CT33	1	3q13	espermatogonia	Actua sobre la espermatogenesis afectando la entrada a apoptosis
SGY1	CT34	1	19q13.33	ND	Transducción de señales
SPO11	CT35	1	20q13.2-q13.3	Espermatocito	Corte de dobles cadenas, en pares de cromosomas homologos
TPX1	CT36	1	6p21-qter	espermatocito	Media la unión de las células espermatogénicas a las células de Sertoli
TDRD1	CT41	2	10q26.11	espermatogonia	Proteína de unión a RNA
TEX15	CT42	1	8p12	espermatogonia	Desconocido
TPTE	CT44	1	21p11	Espermatocito secundario y/o pre-espermatida	PTEN.related tyrosine phosphatase

ADAM2: a disintegrin and metalloproteinasa domain 2; BAGE: B melanoma antigen; BORIS: brother of the regulator of imprinted sites; BRDT: Bromodomain, testis específico; CTAGE1: cutaneous T-cell lymphoma-associated antigen 1; DSCR8: Down síndrome critical región gene 8; LDHC: lactate dehydrogenase C; LIP1: lipase member 1; MMA1: malignant melanoma associated protein 1; MORC microchordia homologue (mouse); **ND**: not determined; SCP1: synaptonemal complex protein 1; SPA17: sperm autogenic protein 17; SPO11: Sporulation protein, meiosis specific; TDRD1: tudor domain containing 1; TPX1: testis specific protein 1; TEX15: testis expressed sequence 15; TPTE: transmembrane phosphatase with tensin homology; TSP50: testes-specific protease 50.

1.3.1 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS ATC

La expresión de estos genes está regulada por factores epigenéticos, (metilación y acetilación) (Barker *et al.*, 2002). El patrón de metilación de DNA se genera durante el desarrollo embrionario (Otto y Walbot, 1990). Las alteraciones en la metilación del DNA ocurren durante la patogénesis de los tumores, puesto que se ha observado hipometilación en varios carcinomas. Lo anterior sugiere que la hipermetilación del DNA así como la hipometilación juegan un papel muy importante en la tumorigénesis y que la activación transcripcional es debida a la desmetilación del promotor (Esteller *et al.*, 2002) (figura 5).

La hipermetilación de los dinucleótidos CpG del extremo 5' de MAGE-A1, MAGE-A3 y NY-ESO-1 (Rao *et al.*, 2011) previene el acceso de los activadores Ets y Sp1 y por tanto evita la inducción del promotor. Estos hallazgos indican una relación entre la hipermetilación del DNA y la represión transcripcional del promotor del gen MAGE-A1. Otros genes MAGE, como B y C presentan el mismo patrón de expresión.

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

Gjestorff en 2009 encontró que si se inducía la hipometilación y la acetilación de histonas en los promotores de células madre mesenquimales se expresaban los antígenos testiculares MAGE-A, GAGE y XAGE-1, entre otros.

Lo anterior da como resultado que tanto la metilación del DNA así como la desacetilación de histonas están involucrados en el silenciamiento de los genes MAGE-A (Wischnewski, 2006).

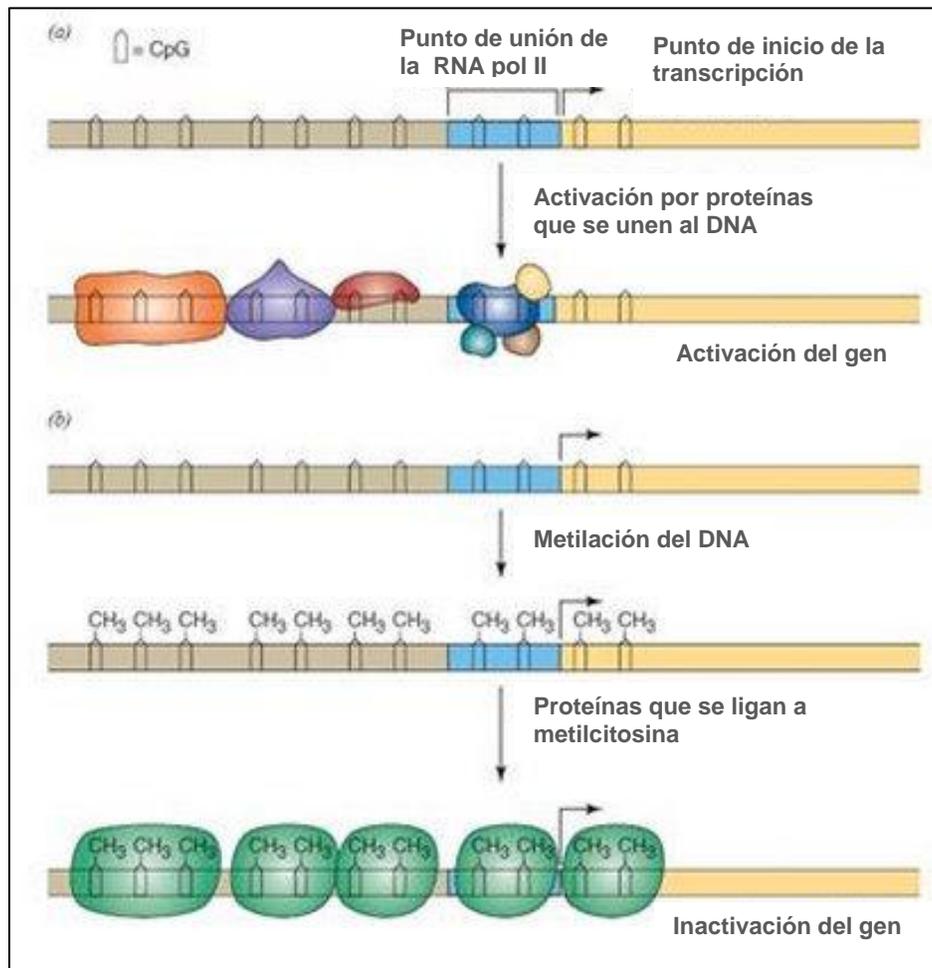


Figura 5. Regulación de la expresión de los antígenos testiculares de cáncer. Están regulados transcripcionalmente por patrones de metilación, cuando existe un estímulo externo se produce una hipometilación en el promotor provocando que este se active.

1.3.2 ANTÍGENOS ASOCIADOS A MELANOMA (MAGE)

Fueron identificados inicialmente en melanoma (van der Bruggen *et al.*, 1999). Los genes de la familia MAGE-A se encontraron en una gran variedad de cánceres a pesar de que su expresión estaba limitada a células germinales de testículo, ovario y placenta.

Los genes de la familia MAGE-A, MAGE-B y MAGE-C están expresados en células germinales y en células de cáncer, mientras que los genes restantes de la familia MAGE, sobre todo MAGE-D y NECDIN/MAGE-L2 se expresan (Artamova *et al.*, 2004).

Todos los genes de la familia MAGE-A tienen una proteína codificada por un solo exón precedidos por varios exones no codificantes esto mismo aplica para los genes de la familia B. En lo que respecta a la familia C, sus regiones codificantes están interrumpidas por intrones (Chomez *et al.*, 2001).

Los genes MAGE-A, -B y -C fueron los primeros descubiertos, están codificados en el cromosoma X y forman el denominado grupo MAGE clase I (De Plaen *et al.*, 1994), debido a lo anterior se les han atribuido funciones similares.

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.

Yang *et al.*, en el 2007 reportó que las proteínas MAGE promovían la viabilidad de las células tumorales en cáncer de mama mediante la supresión de la apoptosis, también reportó que la supresión de los genes MAGE de clase I inducía apoptosis en líneas celulares de melanoma (Hs-294T, A375 y S91) positivas para MAGE, debido a que los tres miembros de la familia MAGE clase I formaban complejos con KAP1, proteína que se une a p53 actuando como co-represor de su función.

Al suprimir a MAGE los complejos entre KAP1 y p53 disminuían dando como resultado la activación de esta última para cumplir su función normal. Suprimiendo MAGE clase I se inducía la apoptosis en cáncer de colon. Por otro lado Monte *et al.*, en 2006 mostraron que el gen MAGE-A2 se unía a p53.

1.3.3 OTROS ANTÍGENOS TESTICULARES DE CÁNCER

Otros ATC de importancia biológica son los genes GAGE, esta familia se ubica en el cromosoma 11, se le ha encontrado en una gran variedad de tumores, las proteínas que codifica son inmunogénicas en humanos y son reconocidas por los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (Gjerstorff *et al.*, 2010), por lo cual son un blanco importante para posibles vacunas aplicadas a inmunoterapia.

GAGE esta presente durante el desarrollo del ectodermo en el embrión, en células neuroectodermales y en células gliales. Así también se encuentra en la corteza adrenal periférica en embriones de entre 6 y 9 semanas, por lo anterior se conoce como un gen del desarrollo embrionario al igual que los genes de la familia MAGE-A (Gjerstorff *et al.*, 2008).

En lo que respecta a la familia de los genes BAGE ésta se encuentra formada por 15 miembros los cuales, al igual que el resto de los ATC, están presentes en diversos tumores. Se sabe que su activación es debida a factores epigenéticos como la metilación del DNA, que en el caso de BAGE, cambios en los patrones de metilación activan al gen, el cual se ha propuesto como un biomarcador epigenético en ciertos cánceres (Grunau, *et al.*, 2005).

Los genes LAGE-1 y NY-ESO-1 presentan una alta homología y generalmente se encuentran coexpresados en diversos cánceres (Kudela *et al.*, 2011). Se ha observado la co-expresión de estos genes durante el desarrollo fetal, alrededor de las 22 semanas de gestación, lo cual sugiere que juegan un papel importante en el desarrollo de los cordones sexuales así como de las pro-espermatogonias (Hudolin *et al.*, 2007).

1.3.4 EXPRESIÓN DE LOS ANTÍGENOS TESTICULARES DE CÁNCER EN NEOPLASIAS

La frecuencia de expresión del gen MAGE-A3 en melanomas metastáticos es de 73%, en carcinomas de esófago 47%, de cabeza y cuello 49% y de vejiga 36% (Schultz *et al.*, 2000).

Se ha encontrado expresión del gen NY-ESO-1 en otros cánceres, tales como pulmón (Rao *et al.*, 2011), mama (Matković *et al.*, 2011), próstata (Jung *et al.*, 2010), gástrico y por supuesto, en la neoplasia que le dio nombre, cáncer de esofago (Chen *et al.*, 1997).

En mieloma múltiple (MM) se demostró expresión tanto del gen LAGE-1 (42%) como de NY-ESO-1 (26%) y coexpresión de ambos genes en un 18% de las muestras analizadas. (de Carvalho *et al.*, 2011). Su co-expresión también se reportó en cáncer de vejiga (Sharma *et al.*, 2003), de ovario (Odunsi, *et al.*, 2003) y carcinoma hepatocelular (Zhang *et al.*, 2005).

Andrade *et al.*, en 2008 realizó un estudio de RT-PCR en mieloma múltiple utilizando 14 ATC (MAGEA1, MAGEA2, MAGEA3/6, MAGEA4, MAGEA10, MAGEA12, BAGE1, MAGEC1/CT7, la familia GAGE, LAGE-1, PRAME, NY-ESO-1, SPA17 y SSX1), encontrando diferentes frecuencias, MAGEC1/CT7 (77%), LAGE-1 (49%), MAGEA3/6 (41%) MAGEA2 (36%), GAGE family (33%), NY-ESO-1 (33%), BAGE-1 (28%), MAGEA1 (26%), PRAME (23%), SSX-1 (26%), MAGEA12 (20.5%), MAGEA4 (0%), and MAGEA10 (0%).

Basado en sus resultados y realizando la correlación clínica, reportó que, MAGEC1/CT7, MAGEA3/6 and LAGE-1 son candidatos para inmunoterapias mientras que los genes de la familia GAGE y MAGEC1/CT7 parecían tener impacto en el pronóstico de MM.

Además de mieloma, están los estudios que se han realizado en otras enfermedades hematológicas, Chambost *et al.*, reportó en 1993 que los genes MAGE estaban silenciados en médula ósea y en sangre periférica de pacientes con leucemia, mientras que Shichijo en 1995 reportó que dicho gen estaba presente en linfocitos T de LLA, así como en células de mieloma múltiple.

Por otro lado, investigaciones llevadas a cabo por Martínez *et al.*, en 2007 demostraron que existe presencia de los genes MAGE principalmente de la familia A en pacientes con leucemia. Analizó 115 pacientes de los cuales 34 pertenecían a leucemia mieloide aguda (2 LMA-M1, 9 LMA-M2, 12 LMA-M3, 7 LMA-M4, 3 LMA-M5 y 1 LMA-M6), 76 a leucemia linfoblástica aguda tanto de linaje B (71) como T (5) y finalmente 5 muestras de leucemia mieloide crónica. Los genes analizados fueron MAGE-A1, -A3 y -B2 encontrando que en LMA había expresión de los 3 genes (41,17%), así como en LLA (30,26%) y en LMC reportó expresión de B2 (20%).

En lo que respecta a LMC, en el 2002 Adams *et al.*, llevó a cabo un estudio con 42 pacientes con LMC *de novo* encontrando que el gen MAGE-A3 tenía una frecuencia de expresión del 2.4%. Así también, realizó el análisis en una línea celular de LMC (K562) en la cual no encontró expresión de dicho gen.

Recientemente, estudios realizados por Lutkens *et al.*, en 2010 demuestran que los ATC están presentes en líneas celulares de LMC, principalmente los genes de la familia MAGE. En lo que respecta a la expresión de los ATC en pacientes con LMC reportaron que hay una mayor frecuencia de expresión del gen PRAME. Posteriormente, compararon la expresión del mismo gen en pacientes bajo remisión completa encontrando que la frecuencia disminuye de 45% a 18.8%, mientras que en pacientes tratados con diferentes quimioterapéuticos la expresión es del 88.8%.

1.3.5 INMUNOTERAPIA CON ANTÍGENOS TESTICULARES DE CÁNCER

Debido a que los genes de los ATC son compartidos por diferentes tumores juegan un papel importante en la inmunoterapia (De Smet, 1996).

Debido a que estos genes pueden ser reconocidos por los LTCD8⁺, se ha propuesto generar una inmunoterapia con células dendríticas las cuales sean capaces de presentar el antígeno a los linfocitos T con el objetivo de generar una respuesta inmune en contra de las células tumorales. (Russo *et al.*, 2000; Boon, 1996).

Dentro de los candidatos para una inmunoterapia en leucemia tenemos a los genes de la familia MAGE-A, que son los más estudiados y han demostrado tener relevancia en terapias inmunológicas, de la misma manera tenemos a NY-ESO-1 y LAGE-1 los cuales por su homología podrían ser blanco de un solo anticuerpo (Carvahlo *et al.*, 2011).

En lo concerniente a los padecimientos asociados a la serie mieloide, la inmunoterapia proporciona un avance en el estudio y tratamiento de la enfermedad mínima residual, teniendo como ventaja la baja toxicidad sobre las células normales ya que va dirigida solo hacia las células malignas (Hoffman, 2010).

2. JUSTIFICACIÓN

El objetivo principal del tratamiento del cáncer es eliminar las células malignas sin dañar las normales, mediante el uso de blancos específicos, también llamados marcadores tumorales. Sin embargo, existe un umbral de resistencia por parte de las células tumorales a ser combatidas por los fármacos, por este motivo se hace necesaria la búsqueda de nuevos blancos moleculares como alternativa de tratamiento, así como estudiar la relevancia que podrían tener en el pronóstico de los pacientes. En leucemias, el panorama no es diferente, los tratamientos para este tipo de cáncer no son eficientes al 100%, por lo que las investigaciones se centran en buscar otras alternativas que beneficien al paciente; entre las más importantes y estudiadas se encuentran la de marcadores tumorales, los cuales son una opción de tratamiento mediante la utilización de una terapia dirigida. En los últimos años las investigaciones se han centrado en la búsqueda de nuevos marcadores en leucemia, destacando los antígenos testiculares de cáncer (ATC), la importancia de dichos antígenos radica en que su expresión en células normales se limita únicamente a tejido testicular y placenta y son reconocidos por el sistema inmune, por tanto, encontrarlos en cualquier otro tejido es indicativo de una transformación neoplásica. Se han encontrado en diferentes neoplasias como son cáncer de esófago, de hueso, de colon, de pulmón así también en enfermedades hematológicas como linfoma y leucemia. La presencia de los antígenos testiculares de cáncer (ATC) en leucemia conlleva a utilizarlos como marcadores tumorales de nueva generación, clasificando a la leucemia no solo por la presencia del reordenamiento BCR/ABL sino también por los ATC brindando una nueva visión en el pronóstico de la enfermedad. Además representarían una alternativa al tratamiento mediante la utilización de una terapia inmunológica contra las células tumorales.

3. HIPÓTESIS

Si las células mononucleares de médula ósea de pacientes con leucemia mieloide crónica expresan antígenos testiculares de cáncer, entonces podrían relacionarse con el pronóstico de la enfermedad.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Analizar la expresión de los antígenos testiculares de cáncer en Leucemia Mieloide Crónica *de novo*, y hacer una correlación con los parámetros clínicos y sobrevida del paciente.

4.2 Objetivos particulares

- Analizar la expresión a nivel de mRNA de los genes MAGE-A3, -A4, -B2, -C1, BAGE-1, GAGE-2, LAGE-1 y NY-ESO en líneas celulares hematológicas.
- Identificar los genes MAGE-A3, -A4, -B2 y -C1, BAGE-1, GAGE-2, LAGE-1 y NY-ESO en células mononucleares de médula ósea de pacientes con Leucemia Mieloide Crónica, a nivel de mRNA.
- Analizar a nivel de proteína la expresión del gen MAGE-A3
- Analizar la expresión de los ATC en muestras de pacientes tratados con diferentes quimioterapéuticos, así como su posible co-expresión.
- Realizar una correlación clínica entre la expresión de los genes con los datos clínicos del paciente.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Pacientes mayores de 16 años.
- Pacientes con diagnóstico de leucemia mieloide crónica.
- Hombres y mujeres.
- Vírgenes de tratamiento.
- Que se les haya realizado toma de médula ósea.

5.2 CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN

- Menores de 16 años.
- Pacientes con diagnóstico de leucemia aguda.
- Que hayan recibido tratamiento anti-neoplásico.

5.3 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- Que el paciente abandone el tratamiento.
- Que el diagnóstico no haya sido el correcto.

5.4 MATERIAL BIOLÓGICO

5.4.1 TEJIDO TESTICULAR

El tejido fue donado por el servicio de urología del HGM, de biopsias de pacientes con cáncer de próstata, la mayoría mayor de 70 años.

5.4.2 LÍNEAS CELULARES

Se utilizaron 8 líneas celulares hematológicas las cuales se muestran en el cuadro 1, cada una se cultivó en medio RPMI-1640 (Gibco BRL) suplementado con suero fetal bovino al 10%, antibióticos (estreptomocina a 100 µg/mL y penicilina a 100 U/mL) y bajo condiciones óptimas para su crecimiento (1atm, 37°C, 5% CO₂). Se extrajo el RNA y se realizó la Reacción en Cadena de la Polimerada para la identificación de los genes de la familia MAGE.

Tabla 5. Líneas celulares hematológicas y su enfermedad de origen.

NOMBRE ATCC DE LA LINEA	PROCEDENCIA
K562	Leucemia Mieloide Crónica (crisis blástica)
Reh	Leucemia Linfocítica Aguda (no T, no B)
Jurkat	Leucemia Aguda de Células T
HL-60	Leucemia Promielocítica Aguda
Molt-4	Leucemia Linfoblástica Aguda
Raji	Linfoma de Burkitt
Ramos	Linfoma de Burkitt
U-937	Linfoma Histiocítico

5.4.3 INDIVIDUOS SANOS

Se utilizaron 10 muestras de sangre periférica de individuos sanos, las cuales fueron proporcionadas por el banco de sangre del Hospital General de México. De igual manera que las muestras de médula ósea, se separaron las células mononucleares y se analizaron los genes MAGE por RT-PCR.

5.4.4 PACIENTES

Se incluyeron en el estudio 65 muestras de pacientes con diagnóstico de leucemia mieloide crónica *de novo*, pertenecientes al Servicio de Hematología del Hospital General de México durante un periodo de 1,5 años. A cada paciente se le realizó una biopsia de médula ósea para el análisis molecular, como parte del diagnóstico de rutina para su clasificación y tratamiento. Inmediatamente obtenida la médula ósea se separaron las células mononucleares y se almacenaron a -80°C para el posterior análisis por RT-PCR y Western-blot.

5.5 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

5.5.1 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 continúa una capa en la interfase que corresponde a las células mononucleares (linfocitos, monocitos, blastos) y finalmente la capa del plasma (figura 6).

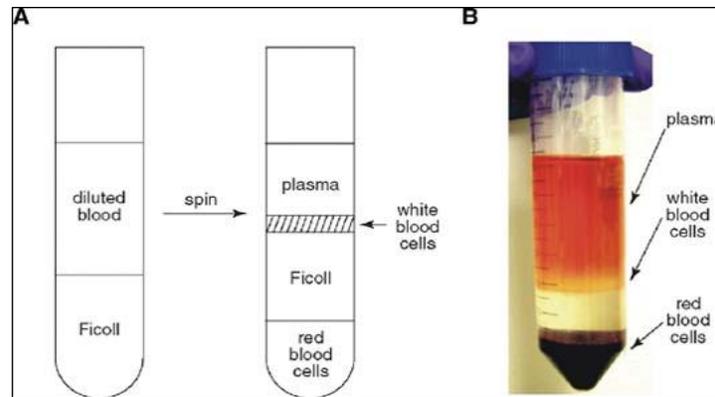


Fig. 6 Separación de células mononucleares. La separación se realiza utilizando el reactivo Ficoll el cual tiene una densidad de 1.077 g/cm^3 el cual separa las células en 3 fases: plasma, CMN, ficoll, eritrocitos respectivamente.

Las muestras de sangre periférica de individuos sanos así como las de médula ósea de pacientes se trataron por el mismo procedimiento, el cual es el siguiente:

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.

5.5.2 AISLAMIENTO DE mRNA

El RNA aislado de los individuos sanos, líneas celulares y tejido testicular 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 solubizan las células, lisan la membrana plasmática y las proteínas pasan de su estado nativo a desnaturado 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 200µL 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 500µL 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.

El lo que respecta a los pacientes la separación se realizó por el método de Chomczynski puesto que las células de médula requieren un tratamiento más fuerte que el trizol. El procedimiento se lleva a cabo en hielo.

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

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

5.5.3 INTEGRIDAD, PUREZA Y CUANTIFICACIÓN DEL RNA

5.5.3.1 INTEGRIDAD

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

Procedimiento:

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

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

5.5.3.2 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 A_{280} (principalmente por residuos de triptófano) las lecturas a esta longitud pueden mostrar si existe contaminación proteica.

El cálculo de la relación A_{260} / A_{280} 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.

$$\text{Pureza} = A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$$

$$\mu\text{g}/\mu\text{L de RNA} = (A_{260\text{nm}})(\text{dilución})(0.04^{**})$$

**1 unidad de absorbancia corresponde a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RNA

5.5.4 RT-PCR

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

5.5.5 DETECCIÓN DE LOS ATC MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Los primers para los genes MAGE-A3 y B2 fueron previamente utilizados por Shichijo et al., en 1995 y por McCurdy et al., en 1998 respectivamente. La misma secuencia de primers se utilizo para amplificar las muestras de los pacientes del HGM. En lo concerniente al resto de los ATC (BAGE-1, GAGE-2, LAGE-1 y NY-ESO) los oligonucleotidos fueron diseñados en el laboratorio de Biología Molecular del HGM.

Como control se utilizó el gen constitutivo GAPDH. A continuación se muestra la secuencia de cada primer así como el la longitud esperada del producto de PCR.

Tabla 6. Secuencias de los primers utilizados para la detección de los antígenos testiculares de cáncer.

GEN	SECUENCIA DEL PRIMER	TAMAÑO DEL PRODUCTO (pb)
MAGE-A3	5'-TGGAGCACCAGAGGCCCCC-3' (F) 5'-GGACGATTATCAGGAGGCCTGC-3' (R)	725
MAGE-A4	5'-GAGCAGACAGGGCCAACCG -3' (F) 5'-AAGGACTCTGCGTCAGGC-3' (R)	445
MAGE-B2	5'-CTGACTTCCGCTTTGGAGGC -3' (F) 5'-GCACCCCCAGAAACAGAAGAGGAACA-3' (R)	230
MAGE-C1	5'-GACGAGGGATCGTCTCAGGTCAGC-3' (F) 5'-ACATCCTCACCTCAGGAGGG-3' (R)	631
BAGE-1	5'-TGGCTCGTCTCACTCTGG -3' (F) 5'-TCCTGTTGAGCTGCCGTCT-3' (R)	247
GAGE-2	5'-TATGCGGCCCGAGCAGTT-3' (F) 5'-CCTGCCCATCAGGACCATC-3' (R)	201
LAGE-1	5'-CTGCGCAGGATGGAAGGTGCCCC-3' (F) 5'-GCGCCTCTGCCCTGAGGGAGC-3' (R)	332/561
NY-ESO-1	5'-GCTTCAGGGCTGAATGGAT-3' (F) 5'-AAAACAGGGCAGAAAGC-3' (R)	307
GAPDH	5'-CGGGAGCTTGTCATCAATGG-3' (F) 5'-CATGGTTCACCCCATGACG-3' (R)	217

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

Tabla 7. Volúmenes de los reactivos para PCR.

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

Tabla 8. Condiciones de amplificación para los antígenos testiculares de cáncer.

	DES NATURALIZACIÓN	ALINEACIÓN	ELONGACIÓN
TEMPERATURA	94°C	MAGE-A3, B2, C1: 67°C MAGE A4: 64°C BAGE-1: 58°C GAGE-2: 62°C LAGE-1: 69°C NY-ESO-1: 60°C	72°C
TIEMPO	2 min	45 segundos	1 min

5.5.6 SECUENCIACIÓN DE LOS ATC

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

5.5.7 DETECCIÓN DE PROTEÍNA

La detección de la proteína MAGE se realizó mediante Western-blot

5.5.7.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

Se extrajeron proteínas de las siguientes muestras: Tejido testicular (control positivo), individuos sanos (control negativo) y muestras de pacientes (problema).

Procedimiento: En frío, se adicionaron a cada muestra 500 μ L de buffer de tejidos con NaF 25 mM y Ortovanadato 1 mM, 100 mg/mL de buffer de tejidos e inhibidores de proteasas y fosfatasa. Se lisaron las células haciéndolas pasar 10 veces por una aguja de calibre 21 o 22 (insulina). Se centrifugó a 6150 g durante 30 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se cuantificó (Kit BioRad DC Protein Assay) en un equipo de ELISA a 650 nm utilizando como curva patrón albúmina. Una vez cuantificadas las proteínas totales, se guardaron alícuotas de 40 μ g/ μ L a -80°C para su posterior análisis.

En el caso del tejido testicular se utilizó el mismo buffer de tejidos en una cantidad de 1 mL/gr de tejido, se disgregó con el polytron, (siempre en hielo para evitar la degradación de las proteínas). Una vez disgregado se agregó el resto de los inhibidores y se retomó del paso 2 en adelante.

5.5.7.2 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

La electroforesis se realizó en el equipo Miniprotein 3 de BioRad.

Se preparó el gel separador el cual contenía RGB 4X, SDS al 10%, Acrilamida, APS, TEMED y agua. Se vertió en la cámara. Una vez solidificado el gel separador se procedió a la preparación del gel concentrador el cual contenía SGB 4X, SDS al 10%, Acrilamida al 30%, APS 10% y TEMED. Se vertió en la cámara y se colocó el peine. Una vez gelificado se retiró el peine y se adicionó el buffer de corrida. Se cargaron las muestras previamente hervidas durante 5 min y mezcladas con Loading buffer y SDS. Se utilizó marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Standards, BioRad).

5.5.7.3 TRANSFERENCIA

Terminada la electroforesis se equilibró el gel durante 30 min en buffer de transferencia (Tris, Glicina, Metanol y H₂O) así como el papel filtro y la nitrocelulosa que se utilizará en la cámara de transferencia. La cámara utilizada es semi-húmeda, el orden de los componentes fue el siguiente: se colocó papel filtro-nitrocelulosa-gel de acrilamida-papel filtro, se cerró la cámara y se aplicó un voltaje de 15mA durante 20 min. Una vez terminada la transferencia se retiró el gel y se agregó rojo de Ponceau el cual hizo evidente el patrón proteico transferido en la membrana de nitrocelulosa. Se lava con PBS 1X hasta eliminar totalmente el rojo de Ponceau. Una vez limpia la membrana se bloqueó en PBS-Leche al 5% durante 1 hr.

Tabla 9. Anticuerpos utilizados en Western-blot.

	DILUCION	PROTEÍNA DETECTADA	PESO ESPERADO
ANTICUERPOS PRIMARIOS			
MAGE FL-309 (Santa Cruz) Rabbit polyclonal IgG	1:200	MAGE-A3	45-50 KDa
β -ACTINA (Santa Cruz) Mouse monoclonal IgG ₁	1:200	Actina	48 KDa
ANTICUERPOS SECUNDARIOS			
MAGE: donkey anti-goat IgG- HRP	1:2000	IgG de cabra	-----
β -ACTINA: goat anti-mouse IgG- HRP	1:2000	IgG de ratón	-----

Las incubaciones con el anticuerpo primario se llevaron a cabo durante toda la noche a 4°C. Pasado el tiempo de incubación se realizaron 2 lavados con PBS-Tween al 0.2% y 1 con PBS 1X durante 10 min cada uno.

Una vez limpia la membrana de anticuerpo primario se adicionó el anticuerpo secundario con un periodo de incubación de 1-2 hrs, pasado el tiempo se realizaron los mismos lavados indicados anteriormente.

5.5.7.4 REVELADO CROMOGENICO

Para el revelado se utilizó DAB substrate 1X (Roche) en un volumen de 10 a 20 μ L/cm² de membrana de nitrocelulosa. El tiempo de revelado es de 2-10 minutos en oscuridad.

6. RESULTADOS

6.1 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS ATC EN TEJIDO TESTICULAR

Se realizó la estandarización (Tabla 6) de cada gen en tejido testicular (Figura 7), el cual se tomó como control positivo debido a que los ATC se expresan de manera normal en este tejido y no en los demás a excepción de placenta en menor cantidad.



Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados por RT-PCR en tejido testicular. Se muestra la expresión de los ATC a nivel de mRNA. MP= marcador de peso, 1 = NY-ESO1 (307 pb), 2= MAGE-A3 (725pb), 3= MAGE-B2 (320 pb), 4= MACE C1 (631 pb), 5= MAGE-A4 (445 pb), 6= BAGE-1 (247 pb), 7= GAGE-2 (201 pb), 8= LAGE (332/561 pb).

6.2 SECUENCIACIÓN DE LOS ATC

Con la finalidad de corroborar que los genes amplificados en tejido testicular por PCR fueran los de interés se secuenciaron en colaboración con el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). Una vez obtenidas las secuencias se alinearon en BLAST mediante el programa BLASTN del NCBI contra la base de datos Human Genomic Plus Transcript (G+T), dando como resultado que las secuencias efectivamente correspondían a los genes ATC (Anexos 1 al 7).

6.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS ATC EN INDIVIDUOS SANOS

El análisis de los antígenos testiculares en individuos sanos se realizó con la finalidad de corroborar la nula expresión de estos genes en tejido normal, como se ha reportado en estudios previos. Se colectaron 10 muestras, las cuales fueron proporcionadas por el banco de sangre del HGM. Se extrajo el RNA con reactivo Trizol y se analizó su integridad en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (Figura 8).

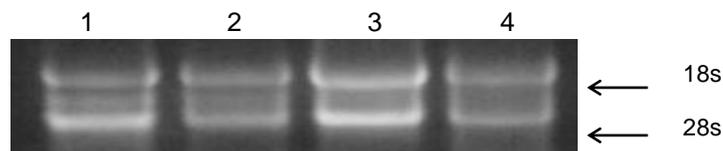


Figura 8. RNA ribosomal, observación por electroforesis. Gel de agarosa al 1% se muestran las bandas 18s y 28s, 1-4: muestras de pacientes.

Se realizó la RT-PCR para la identificación de los genes GAPDH (control interno) y ATC en individuos sanos con la finalidad de validar el estudio demostrando que en tejido hematopoyético normal no se encuentran expresados los ATC. Como control positivo se utilizó tejido testicular, (previamente estandarizado) y 10 muestras de individuos sanos, este número se considera aceptable para la validación ya que los genes no deben presentarse bajo ninguna circunstancia en tejido hematopoyético normal. Como era de esperarse no se encontró expresión de los ATC en los individuos sanos (Figura 9).

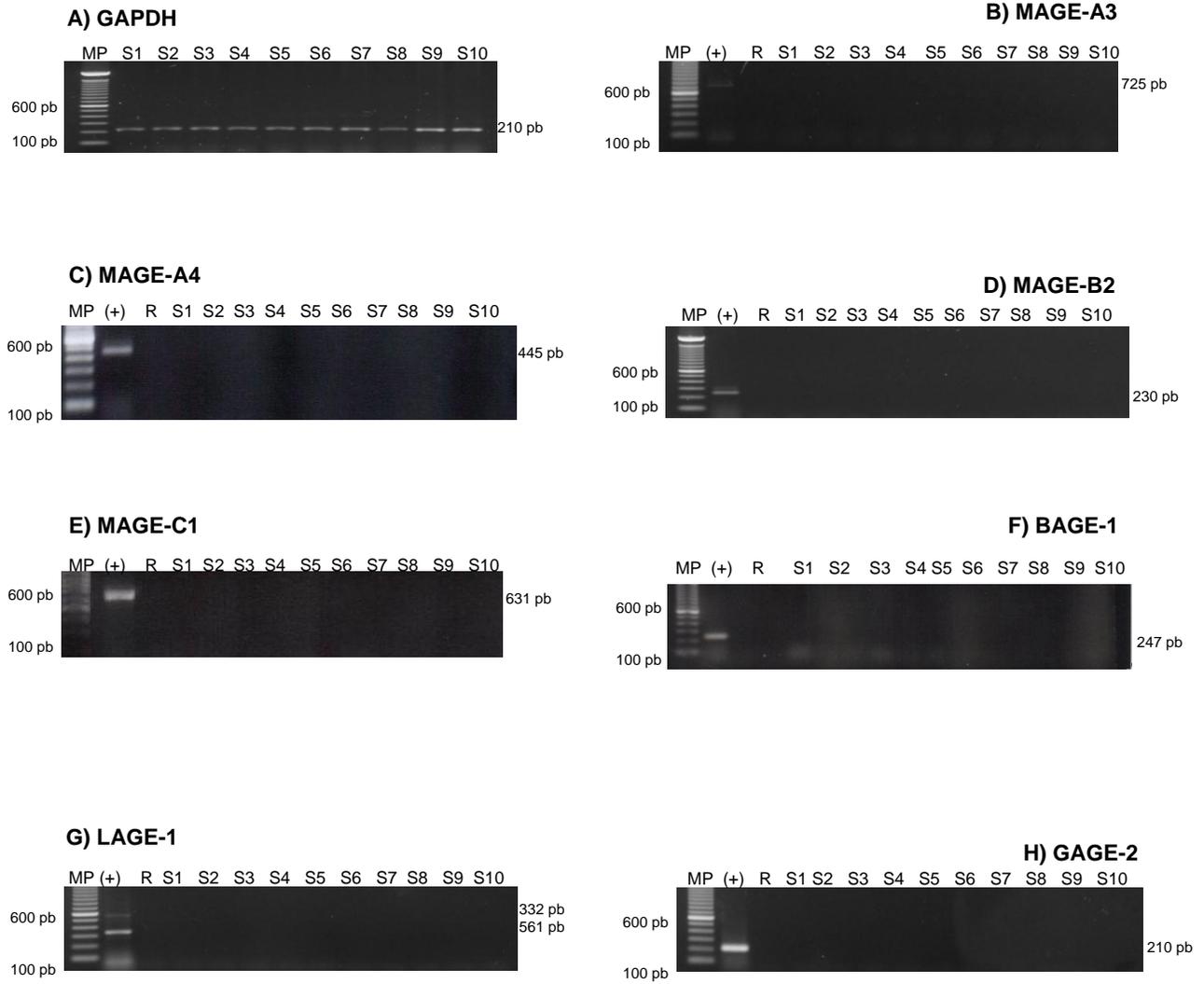


Figura 9. Análisis de la expresión de los ATC por RT-PCR en individuos sanos. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

A)GAPDH (217 pb), B) MAGE-A3 (725 pb), C) MAGE-A4 (445 pb), D) MAGE-B2 (230 pb), E) MAGE-C1 (632 pb) F) BAGE-1 (247 pb), G) LAGE-1 (332/561) H)GAGE-2 (210 pb), MP=Marcador de Peso; (+)=Control positivo, tejido testicular; S1-S10 Individuos sanos.

6.4 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS ATC EN LINEAS CELULARES

En líneas celulares hematopoyéticas fue interesante determinar si existe expresión de estos genes. Se utilizaron 8 líneas celulares, de las cuales 5 pertenecen a diferentes tipos de leucemia y el resto a linfoma (Tabla 4), el objetivo de analizar líneas hematopoyéticas fue determinar si los ATC estaban presentes en otras malignidades hematológicas y de ser así proporcionar una herramienta más en la caracterización de cada enfermedad. Se tomó tejido testicular como control positivo para los genes, del mismo modo, se realizó la identificación del gen constitutivo GAPDH, seguido de la identificación de los antígenos testiculares de cáncer. Los resultados se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Expresión de los antígenos testiculares de cáncer en 8 líneas celulares hematológicas.

	MAGE-A3	MAGE-A4	MAGE-B2	MAGE-C1	BAGE-1	GAGE-2	LAGE-1	NY-ESO-1
Testículo	+	+	+	+	+	+	+	+
K562	+	+	+	+	+	+	+	+
Reh	+	-	-	-	-	-	-	-
Jurkat	-	-	-	-	-	-	-	-
HL-60	+	-	+	-	-	+	-	-
Molt-4	-	-	-	-	-	-	-	-
U-937	-	-	-	-	-	+	-	-
Raji	-	-	-	-	-	-	-	-
Ramos	-	-	-	-	-	-	-	-

+, expresión detectable para el gene analizado.

-, expresión no detectable para el gen analizado.

6.5 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS ANTÍGENOS TESTICULARES DE CÁNCER EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

Una vez realizada la estandarización, utilizando tejido testicular como control positivo e individuos sanos como control negativo, se continuó con el análisis de los ATC en pacientes con LMC *de novo*, cuya importancia radica en la posibilidad de utilizar terapias dirigidas en los pacientes que resulten positivos a alguno de ellos.

De acuerdo con los criterios de inclusión se analizaron un total de 65 pacientes con LMC *de novo*, de los cuales 55 ingresaron al servicio de hematología del Hospital General de México, los 10 restantes son muestras de pacientes que se proporcionaron por la Unidad de Investigación Médico-Oncológica (UIMEO) del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

De los 55 pacientes del HGM se encontraban 27 hombres y 28 mujeres (figura 10), los intervalos de edad de nuestra población es de los 18-70 años (figura 11), ya que dicha enfermedad se presenta generalmente en personas adultas. La fase de la enfermedad de mayor frecuencia fue la crónica (96,9%) siendo la fase predominante al inicio de la enfermedad y en un 1,5% la fase acelerada (figura 12).

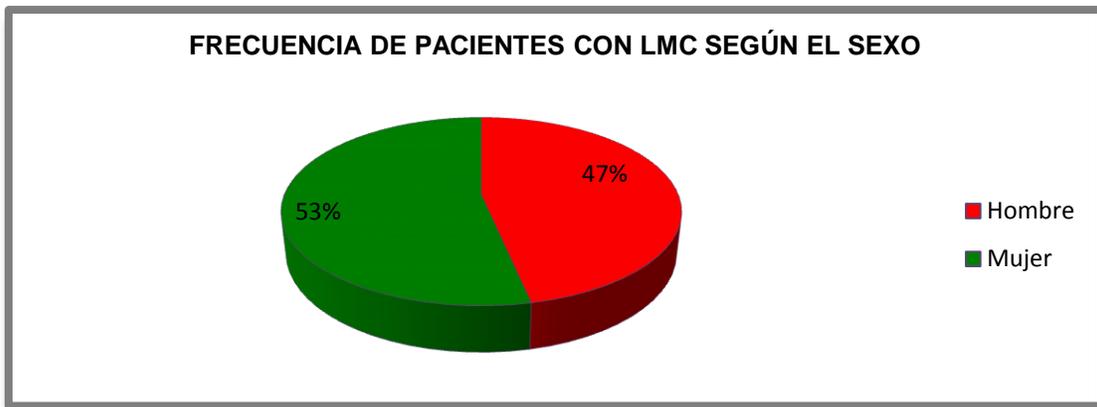


Figura 10. Porcentaje de hombres y mujeres incluidos en el estudio

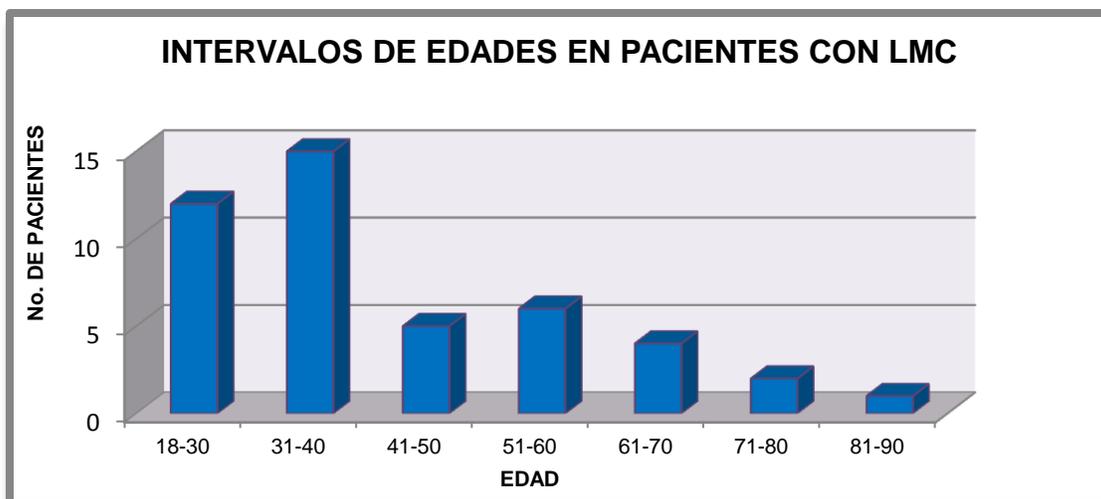


Figura 11. Edades de los pacientes incluidos en el estudio.

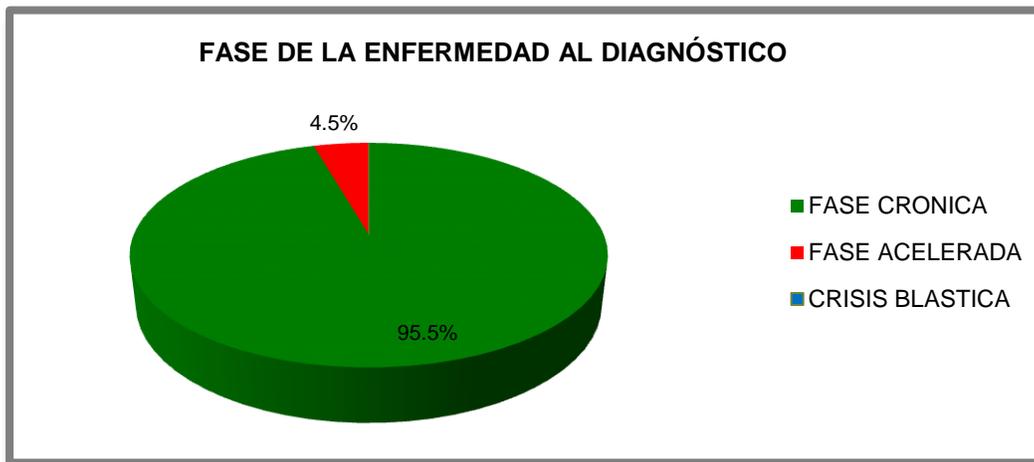


Figura 12. Fase en la que se encontraban los pacientes al momento de ser diagnosticados con leucemia mieloide crónica. La fase crónica es predominante con una frecuencia del 95,5%.

Se analizaron 65 muestras de médula ósea de pacientes diagnosticados *de novo* con Leucemia mieloide crónica, se realizó RT-PCR, para verificar la integridad del mRNA con el gen constitutivo GAPDH, (figura 21-A), una vez corroborado que el gen control estaba presente se procedió a realizar la PCR para los genes de la familias MAGE-A3, -A4, -B2, -C1, BAGE-1, GAGE-2, LAGE-1 y NY-ESO-1. (figura 13-B,C,D,E,D,G,H,I).

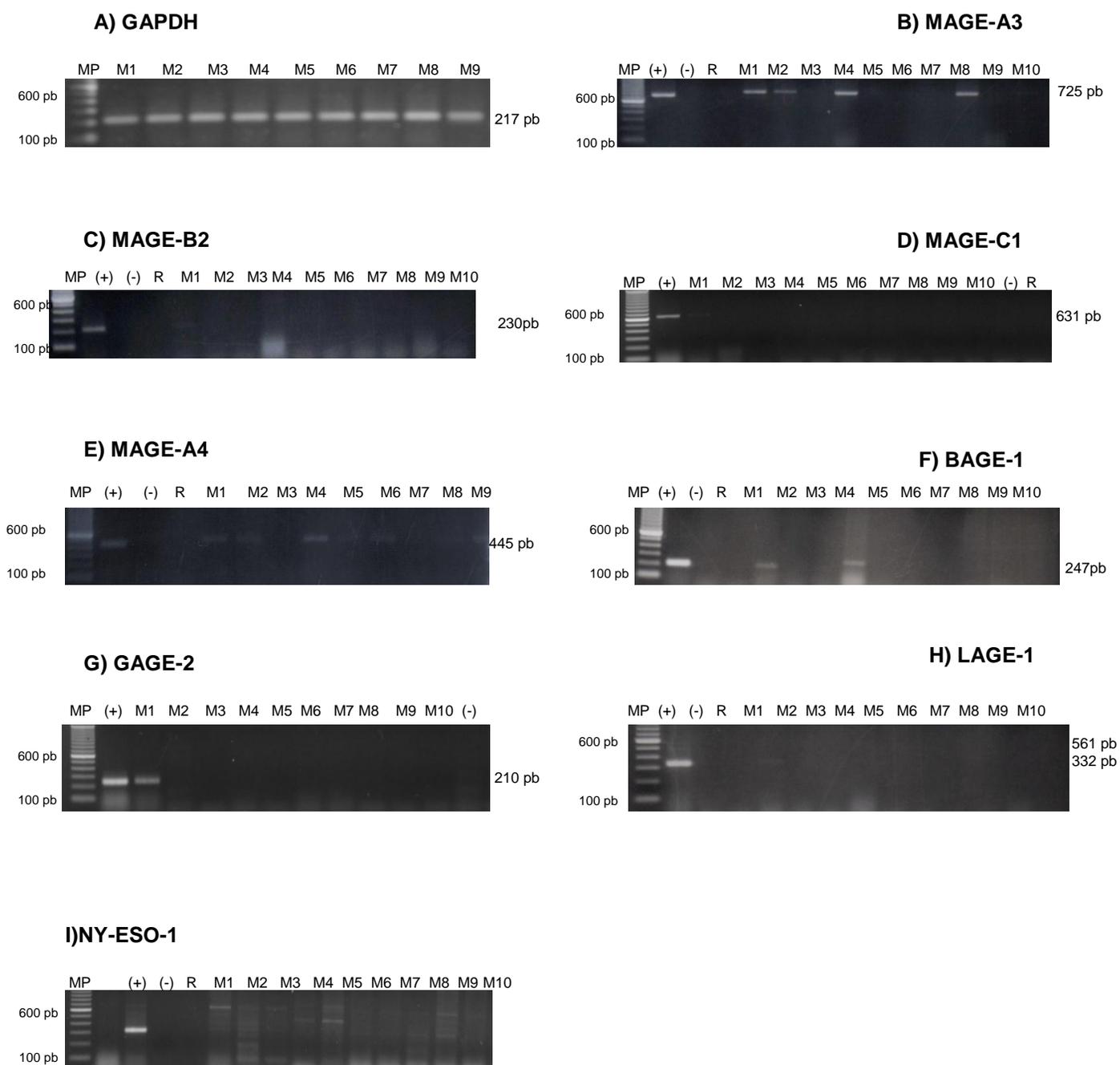


Figura 13. Electroforesis del análisis de la expresión de los genes MAGE por RT-PCR en pacientes con LMC. A) GAPDH (217 pb), B) MAGE-A3 (725 pb), C) MAGE-B2 (230 pb), D) MAGE-A4 (445 pb), E) MAGE-C1 (631 pb). F) BAGE-1(247pb), G)GAGE-2 (210 pb), H)LAGE-1 (332/561), I) NY-ESO1 (307 pb). MP=Marcador de Peso; (+)=Control positivo, tejido testicular; (-)= Control Negativo, individuo sano; R= Control de reacción; M= Pacientes.

Tabla 11. Expresión de los ATC en 65 pacientes con leucemia mieloide crónica.

ID PACIENTE	MAGEA3 n= 65	MAGEB2 n= 65	MAGEC1 n= 65	MAGEA4 n= 33	BAGE1 n= 30	GAGE2 n= 30	LAGE1 n= 30	NY-ESO1 n= 30
M1	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
M2	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
M3	+	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
M4	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
M5	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
M6	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
M7	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
M8	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
M9	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
M10	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
M11	+	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
M12	+	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
M13	+	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
M14	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
M15	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
M16	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
M17	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
M18	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
M19	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
M20	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
M21	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
M22	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
M23	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
M24	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
M25	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
M26	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
M27	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
M28	+	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
M29	+	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
M30	+	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
M31	+	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
M32	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
M33	-	-	-	-	-	-	-	+
M34	+	-	-	-	ND	ND	ND	ND
M35	-	-	-	-	-	+	-	-
M36	-	-	-	-	-	+	-	-
M37	-	-	-	-	-	-	-	-
M38	-	-	-	-	-	-	-	+
M39	-	-	-	+	-	+	-	+
M40	-	-	-	-	-	+	-	-

Continúa en la siguiente página

Continuación **Tabla 11.**

ID PACIENTE	MAGEA3 n= 65	MAGEB2 n= 65	MAGEC1 n= 65	MAGEA4 n= 33	BAGE1 n= 30	GAGE2 n= 30	LAGE1 n= 30	NY-ESO1 n= 30
M41	+	+	-	+	-	-	-	-
M42	-	-	+	-	ND	ND	ND	ND
M43	+	-	-	-	ND	ND	ND	ND
M44	-	-	-	-	-	-	-	-
M45	-	-	-	+	-	-	-	+
M46	-	-	-	+	-	-	-	+
M47	+	-	-	+	-	-	-	-
M48	-	-	-	+	-	-	-	+
M49	-	-	-	+	-	-	-	+
M50	+	-	-	+	-	-	+	-
M51	+	-	-	+	-	-	-	+
M52	-	-	-	-	-	-	+	-
M53	+	-	-	-	-	-	-	-
M54	+	-	-	+	-	-	-	+
M55	-	+	-	+	-	+	+	-
M56	+	-	-	+	+	+	+	-
M57	+	-	-	+	-	-	-	-
M58	-	-	-	+	-	-	-	-
M59	+	-	-	+	+	-	-	+
M60	-	-	-	+	-	-	-	-
M61	-	-	-	+	-	-	-	-
M62	-	-	-	+	-	-	-	-
M63	+	-	-	+	-	-	-	-
M64	-	-	-	+	-	-	-	-
M65	+	-	-	+	-	-	-	-

Se analizaron un total de 65 muestras, el numero de muestras para cada gen fue variable, por ejemplo, para los genes MAGE-A3, -B2 y -C1 el numero de muestras fue de 65, para MAGE-A4 fue de 33 mientras que para BAGE-1, GAGE-2, LAGE-1 y NY-ESO-1 fue de 30 pacientes. Esta variabilidad en cuanto al número de muestras se debió a la disponibilidad del material biológico.

Como puede observarse en la tabla 11 los genes de mayor expresión fueron MAGE-A3, MAGE-A4 y NY-ESO-1. También se observa que en algunos casos existe co-expresión de los genes, por ejemplo en las muestras M55, M56 y M59 están presentes más de dos genes. En algunas otras, únicamente hay dos o incluso uno.

Tabla 12. Expresión de los antígenos testiculares de cáncer en muestras de pacientes con leucemia mieloide crónica.

	MAGE-A3	MAGE-B2	MAGE-C1	MAGE-A4	BAGE-1	GAGE-2	LAGE-1	NY-ESO-1
<i>n</i>	65	65	65	33	30	30	30	30
Positivos	21	1	2	21	2	6	4	11
Frecuencia	32,30%	1,50%	3,07%	63,60%	6,60%	20,00%	13,30%	36,60%

Los resultados de los pacientes analizados para los ATC se muestran en la tabla 10, se observa que el gen MAGE-A4 fue el de mayor frecuencia sin embargo el número de muestras analizadas solo fue de 34 que corresponde al 64,7%, seguido NY-ESO-1 con 11 pacientes positivos de 31 (35,4%), MAGE-B2 y MAGE-C1 fueron los de menor frecuencia, con el 2,9 y 1,8% respectivamente.

6.6 DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA MAGE-A3

Una vez que se indentifico la expresion del los ATC se procedió a realizar el analisis de la proteína por medio de western-blot, se contó con un anticuerpo que identifica el epitope correspondiente a los aminoacidos 1 a 309 de la proteina MAGE-A3. Se hizo la identificación de esta proteína porque el gen fue uno de los de mayor frecuencia, por contar con material biologico suficiente y por la importancia clínica que ha demostrado tener en linfoma y en leucemia aguda.

Se utilizaron las muestras de aquellos pacientes que resultaron positivos para el gen MAGE-A3 a nivel de mRNA, como control positivo se usó tejido testicular y como control negativo células mononucleares de individuos sanos. Se identificó primeramente la proteína β -Actina seguido de la proteína MAGE-A3. Los anticuerpos utilizados pertenecen a Santa Cruz y se utilizó un sistema semi-húmedo perteneciente a BioRad.

De los 22 pacientes positivos para MAGE-A3, se contaba únicamente con el respaldo de 7 muestras para el análisis de proteína, y estas fueron las utilizadas para la detección de la proteína MAGE-A3, de las 15 muestras restantes no había respaldo debido a que el número de células era menor y se utilizaron para la RT-PCR.

En la figura 14-A se muestra la proteína β -Actina utilizada como control para determinar si las muestras de CMN almacenadas eran viables para la posterior identificación del gen MAGE-A3, dicha proteína tiene un peso molecular de 46 KDa. En la figura 14-B se encuentran los pacientes analizados para la identificación de la proteína MAGE-A3, utilizando como control positivo tejido testicular y como control negativo un individuo sano, del carril 1 al 8 se encuentran las muestras de LMC, de las cuales 5 expresan la proteína MAGE-A3.

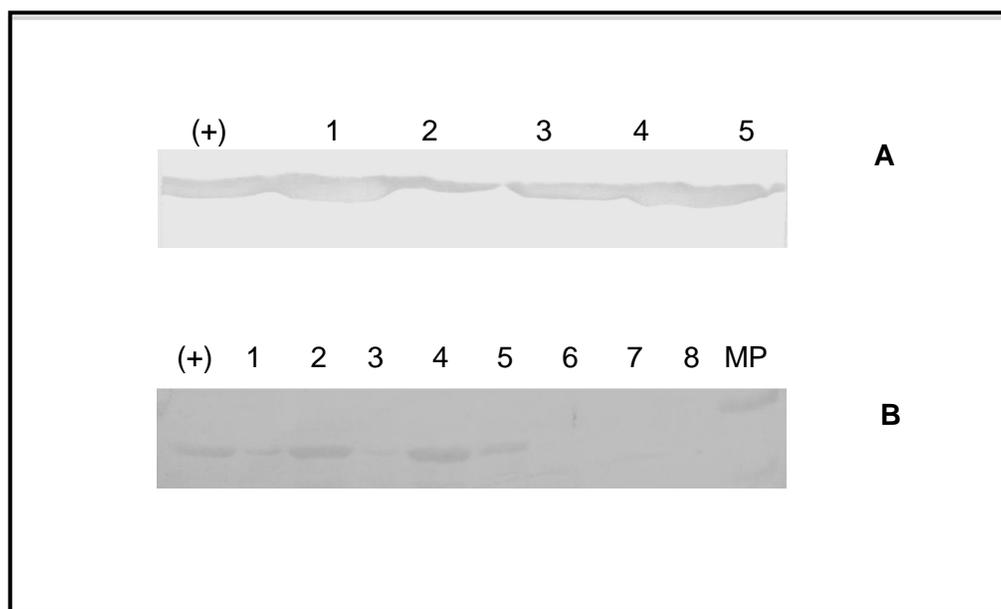


Figura 14. Detección de las proteínas β -ACTINA y MAGE. A) β -ACTINA, (+)= individuo sano; 1-5= pacientes. B) MAGE, (+)=Tejido testicular, B)1-5= pacientes positivos a nivel de mRNA y proteína, 6=paciente positivo en mRNA y negativo en proteína, 7 y 8= pacientes negativos en mRNA y en proteína. MP= Marcador de peso.

6.7 CORRELACIÓN CLÍNICA DEL LOS ATC EN LEUCEMIA MIEOLOIDE CRÓNICA

La correlación clínica fue realizada en base al gen MAGE-A3 por presentar mayor frecuencia en leucemias agudas (Martínez *et al.*, 2006) y por su relevancia clínica en otros tipos de cánceres.

Los genes MAGE-B2 y MAGE-C1 fueron los genes de menor frecuencia, por este motivo no se consideraron para la elaboración de la correlación clínica de los pacientes.

Al igual que los genes B2 y C1 el gen MAGE-A4 no se consideró para la realización de la correlación puesto que no se contaba con los expedientes completos de los pacientes.

La correlación clínica nos permitirá identificar si la expresión de este gen influye en la progresión de la enfermedad en los pacientes.

Los parámetros seleccionados para la realización de la correlación clínica fueron hemoglobina, hematocrito, leucocitos, plaquetas, fase de la enfermedad, tratamiento, edad, sexo. (tabla 13), los cuales se relacionan con la progresión de la enfermedad antes y después del tratamiento.

Se analizaron los expedientes de los pacientes, no todos contaban con expediente completo así que se eliminaron aquellos que no proporcionaran los datos necesarios quedando de la siguiente manera, para los genes MAGE-A3, -B2 y -C1 se analizaron 41 expedientes completos, MAGE-A4 16, BAGE-1, GAGE-2, LAGE-1 y NY-ESO-1 14 expedientes, se tomaron los datos mencionados anteriormente y se llevo a cabo la correlación. Para los parámetros (edad, leucocitos, hemoglobina, plaquetas, hematocrito) se realizó una prueba de Wilcoxon y para sexo y fase de la enfermedad, se realizó una prueba de Chi cuadrada (X^2), obteniéndose los valores que se muestran en la tabla 14.

Tabla 13. Características del grupo estudiado.

Id	Sexo	Edad	Fase	Leu (10³/μL)	Hb (g/dL)	Hct (%)	Plaq 10³/μL
M1	H	18	C	195	11,5	30,1	984,0
M2	H	22	C	214	10,4	24,7	191,0
M3	M	37	C	92,4	12,8	38,0	924,0
M4	M	34	C	272,5	12,3	31,5	1000,0
M5	M	36	C	338,5	12,6	30,9	590,0
M6	M	36	C	21,0	8,3	24,1	15,0
M7	M	59	C	84,7	13,0	39,3	985,0
M8	M	40	C	181,0	11,1	28,4	816,0
M9	H	37	C	234,0	9,9	26,3	825,0
M10	M	20	C	189,0	9,7	30,0	214,0
M11	H	41	C	177,2	11,0	34,5	482,0
M12	H	31	A	288,0	8,5	28,4	567,0
M13	H	32	C	58,2	11,7	35,7	457,0
M14	H	50	C	414,0	10,2	24,1	263,0
M15	M	34	C	SD	SD	SD	SD
M16	H	19	C	26,3	9,2	28,8	500,0
M17	H	51	C	513,0	12,2	40,3	164,0
M18	H	34	A	181,3	8,9	25,8	571,0
M19	H	47	C	52,8	15,6	46,7	269,0
M20	M	18	C	328,0	11,7	33,5	328,0
M21	M	74	C	180,0	10,6	33,3	2323,0
M22	M	44	C	459,0	8,9	29,0	128,0
M23	M	52	C	194,0	8,9	24,0	386,0
M24	M	30	C	367,0	11,6	37,0	1159,0
M25	M	43	C	SD	SD	SD	SD
M26	H	39	C	202,5	11,9	36,0	471,0
M27	H	51	C	SD	SD	SD	SD
M28	H	64	C	SD	SD	SD	SD
M29	H	20	C	382,5	12,6	40,1	1061,0
M30	H	31	C	109,0	14,0	41,0	296,0

H: hombre; M: mujer; C: crónica, A: acelerada; SD: sin datos. Valores de referencia, Leucocitos (Leu): 5 x 10³/μL - 10 x 10³/μL; Hemoglobina (Hb): 12 g/dL - 18 g/dL; Hematocrito (Hct): 35 % - 50 %; Plaquetas (Plq): 150 x10³/μL- 500 x10³/μL.

Continuación tabla 13.

Id	Sexo	Edad	Fase	Leu (10³/μL)	Hb (g/dL)	Hct (%)	Plq 10³/μL
M31	H	66	C	768,0	16,3	SD	SD
M32	M	58	C	SD	SD	SD	SD
M33	M	24	C	945,0	9,6	27,7	664,0
M34	M	24	C	419,0	8,2	25,9	670,0
M35	H	28	C	321,6	9,6	29,8	510,0
M36	M	28	C	SD	SD	SD	SD
M37	H	54	C	12,2	11,5	33,4	392,0
M38	M	39	C	144,0	10,8	32,0	776,0
M39	M	41	C	122,4	11,5	47,5	422,0
M40	M	66	C	446,0	12,7	38,3	20,0
M41	M	36	C	173,2	11,2	34,0	876,0
M42	M	29	C	3,8	7,9	23,0	11,0
M43	M	42	C	SD	SD	SD	SD
M44	H	30	C	SD	SD	SD	SD
M45	M	20	C	334,0	11,0	34,1	863,0
M46	H	31	C	SD	SD	SD	SD
M47	H	41	C	577,0	11,6	38,0	382,0
M48	M	75	C	112,4	4,8	15,0	570,0
M49	M	22	C	447,0	12,0	40,7	539,0
M50	H	88	C	117,0	9,0	27,1	55,0
M51	H	43	C	646,0	9,5	32,7	872,0
M52	M	74	C	SD	SD	SD	SD
M53	H	32	C	SD	SD	SD	SD
M54	H	18	C	308,0	8,8	33,2	1955,0
M55	H	30	C	SD	SD	SD	SD
M56	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD
M57	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD
M58	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD
M59	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD
M60	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD
M61	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD
M62	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD
M63	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD
M64	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD
M65	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD

H: hombre; M: mujer; C: crónica, A: acelerada; SD: sin datos. Valores de referencia, Leucocitos (Leu): 5 x 10³/μL - 10 x 10³/μL; Hemoglobina (Hb): 12 g/dL - 18 g/dL; Hematocrito (Hct): 35 % - 50 %; Plaquetas (Plq): 150 x10³/μL- 500 x10³/μL.

Tabla 14. Características clínicas de los pacientes y correlación con la expresión de los genes MAGE-A3, -MAGE-B2 y MAGE-C1.

	MAGE-A3		MAGE-B2		MAGE-C1	
	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
EDAD						
Media	37±18	40±16	36±ND	39±17	29±ND	40±17
Mediana	34	39	36	37	29	37
Intervalo	18-88	18-75	36	18-88	29	88-18
SEXO						
Mujer	3	19	1	21	1	21
Hombre	9	10	0	19	0	19
	0,018*					
FASE						
Crónica	11	28	1	38	1	38
Acelerada	1	1	0	2	0	2
Blástica	0	0	0	0	0	0
LEU						
278,9±194,2	253,1±197,9	173,2±ND	262,8±196,7	3,8±ND	267,1±192,8	
≥50x10 ³ /μL	11	24	1	34	0	35
<50x10 ³ /μL	1	5	0	6	1	5
	0,014*					
PLQ						
716,4±487,8	550,5±460,3	876,0±ND	592,1±472,4	11±ND	613,78±464,9	
≥80x10 ³ /μL	11	26	1	36	0	37
<80x10 ³ /μL	1	3	0	4	1	3
	0,002*					
HCT						
34,0±4,9	31,5±7,2	34,0±ND	32,25±6,8	23,0±ND	32,5±6,6	
Normal	9	16	1	24	0	25
Bajo	3	13	0	16	1	15
HB						
10,7±1,9	10,63±2,0	11,2±ND	10,65±1,9	7,9±ND	610,7±1,9	
Normal	3	7	0	10	0	10
Baja	9	22	1	30	1	30

Se analizaron 41 muestras de LMC para la correlación clínica. El valor de p indica la significancia entre la correlación de los genes MAGE-A3, -B2 y -C1 y las características clinicopatológicas de los pacientes. * : Significativo con valores de $p \geq 0.05$, ND: No determinado.

Se presentan las medias de cada parámetro así como el número de pacientes positivos y negativos. Podemos observar que el gen MAGE-A3 presenta un valor significativo de acuerdo al valor de pearson ($\rho \geq 0.05$) en relación al sexo de los pacientes. El resto de los parámetros no presenta significancia estadística.

La correlación resultante del gen MAGE-B2 no cuenta con valores estadísticamente significativos, además de que no se obtiene una desviación estándar debido a que solo se cuenta con un dato positivo a diferencia de los negativos que son mayoría.

Finalmente, MAGE-C1 presenta el mismo patrón que MAGE-B2 en lo concerniente a los pacientes positivos, no existe desviación estándar, pero sí para los negativos. A diferencia de los genes anteriores, MAGE-C1 cuenta con dos valores estadísticamente significativos, leucocitos con una $p=0.014$ y plaquetas con $p=0.002$.

Tabla 15. Características clínicas de los pacientes y correlación con la expresión del gen MAGE-A4.

		MAGE-A4	
		POSITIVO	NEGATIVO
EDAD	Media	43±24	42±17
	Mediana	41	39
	Intervalo	18-88	24-66
SEXO	Mujer	5	5
	Hombre	4	2
FASE	Crónica	9	7
	Acelerada	0	0
	Blástica	0	0
LEU		315,2±204,1	327,3±327,0
	≥50x10 ³ /μL	9	5
	<50x10 ³ /μL	0	2
PLQ		726,0±535,4	434,7±311,8
	≥80x10 ³ /μL	9	5
	<80x10 ³ /μL	0	2
HCT		33,5±9,0	30,0±5,0
	Normal	7	3
	Bajo	2	4
HB		9,9±2,2	10,0±1,7
	Normal	1	1
	Baja	8	6

Se analizaron 16 muestras de LMC para la correlación clínica. El valor de *p* indica la significancia entre la correlación del gen MAGE-A4 y las características clinicopatológicas de los pacientes. * : Significativo con valores de $p \geq 0.05$, ND: No determinado.

El número de expedientes analizados para el gen MAGE-A4 fue de 16 (expedientes completos) de los 33 pacientes analizados. Observamos que ninguno de los parámetros clínicos presenta una correlación estadísticamente significativa. La fase de la enfermedad no tiene relevancia puesto que todos los pacientes se encontraban en fase crónica lo cual no permite realizar una comparación estadística debido a la falta de las 2 fases restantes (acelerada, blástica).

Tabla 16. Características clínicas de los pacientes y correlación con la expresión de los genes BAGE-1, GAGE-2, LAGE-1 y NY-ESO-1.

	BAGE-1		GAGE-2		LAGE-1		NY-ESO-1	
	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
EDAD								
Media	ND	45±21	44±21	45±22	88±ND	41±18	36±24	50±19
Mediana		41	41	41	88	41	22	41
Intervalo		18-88	24-66	18-88	88	18-75	18-75	24-88
SEXO								
Mujer	ND	8	2	6	0	8	3	5
Hombre		6	1	5	1	5	2	4
FASE								
Crónica	ND	14	3	11	1	13	5	0
Acelerada		0	0	0	0	0	0	0
Blástica		0	0	0	0	0	0	0
LEU		336,1±257,5	296,6±163,2	346,8±283,3	117±ND	352,9±259,9	369,4±195,9	317,6±295,8
≥50x10 ³ /μL	ND	13	3	10	1	12	5	8
<50x10 ³ /μL		1	0	1	0	1	0	1
PLQ		635,4±467,5	317,3±261,2	722,1±481,5	55±ND	680,0±454,4	959,8±578,0	455,4±292,9
≥80x10 ³ /μL	ND	12	2	10	0	12	5	7
<80x10 ³ /μL		2	1	1	1	1	0	2
						0,001*		
HCT		33,1±7,4	38,5±8,8	31,6±6,7	27±ND	33,5±7,5	31,1±9,5	34,2±6,3
Normal	ND	10	2	8	0	10	4	6
Bajo		4	1	3	1	3	1	3
HB		10,2±1,9	11,2±1,5	9,9±2,0	9±ND	10,3±2,0	9,2±2,7	10,8±1,2
Normal	ND	2	1	1	0	2	1	1
Baja		12	2	10	1	11	4	8

Se analizaron 14 muestras de LMC para la correlación clínica. El valor de *p* indica la significancia entre la correlación de los genes BAGE-1, GAGE-2, LAGE-1 y NY-ESO-1 y las características clinicopatológicas de los pacientes. * : Significativo con valores de $p \geq 0.05$, ND: No determinado.

El número de pacientes con expediente completo fue de 16/33 para la realización de la correlación de los genes BAGE-1, GAGE-2, LAGE-1 y NY-ESO-1. En los dos primeros genes al igual que en NY-ESO-1 no se encontraron significancia estadística, mientras que para LAGE-1, tenemos un valor de $p=0.001$ para las plaquetas. Entre los 14 expedientes analizados no se encontraba alguno positivo para BAGE-1, es por esto que se muestra en la tabla en la columna de positivos un ND (no determinado) ya que al no haber pacientes positivos no pueden calcularse los valores.

En cuanto a las fases de la enfermedad no son relevantes en ninguno de los genes ya que todos los pacientes analizados se encontraban en fase crónica, por tanto no había otras fases para realizar la comparación.

6.8 DETECCIÓN DE LOS ANTIGENOS TESTICULARES DE CÁNCER EN DIFERENTES ESQUEMAS DE TRATAMIENTO ANTINEOPLÁSICO

Una vez determinada la expresión de los genes en muestras de LMC *de novo*, se comparó la expresión de dichos genes utilizando un parámetro importante, el tratamiento antineoplásico, de esta manera se observa como influye dicho tratamiento en la expresión de los genes MAGE. Para lograr lo anterior se recolectaron muestras de médula ósea de pacientes tratados con diferentes tratamientos quimioterapéuticos.

Las muestras fueron proporcionadas por la Unidad de Investigación Médico Oncológica (UIMEO) del hospital Centro Médico Nacional siglo XXI. Fue un total de 43 muestras (14 de Imatinib, 9 de Nilotinib, 3 de Dasatinib, 8 de Hidroxiurea y 11 de Interferon alfa), a las cuales para corroborar si eran viables y candidatas al análisis de los ATC, se les realizó RT-PCR para el gen GAPDH. Al final del análisis se descartaron 11 muestras. Las muestras analizadas fueron: 12 pacientes tratados con Imatinib, 6 con Nilotinib, 3 con Dasatinib, 3 con Hidroxiurea y 8 con Interferón alfa.

Los tratamientos se dividieron en dos categorías: *convencionales* a los cuales pertenecen el Interferón alfa y la Hidroxiurea, e *inhibidores de tirosina cinasa*, en este grupo se encuentran el Imatinib, Nilotinib y Dasatinib.

Se realizó RT-PCR para identificar la expresión de los antígenos testiculares de cáncer. Los resultados se muestran en la tabla 16.

Tabla 16. Frecuencia de los antígenos testiculares de cáncer (ATC) en pacientes tratados con inhibidores de tirosina cinasa y con los tratamientos convencionales.

	MAGE-A3	MAGE-A4	MAGE-B2	MAGE-C1	BAGE-1	GAGE-2	LAGE-1	NY-ESO-1
INHIBIDORES DE TIROSINA CINASA								
<i>n</i>	13	13	13	13	13	13	13	13
Positivos	9	7	0	0	2	0	0	0
Frecuencia	69,2 %	53,8%	0%	0%	15,3%	0%	0%	0%
TRATAMIENTOS CONVENCIONALES								
<i>n</i>	10	10	10	10	10	10	10	10
Positivos	5	2	0	1	0	0	0	2
Frecuencia	50,0%	20,0%	0%	10,0%	0%	0%	0%	20,0%

Los genes de mayor frecuencia son A3 y A4, mientras que para B2 y C1 no hubo expresión alguna. Lo anterior indica que bajo tratamiento la expresión de los genes MAGE no cambia, lo mismo ocurre con el gen BAGE-1.

En cuanto al resto de los ATC, cabe destacar que NY-ESO-1, GAGE-2 y LAGE-1 tienen una alta frecuencia al inicio de la enfermedad (sin tratamiento) 36,6% 20,0% y 13,3% y una vez que se administran inhibidores de tirosin cinasa esta frecuencia disminuye considerablemente, lo cual no ocurre en el caso de los genes MAGE, mencionados anteriormente.

Los tratamientos convencionales (Hidroxiurea e INF- α) afectan la expresión de los genes BAGE-1, LAGE-1 y GAGE-2 pero no la de NY-ESO la cual continúa siendo alta.

7. DISCUSIÓN

Durante el transcurso de los años y las investigaciones se ha demostrado que el mecanismo en leucemia es semejante que en los tumores sólidos, es decir, a través de factores epigenéticos como reporta Grunau en 2005 en células leucémicas, y los estudios que realizados en 2006 por Costa donde encontraron expresión de los ATC en células progenitoras, dato que nos da el punto de partida para suponer que en LMC ocurre un comportamiento semejante, debido a que el origen de esta leucemia es por una alteración en las células progenitoras hematopoyéticas (Fialkow 1978, Costa 2008). Los ATC junto a BCR/ABL serían los causantes de mantener la clona leucémica.

Los antígenos testiculares de cáncer tienen una importancia clínico-inmunológica considerable debido a que son reconocidos por los linfocitos T citotóxicos, lo cual les confiere la ventaja de ser utilizados en inmunoterapias futuras (De Smet, 1996). Lo anterior resulta de gran importancia ya que dichos genes no se encuentran en tejido normal a excepción de testículo y placenta, y su presencia indica una transformación neoplásica.

La función de los ATC no es del todo clara pero se sabe que actúan regulando mecanismos de proliferación y apoptosis en las células tumorales, lo cual hace aún más importante su utilización como marcadores tumorales (Yang, 2007).

Los genes pertenecientes a la familia MAGE, principalmente aquellos de la clase I (MAGE-A, -B y -C), fueron los primeros en describirse (van der Bruggen, 1999) y se les ha asociado con diferentes tipos de cáncer, tal es el caso de los genes de la familia A (Schultz 2002) los cuales se han encontrado en melanoma, carcinoma de esófago, cabeza y cuello, y en enfermedades hematológicas como linfoma, leucemia y mieloma. En esta última se han centrado gran variedad de trabajos, como el de Shichijo en 1995, Andrade en 2008 y recientemente Carvahlo en 2011. En el caso de las leucemias los trabajos reportados son pocos (Chambost 1993, Adams 2001, Martínez, 2007, Luetkens 2010).

La información que se tiene sobre los ATC nos conduce a un nuevo panorama asociado a la utilidad que podrían tener estos genes en enfermedades hematológicas, no solo leucemias sino también linfomas y otros síndromes mieloproliferativos (Hofmann, 2010).

Es por lo anterior que antes de identificar los ATC en los pacientes con leucemia mieloide crónica, se analizaron 8 líneas hematológicas pertenecientes a leucemia y linfoma, con el fin de conocer la expresión de estos ATC en enfermedades hematológicas, pues se sabe que estos genes comparten características con los denominados antígenos asociados a tumor (Linley, 2011) y como en otros cánceres, dichas características proporcionan una herramienta para utilizarlos principalmente como marcadores en inmunoterapia (Jones 1991, Chambost 2000). De las líneas utilizadas cinco pertenecen a leucemia, (Reh, Jurkat, HL-60, Molt-4 de leucemia aguda y K562 de leucemia crónica) y tres a linfoma (Raji, Ramos, U-937). Este análisis puede compararse con el que realizó Adams en 2001, reportó que el gen MAGE-A3 no se expresa en algunas líneas celulares hematológicas, (K562 y HL-60), mientras que en nuestro estudio encontramos no solo a la familia MAGE sino también otras familias, en K562: MAGE-A3, -A4, -B2, -C1, BAGE-1, GAGE-2, LAGE-1 y NY-ESO-1 y en HL-60: MAGE-A 3, -B2 y GAGE-2. De la misma manera que K562, se analizaron otras líneas, siendo algunas de ellas positivas para los ATC, tal como son Reh, positiva para MAGE-A3.

Además de Adams, Luetkens en 2010, analiza 31 ATC en diferentes líneas celulares de LMC, entre ellas K-562, la cual también fue utilizada en este estudio y, al igual que nosotros, se reporta que los genes con mayor expresión en dichas líneas son los genes MAGE, es importante mencionar a diferencia de nosotros Luetkens utiliza un desmetilante durante el cultivo de las líneas. Por lo anterior, es probable que la expresión de los genes MAGE en su estudio se deba a la inducción de la desmetilación.

Una vez completado el análisis a nivel de líneas celulares se procedió a observar el comportamiento de estos genes en leucemia mieloide crónica de pacientes *de novo*.

Los primeros ATC seleccionados, fueron los de la familia MAGE debido a su importancia como antígenos asociados a tumor (Hofmann 2010) y por su importancia en otros cánceres tal como reportan Artamova en 2004 y Yang en 2008 en neuroblastoma y melanoma respectivamente y por estudios realizados en leucemia por Chambost y Shichijo.

Además de las familias MAGE, existen otras de considerable importancia, como son los genes de la familia GAGE estudiados en melanoma (De Becker, 1999), NY-ESO-1 y LAGE-1 que por su alta similitud y coexpresión (Odunsi, 2003) se les ha considerado como blancos inmunoterapéuticos, y BAGE considerado como un marcador de patrones de desmetilación (Grunau 2005). Por estas características se incluyeron estas familias en el estudio.

El análisis de RT-PCR proporcionó datos interesantes de los ATC en los pacientes con leucemia. La frecuencia de expresión en leucemia en comparación con otros cánceres como mieloma múltiple es alta en algunos genes y baja para otros, Andrade en 2008 reporta que los genes MAGE-A3, -A4, GAGE, LAGE-1, BAGE-1 y NY-ESO-1 la frecuencia es de 36%, 0%, 33%, 49%, 28% y 33% respectivamente mientras que en nuestro estudio es de 32.3% para MAGE-A3, 63.6% MAGE-A4, BAGE-1 6.6%, GAGE-2 20% y NY-ESO-1 36.6%. En cuanto a los estudios realizados en leucemia por otros grupos de investigación, tenemos a Shichijo en leucemia aguda, encontrando que había expresión de MAGE en los linfocitos T, contrariamente, Chambost años atrás había reportado que no existía expresión de MAGE en médula ósea de leucemias agudas. Martínez en 2007 realizó una comparación en diferentes leucemias *de novo*, utilizó leucemias agudas (LLA y LMA) y LMC, analizó los genes MAGE-A1, -A3 y -B2 encontrando frecuencias relevantes, en LMA 41.2%, en LLA 30.26% y finalmente en LMC 20%, cabe destacar que este último porcentaje resultó del análisis de 5 muestras de LMC, a diferencia de este número, en este trabajo se analizaron un total de 65 muestras, el porcentaje de expresión fue de 32,30% y esto se corrobora con lo que reporta Martínez, pues los primers utilizados para la amplificación son los mismos así como la población de estudio; pacientes que asisten al servicio de Hematología del Hospital General de México.

La diferencia comparada con cánceres no hematológicos es considerable, como reporta Schultz en 2002 donde la frecuencia del gen MAGE-A3 está por encima de lo encontrado, cáncer de vejiga en un 36%, de esófago en 47% y por supuesto en melanoma el cual le dio su nombre, en un 73%. Estas discrepancias se deben a que la leucemia es un cáncer en suspensión, las células se hallan distribuidas en todo el organismo puesto que recorren los vasos sanguíneos en cargados de oxigenar el organismo, además una leucemia implica varios tipos celulares y no solo uno como sucede en los tumores sólidos, por ejemplo hepatocitos en el caso del cáncer de hígado.

En lo referente a los otros ATC las frecuencias más altas, incluso por arriba de MAGE-A3, pertenecen a MAGE-A4 y NY-ESO-1 con 63,30% y 36,6% respectivamente, seguidos de MAGE-A3 (32,30%), GAGE-2 (20,00%), LAGE-1 (13,00%) y finalmente los de menor frecuencia BAGE-1 (6,00%), MAGE-C1 (3,00%) y MAGE-B2 (1,50%).

En lo concerniente a coexpresión entre los ATC, algunos pacientes (16/65) tuvieron 2 o más genes, una muestra interesante fue la 57 la cual presenta 6 de los 8 ATC analizados, esas células no expresaban MAGE-B2 y -C1. A pesar de que se ha reportado en distintos artículos que existe coexpresión entre NY-ESO-1 y LAGE-1, en nuestros pacientes no se presentó ese caso, exceptuando la muestra 57.

La importancia de estos genes, como ya se ha mencionado, radica en que son reconocidos por el sistema inmune, que les confiere una característica importante para ser blancos moleculares, esto se logra mediante la identificación de la proteína de alguno de estos ATC, dentro de las proteínas más estudiadas está la del gen MAGE-A3 (Kocher, 1995) y fue la proteína identificada. Pudimos observar que en la mayoría de los pacientes está presente dicha proteína, mismos que fueron positivos para el análisis por RT-PCR del gen, contrariamente, pacientes que fueron positivos para el análisis del mRNA no presentaron la proteína al momento de llevar a cabo el Western-blot, los motivos podrían ser diversos, por ejemplo un RNA de interferencia que pueda ser el responsable de la inactivación de la proteína.

Si bien es cierto que MAGE-A3 es un importante blanco inmunoterapéutico, en los últimos años se han propuesto otros blancos moleculares, tal es el caso de NY-ESO-1 y LAGE-1 (Carvahlo, 2011).

No solo se han realizado estudios de frecuencia con los ATC, sino también correlaciones clínicas, punto que se abordó en el presente trabajo. Gjerstorff en 2010, relacionó a GAGE con el pronóstico en pacientes de mieloma múltiple.

No se ha descrito una correlación clínica en LMC para los genes analizados en el presente, Luetkens en 2010 reportó correlación en LMC usando el gen PRAME, que también forma parte de la familia de ATC, se encontraron valores significativos en las fases de la enfermedad, en el tratamiento con tirosina cinasa y en la presencia del gen BCR/ABL. El artículo de Luetkens hasta ahora es el primero que reporta correlación clínica en LMC con antígenos testiculares, se analizó 31 ATC, pero la correlación se realizó con PRAME. En nuestro estudio, la correlación se lleva a cabo con la participación de los 8 genes analizados dando resultados interesantes. Los valores significativos pertenecen al gen MAGE-C1 en plaquetas, con una $p = 0,002$ y en leucocitos $p=0,014$, así también se demostró significancia en el gen MAGE-A3 en el sexo de los pacientes, LAGE-1 fue relevante estadísticamente en plaquetas. En lo concerniente al resto de los ATC incluidos, su importancia se ha centrado principalmente en la inmunoterapia destacando NY-ESO-1, y BAGE-1 como gen de estudio de los patrones epigenéticos de los ATC (Grunau, 2005).

El estudio que se realizó en la muestra de pacientes tratados bajo diferentes quimioterapéuticos, nuevamente los genes de mayor frecuencia fueron -A3 y -A4 y esto, aunado al análisis de los genes en pacientes con LMC *de novo*, demuestra una vez más que la presencia de los genes no es relevante en el pronóstico del paciente aún estando sometido a quimioterapia convencional o no.

Finalmente, en la RT-PCR realizada a la muestra de pacientes tratados bajo diferentes quimioterapéuticos, nuevamente los genes de mayor frecuencia fueron MAGE-A3 y -A4, aunado al análisis de los genes en pacientes con LMC *de novo*, se demuestra que la presencia de los genes no es relevante en el pronóstico del paciente aún estando sometido a quimioterapia convencional o no, tentativamente, ya que no se podría generalizar porque fueron pocas muestras se necesitaría

incrementar el número. En el caso de los otros ATC (BAGE-1, GAGE-2, LAGE-1 y NY-ESO-1) los tratamientos sí tuvieron impacto, tal es el caso de los genes NY-ESO-1, LAGE-1 y GAGE-2 los cuales al analizarlos en pacientes tratados con inhibidores de tirosina cinasa presentaron una disminución en la frecuencia de expresión. Aunque estos genes no sean de importancia en el pronóstico de los pacientes que padecen LMC, son de gran importancia en el tratamiento de estos, puesto que son una alternativa para una terapia dirigida ya que podrían ser utilizados en aquellos pacientes refractarios a los tratamientos de elección incluso imatinib.

8. CONCLUSIONES

1. No hay expresión de los ATC en sangre periférica de individuos sanos.
2. La línea celular K562 expresa todos los ATC analizados.
3. La frecuencia de expresión del gen MAGE-A4 fue la más alta seguida del gen MAGE-A3 y NY-ESO-1.
4. El gen MAGE-A4 fue el de mayor frecuencia para las células mononucleares de médula ósea con un 64.7%.
5. Los genes BAGE-1, GAGE-2, LAGE-1, MAGE-B2 y MAGE-C1 fueron los de menor frecuencia y relevancia clínica.
6. Existe coexpresión entre los ATC
7. La proteína se encuentra presente en los pacientes que fueron positivos para el RNA mensajero de MAGE-A3.
8. Los antígenos testiculares de cáncer están presentes en células mononucleares de LMC bajo tratamiento.
9. Los tratamientos tanto convencionales como inhibidores de tirosina cinasa, no juegan un papel determinante en la expresión de los genes MAGE puesto que su frecuencia de expresión no se ve afectada
10. La expresión de los genes NY-ESO-1, GAGE-2 y LAGE-1 disminuye en aquellos pacientes que son tratados con inhibidores de tirosina cinasa.
11. La presencia de ATC en las células de leucemia podría jugar un papel importante en el tratamiento, utilizando una inmunoterapia para atacar a las células malignas ya que dichos antígenos pueden ser reconocidos por los linfocitos T CD8+

9. PERSPECTIVAS

1. Como un objetivo a corto plazo para continuar con este trabajo, se plantea llevar a cabo el análisis de supervivencia de los pacientes incluidos en el estudio, mediante la recopilación total de los expedientes.
2. Monitorear al paciente una vez que se vuelve subsecuente y comparar la expresión de los genes al inicio del tratamiento y después de este.
3. Incrementar en número de muestras a 100
4. Obtener un número mayor de muestras de pacientes bajo tratamiento
5. Analizar los ATC incluidos en el estudio a nivel cuantitativo utilizando PCR en tiempo real (qRT-PCR), con la finalidad de determinar enfermedad mínima residual

10.REFERENCIAS

1. Adams SP, Sahota SS, Mijovic A, Czepulkowski B, Padua RA, Mufti GJ, Guinn BA. Frequent expression of *HAGE* in presentation chronic myeloid lukaemias. *Leukemia*. 16 (2002): 2238-2242
2. Andrade VC, Vettore AL, Felix RS, Almeida MS, Carvalho F, Oliveira JS, Chauffaille ML, Andriolo A, Caballero OL, Zago MA, Colleoni GW. Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients. *Cancer Immun*. 2008,11, 1-5.
3. Artamova I, Gelfand M. Evolution of the Exon-Intron structure and alternative splicing of the MAGE-A family of Cancer/Testis Antigens. *Journal of molecular evolution* 2004, 59, 620-631
4. Bao L, Dunham K, Lucas K. MAGE-A1, MAGE-A3, and NY-ESO-1 can be upregulated on neuroblastoma cells to facilitate cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor cell killing. Cancer Immunol Immunother. 2011
5. Barker P. A., Salehi A. The MAGE proteins: Emerging Roles in Cell Cycle Progression, Apoptosis and Neurogenetic Disease. *Journal of Neuroscience Research*. 67 (2002):705-712.
6. Bianchi C, Cairoli R, Marengo P, Muti G, Del Monte U, Perego RA. Detection by polymerase chain reaction of BCR/ABL transcripts in myeloproliferative diseases at time of diagnosis and for monitoring chronic myelogenous leukaemia patients after bone marrow transplantation. *European Journal of cancer* 1995, 2, 197-201.
7. Bollati V, Baccarelli A, Hou L, Bonzini M, Fustinoni S, et al. Changes in DNA Methylation Patterns in Subjects Exposed to Low-Dose Benzene. *Cancer Research*, 2007, 67, 876-880.
8. Boon T. Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J Exp Med*. 1996, 183, 725
9. Butturini A, Gale RP, Keating A, Armitage J, Burnett A, Newland A. *Haematological Oncology*. Vol 2. Cambridge: Cambridge University Press, 1992; 103-117

10. Carvahlo F, Vettore A, Inaoka R, Karia B, et al. Evaluation of LAGE-1 and NY-ESO-1 expression in multiple myeloma patients to explore possible benefits of their homology for immunotherapy. *Cancer Immunol* 2011, 11,1-5
11. Cervantes F, Colomer D, Vives-Corrons JL, Rozman C, Montserrat E. Chronic myeloid leukemia of thrombocytemic onset: a CML subtype with distinct hematological and molecular features. *Leukemia* 1996, 10, 1241-1243.
12. Chambost H, Van Baren N, Brasseur F, Godelaine D, Xerri L, Landi S, Theate I, Plumas J, Spagnoli G, Michel G, Coulie P, Olive D.. Expression of gene MAGE-A4 in Reed-Sternberg Cells. *Blood*. 95, (2000): 3530-3533
13. Chambost H, Brasseur F, Coulie P. A tumor associated antigen expression in human haematological malignances. *J Haematology* 1993, 84, 424.
14. Chen, Y. Genomic cloning and localization of CTAG, a gene encoding an autoimmunogenic cancer-testis antigen NY-ESO, to human chromosome Xq28. *Cytogenet. Cell Genet.*79(1997):237-240
15. Chomez P, De Backer O, De Plaen E, Boon T, Lucas S. An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family. *Cancer research* 2001, 61, 5544-5551
16. Costa F, Le Blanc C, Brodin B. Concise Review: Cancer/Testis Antigens, Stem Cells, and Cancer. *Stem Cells*. 25 (2007): 707-711
17. Daley GQ, Van Etten R, Baltimore D. Induction of CML in mice by p210 bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 1990, 247, 824-830
18. De Backer O, De Smet C, De Plaen E, Brasseur F, Chomez P, van der Bruggen P. Characterization of the GAGE Genes That Are Expressed in Various Human Cancers and in Normal Testis. *Cancer Research* 1999, 59, 3157–3165
19. De Carvalho F, Vettore AL, Inaoka R, Karia B, Andrade V, Gnjatic S, Jungbluth AA, Colleoni G. Evaluation of LAGE-1 and NY-ESO-1 expression in multiple myeloma patients to explore possible benefits of their homology for immunotherapy. *Cancer Immunity*. 2011, 11, 1

20. De Klein A, Van Kessel AG, Grosveld G. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukemia. *Nature* 1982, 300, 765-767.
21. De Plaen E, Arden K, Travesari C, et al. Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics* 1994, 40, 360-369
22. De Smet C, De Backer O, Faraoni I, Lurquin C, Brasseur F, Boon T. The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Genetics* 1996, 93, 7149-7153
23. Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumors. *Journal of Pathology* 2002, 196, 1-7
24. Fialkow PJ, Denaman AM, Jacobson RI, Lowenthal MN. Chronic myelocytic leukemia. Origin of some lymphocytes from leukemic stem cells. *Journal of Clinical Investigation*. 1978, 62, 158-163
25. Gjestorff M, Burns JS, Nielsen O, Kassem M, Ditzel H. Epigenetic modulation of cancer-germline antigen gene expression in tumorigenic human mesenchymal stem cells, implications of cancer therapy. *The American Journal of Pathology* 2009, 175, 314-323
26. Gjerstorff MF, Besir H, Larsen MR, Ditzel HJ. Expression, purification and characterization of the cancer-germline antigen GAGE12I: a candidate for cancer immunotherapy. *Protein Expr Purif*. 2010, 73, 217-22
27. Gjerstorff MF, Harkness L, Kassem M, Frandsen U, Nielsen O, Lutterodt M, Møllgård K, Ditzel HJ. Distinct GAGE and MAGE-A expression during early human development indicate specific roles in lineage differentiation. *Hum Reprod*. 2008, 23, 2194-201.
28. Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* 1984, 36, 93.
29. Grunau C, Sanchez C, Ehrlich M, van der Bruggen P. Frequent DNA hypomethylation of human juxtacentromeric BAGE loci in cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005 May;43(1):11-24

30. [Guinn BA](#), [Bland EA](#), [Lodi U](#), [Liggins AP](#), [Tobal K](#), [Petters S](#), [Wells JW](#), [Banham AH](#), [Mufti GJ](#). Humoral detection of leukaemia-associated antigens in presentation acute myeloid leukaemia. [Biochem Biophys Res Commun](#). 2005, 335, 1293-304.
31. Hesiterkamp N, Stephenson JR, Groffen J, Hansen PF, de Klein A, Bartram CR. Localization of the c-abl adjacent to a translocation breakpoint in CML. *Nature* 1983, 306, 239-242.
32. Hofmann S, Greiner J. Immunogenic antigens as therapeutic targets against myeloid leukaemic cells. *Leukemia Research* 2010, 34, 850-851.
33. Hudolin T, Kastelan Z, Derezić D, Basić-Jukić N, Cesare Spagnoli G, Juretić A, Jezek D. Expression of MAGE-A1, MAGE-A3/4 and NY-ESO-1 cancer-testis antigens in fetal testis. *Acta Dermatovenerol Croat*. 2009;17,103-7.
34. Jones RJ, Ambinder RF, Piantadosi S, Santos GW. Evidence of graft-versus-lymphoma effect associated with allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1991, 77, 649
35. Kantarjian H, Wunderle L, Giles F. "Nilotinib in Imatinib-Resistant CML and Philadelphia Chromosome–Positive ALL," *N Engl J Med*. 354, no. 24 (2006).
36. Kocher T, Schultz E, Gudat F, et al. Identification and Intracellular Location of MAGE-3 Gene Product. *Cancer Research*, 1995, 55, 2236-2239
37. Kurzrock R, Kantarjian HG, Shtalrid M, Gutterman JU, Talpaz M. Philadelphia chromosome-negative chronic myelogenous leukemia without breakpoint cluster region rearrangement: a chronic myeloid leukemia with a distinct clinical course. *Blood*, 1990, 75, 445-452
38. Kudela P, Sun Z, Fourcade J, Janjic B, Kirkwood JM, Maillere B, Zarour HM. Epitope hierarchy of spontaneous CD4+ T cell responses to LAGE-1. *J Immunol*. 2011 Jan 1;186, 312-22.
39. [Linley AJ](#), [Ahmad M](#), [Rees RC](#). Tumour-associated antigens: considerations for their use in tumour immunotherapy. [Int J Hematol](#). 2011, 93, 263-73.
40. Luetkens T, Schafhausen P, Uhlich F, et al. Expression, epigenetic regulation, and humoral immunogenicity of cancer-testis antigens in chronic myeloid leukemia. *Leukemia Research*, 2010. 34, 1647–1655.

41. Maio M. Analysis of Cancer/Testis Antigens in Sporadic Medullary Thyroid Carcinoma: Expression and Humoral Response to NY-ESO-1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 88(2003):748-754
42. Martinelli G, Amabile M, Giannini B, Terragna C, Ottaviani E, Soverini S, Saglio G, Rosti G, Baccarani M. (2002) *Haematology*; 87: 688-694
43. Martínez A. (2006). Activación de clonas de células T en contra de blastos de Leucemia Aguda mediante antígenos tumorales de MAGE-A3. Tesis de Doctorado. CINVESTAV.IPN. México D.F.
44. Maru Y, Witte ON. The *BCR* gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exón. *Cell* 1991, 67, 459-468.
45. McKenzie, S. Hematología Clínica. 2ª edición. México. Editorial El Manual Moderno, 2002. Pp 429-432, 455-471.
46. Monte M, Simonatto M, Peche LY. MAGE-A tumor antigens target p53 transactivation function through histone deacetylase recruitment and confer resistance to chemotherapeutic agents. *Proc Natl Acad Sci*, 2006, 103, 11160-11165
47. Muscatelli F, Abrous, DN, Massacrier A, Boccaccio I, Le Moal M, Cau P, Cremer H. Disruption of the mouse *Necdin* gene results hypothalamic and behavioral alterations reminiscent of the human Prader-Willi syndrome. 2000
48. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *J Nat Cancer* 1960, 25, 82-109
49. O'Brien SG, Guilhot S, Larson R, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F. Imatinib versus interferon and low-dose Ara-C in patient with newly-diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia. *New Englan Journal of Medicine*, 2003, 348, 994-1004
50. Odunsi K, Jungbluth AA, Stockert E, Qian F. NY-ESO-1 and LAGE-1 cancer-testis antigens are potential targets for immunotherapy in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res*. 2003 63, 6076-83
51. O'Hare T, Walters DK, Stoffregen EP. In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants. *Cancer Res*. 2005;65:4500-4505.

52. Otto SP, Walbot V. DNA methylation in eukaryotes: kinetics of demethylation and *de novo* methylation during the life cycle. *Genetics* 1990, 124, 429-437
53. Pane F, Frigeri F, Sindona M, Luciano L, Ferrara F, Cimino R. Neutophilic chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). *Blood* 1998, 88, 2410-2414
54. Rao M, Chinnasamy N, Hong JA, Zhang Y, Zhang M, Xi S, Liu F, Marquez VE, Morgan RA, Schrupp DS. Inhibition of Histone Lysine Methylation Enhances the Expression of Cancer-Testis Genes in Lung Cancer Cells: Implications for Adoptive Immunotherapy of Cancer. *Cancer Res.* 2011
55. Rogner UC, Wilke K, Steck E, Korn B, Poustka A. The melanoma antigen gene (MAGE) family is clustered in the chromosomal band Xq28. *Genomics* 1995, 29, 725-731
56. Rowley JD. A new chromosomal consistent abnormality in chronic myelogenous leukemia indentified by quinacrine fluorescence and Giemsa banding. *Nature* 1973, 243, 290-293.
57. Russo V, Tanzarella S, Delerba P, Rigatti D, Rovere P, Villa A, Bordignon C, Traversari C. Dendritic cells acquire the MAGE-3 human tumor antigen from apoptotic cells and induce a class I-restricted T cell response. *PNAS* 2000, 97, 2185-2190
58. Salto M, Shelat S, Benoit B, Rennert H, Carroll M, Leonard D, Nowell P, Bagg A. Multiplex RT-PCR for detection of Leukemia-Associated Translocations. *Journal of Molecular Diagnosis*, 2003, 5, 231-236
59. Sanz-Sabrafen J, Besses C, Vives JL. *Hematología clínica*. Quinta ed. Elsevier. España. 2001. p. 377-406
60. Sharma P, Gnjjatic S, Jungbluth AA, Williamson B, Herr H, Stockert E, Dalbagni G, Donat SM, Reuter VE, Santiago D, Chen YT, Bajorin DF, Old LJ. Frequency of NY-ESO-1 and LAGE-1 expression in bladder cancer and evidence of a new NY-ESO-1 T-cell epitope in a patient with bladder cancer. *Cancer Immun.* 2003, 3:19.

61. Shichijo S, Sagawa K, Brasseur F, Boon T, Itoh K. MAGE-1 gene is expressed in T-cell leukemia. *Int J of Cancer* 1996, 65, 709.
62. Schultz E. S, Lethé B, Cambiaso C, Van Snick J, Chaux P, Corthals J, Heirman C, Rhielemans K, Boon T, van der Bruggen P. A MAGE Peptide Presented by HLA-DP4 Is Recognized on Tumor Cells by CD4+ Cytolytic T Lymphocytes. *CancerResearch*. 60 (2002):6272-6275.
63. Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Roe BA, Canaani E. Alternative splicing of RNAs transcribed from the human *abl* gene and from the *bcr-abl* fused gene. *Cell* 1987, 47, 277-284.
64. Shtivelman E, Gale RP, Dreazen O. *bcr-abl* RNAm in patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1987, 69, 971-973
65. Sokal JE, Cox EB, Baccarani M, Tura S, Gómez GA, Robertson JE. Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. *Blood* 1984, 63, 789-799
66. Takahashi K. [et al.]. Identification of MAGE-1 and MAGE-4 Proteins in Spermatogonia and Primary Spermatocytes of Testis. *CancerResearch*. 55 (1995): 3478-3482
67. Telegeev GD, Dubrovskaya AN, Dybkov MV, Maliuta SS. Influence of BCR/ABL fusion proteins on the course of Ph leukemias. *Acta Bioquímica Polónica* 2004, 51, 845-849
68. Thomas X, Boiron JM, Huguet F, Dombret H, Bradstock K, Vey N. Outcome of treatment of adults with acute lymphoblastic leukemia: analysis of LALA-94 trial. *Journal of Clinical Oncology* 2004
69. Tirado L., Mohar A. Epidemiología de las Neoplasias Hemato-oncológicas. *Cancerología* 2 (2007): 109-120
70. Van der Bruggen P, Traversati C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1999, 254, 1443
71. Yang B, O'Herrin S, Wu J. Select cancer testis antigens of the MAGE-A, -B and -C families are expressed in mast cell lines and promote cell viability *in vitro* and *in vivo*. *J invest Dermatol* 2007, 127, 267-275

72. Yang B, O'Herrin S, Wu J. MAGE-A, mMAGE-b, and MAGE-C proteins form complexes with KAP1 and suppress p53-dependent apoptosis in MAGE-Positive cell lines. *Cancer Research* 2007, 67, 9954-9962
73. Yasukawa M. Immunotherapy and cell therapy for myeloid leukemia. [Nippon Rinsho](#). 2009, 67, 938-43.
74. Jung V, Fischer E, Imig J, Kleber S, Nuber N, Reinshagen F, Kamradt J, Grobholz R, Knuth A, Renner C, Wadle A. Yeast-based identification of prostate tumor antigens provides an effective vaccine platform. *Anticancer Res.* 2010, 30, 895-902.
75. Wischnewski F, Pantel K, Schwarzenbach H. Promoter demethylation and histone acetylation mediate gene expression of MAGE-A1,-A2,-A3 and – A12 in human cancer cells. *Molecular Cancer Research* 2006, 4, 1-11
76. Zhang WM, Xiao G, Zhang M, Guo AL, Dong Y, Wen JM. Expression of NY-ESO-1 and LAGE-1 cancer-testis antigens in hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 2005, 34, 202-5.

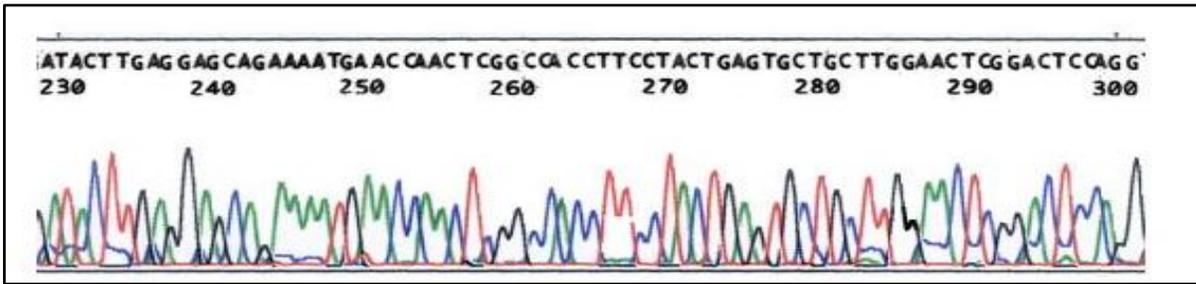
Soporte Electrónico

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- SEQUENCE SCANNER. APPLIED BYOSYSTEMS
- SPSS. Programa para análisis bioestadístico

ANEXOS

ANEXO 1

MAGE-A3



A)

NCBI Reference Sequence: NM_005362.3

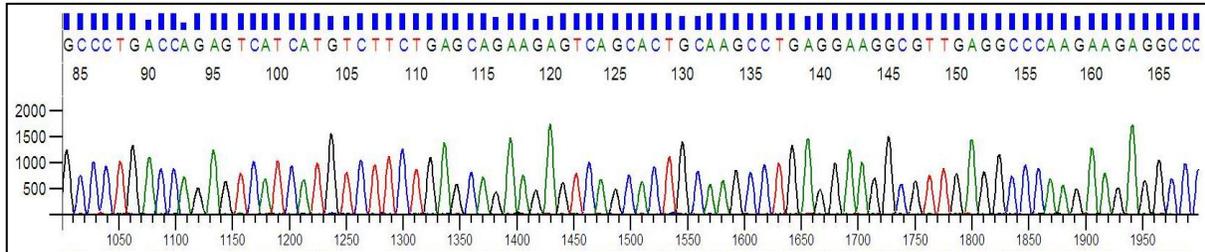
1	gagattctcg	cctgagcaa	cgagcgacgg	cctgacgtcg	gcgaggaggaa	gccggcccag
61	gctcggtgag	gaggcaaggt	tctgagggga	caggctgacc	ggaggacca	gaggcccccg
121	gaggagcact	gaaggagaag	atctgccagt	gggtctccat	tgcccagctc	ctgccacac
181	tcccgcctgt	tgccctgacc	agagtcatca	tgccctttga	gcagaggagt	cagcaactgca
241	agcctgaaga	aggccttgag	gcccgaggag	aggccctggg	cctggtgggt	gcgcaggctc
301	ctgctactga	ggagcaggag	gtgectctct	cctctttctac	tctagttgaa	gtcaccctgg
361	gggaggtgcc	tgctgcccag	tcaccagatc	ctccccagag	tcctcaggga	gcctccagcc
421	tccccactac	catgaactac	cctctctgga	gccaatccta	tgaggactcc	agcaaccaag
481	aagaggagg	gccaaagcacc	ttccctgacc	tgaggtccga	gttccaagca	gcactcagta
541	ggaaggtggc	cgagttgggt	cattttctgc	tcctcaagta	tgagaccagg	gagccggtca
601	caaaggcaga	aatgctgggg	agtgtcgtcg	gaaattggca	gtatttcttt	cctgtgatct
661	tcagcaaagc	ttccagttcc	ttgcagctgg	tctttggcat	cgagctgatg	gaagtggacc
721	ccatcggcca	cttgtacatc	tttgccacct	gcctgggct	ctcctacgat	ggcctgctgg
781	gtgacaatca	gatcatgccc	aaggcaggcc	tcctgataat	cgctcc	tgggcc
841	gagagggcga	ctgtgcccct	gaggagaaaa	tctgggagga	gctgagtgtg	ttagaggtgt
901	ttgaggggag	ggaagacagt	atcttggggg	atcccaagaa	gctgctcacc	caacatttcg
961	tgcaggaaaa	ctacctggag	taccggcagg	tccccggcag	tgatcctgca	tgttatgaat
1021	tcctgtgggg	tccaagggcc	ctcgttgaaa	ccagctatgt	gaaagtcctg	caccatattg
1081	taaagatcag	tggaggacct	cacatttctt	acccaccctt	gcatgagtgg	gttttgagag
1141	agggggaaga	gtgagtctga	gcacgagttg	cagccagggc	cagtgggagg	gggtctgggc
1201	cagtgcacct	tccggggccg	catcccttag	tttccactgc	ctcctgtgac	gtgaggcca
1261	ttcttcactc	tttgaagcga	gcagtcagca	ttcttagtag	tgggtttctg	ttctgttgga
1321	tgactttgag	attattcttt	gtttcctggt	ggagttgttc	aaatgttctt	ttaacggat
1381	ggttgaatga	gcgtcagcat	ccaggtttat	gaatgacagt	agtcacacat	agtgtgtttt
1441	atatagttta	ggagtaagag	tcttgTTTTT	tactcaaat	gggaaatcca	ttccattttg
1501	tgaattgtga	cataataata	gcagtggtaa	aagtatttgc	ttaaattgt	gagcgaatta
1561	gcaataacat	acatgagata	actcaagaaa	tcaaaagata	gttgattctt	gccttgacc
1621	tcaatctatt	ctgtaaaatt	aaacaaatat	gcaaaccagg	atttccttga	cttctttgag
1681	aatgcaagcg	aaattaaatc	tgaataaata	attcttctc	ttcaaaaaaa	aaaaaaaaaa
1741	aaaaaaaaaa	aaa//				

B)

Secuencia del mRNA del gen MAGE-A3. En A) se observa un fragmento del producto secuenciado. B) █ Primers utilizados para la amplificación del gen █ secuencia amplificada del nucleótido 131 al 758 dando un producto de 627 pb, █ secuencia de la figura A

ANEXO 2

MAGE-A4



A)

NCBI Reference Sequence: NM_001011548.1

```

1 agagacaagc gagcttctgc gtctgactcg cagcttgaga ctggcggagg gaagcccgcc
61 caggctctat aaggagacaa ggttctgagc agacaggcca accggaggac aggattccct
121 ggaggccaca gaggagcacc aaggagaaga tctgcctgtg ggtccccatt gccagctttt
181 tgcttgcaact cttgcctgct gccctgacca gagtcatcat gtcttctgag cagaagagtc
241 agcactgcaa gcctgaggaa ggcgttgagg cccaagaaga ggccctggggc ctgggtgggtg
301 cacaggctcc tactactgag gaggcaggagg ctgctgtctc ctctctctct cctctggctc
361 ctggcaccct ggaggaagtg cctgctgctg agtcagcagg tcctccccag agtcctcagg
421 gaggctctgc cttaccact accatcagct tcaacttgctg gaggcaacc aatgagggtt
481 ccagcagcca agaagaggag gggccaagca cctcgcctga cgcagagctc ttggtccgag
541 aagcactcag taacaagggt gatgagttgg ctcatcttct gctccgcaag tatcgagcca
601 aggagctggt cacaaaggca gaaatgctgg agagagtcac caaaaattac aagcgtgct
661 ttctgtgat ctctcgcaaa gcctccgagt cctgaagat gatctttggc attgacgtga
721 aggaagtga ccccgccagc aacacctaca ccctgtcac ctgcctgggc ctttctatg
781 atggcctgct gggtaataat cagatctttc ccaagacagg cttctgata atcgtcctgg
841 gcacaattgc aatggagggc gacagcgcct ctgaggagga aatctgggag gagctgggtg
901 tgatgggggt gtatgatggg agggagcaca ctgtctatgg ggagcccagg aaactgctca
961 cccaagattg ggtgcaggaa aactacctgg agtaccggca ggtaccggc agtaatcctg
1021 cgcgctatga gttcctgtgg ggtccaaggg ctctggctga aaccagctat gtgaaagtcc
1081 tggagcatgt ggtcagggtc aatgcaagag ttgcattgc ctaccatcc ctgctgaa
1141 cagctttggt agaggaggaa gagggagtct gagcatgagt tgcagccagg gctgtgggga
1201 aggggcagg ctgggccagt gcatctaaca gcctgtgca gcagctccc ttgctcgtg
1261 taacatgagg ccattcttc actctgtttg aagaaaatag tcagtgttct tagtagtggg
1321 tttctatctt gttggatgac ttggagattt atctctgttt cttttacaa ttgttgaat
1381 gttcctttta atggatggt gaattaact cagcatcaa gtttatgaat cgtagttaac
1441 gtatattgct gttaatatag tttaggagta agagtcttgt tttttattca gattgggaaa
1501 tccgttctat tttgtgaatt tggacataa taacagcagt ggagtaagta tttagaagtg
1561 tgaattcacc gtgaaatagg tgagataat taaaagatac ttaattccc ccttatgct
1621 cagtctatc tgtaaaattt aaaaaatata tatgcatacc tggatttctc tggcttcgtg
1681 aatgtaagag aaattaaatc tgaataaata attcttctg ttaa//

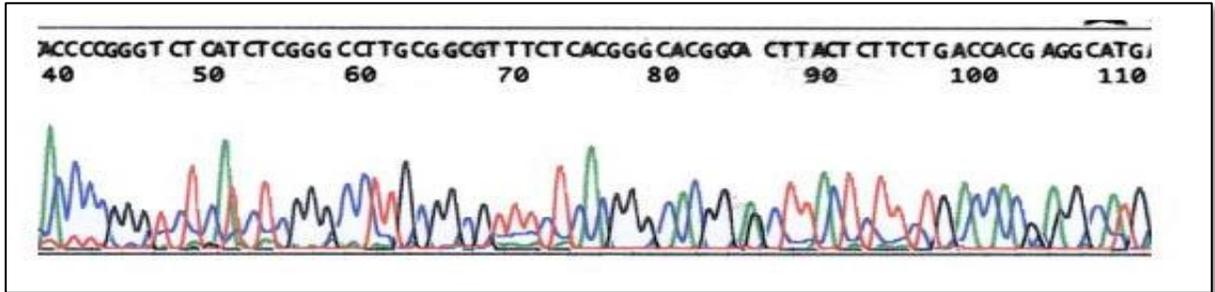
```

B)

Secuencia del mRNA del gen MAGE-A4. En A) se observa un fragmento del producto secuenciado. B) █ Primers utilizados para la amplificación del gen █ secuencia amplificada del nucleótido 152 al 452 dando como resultado un producto de 300 pb, █ secuencia de la figura A

ANEXO 3

MAGE-B2



B)

NCBI Reference Sequence: NM_002364.4

```

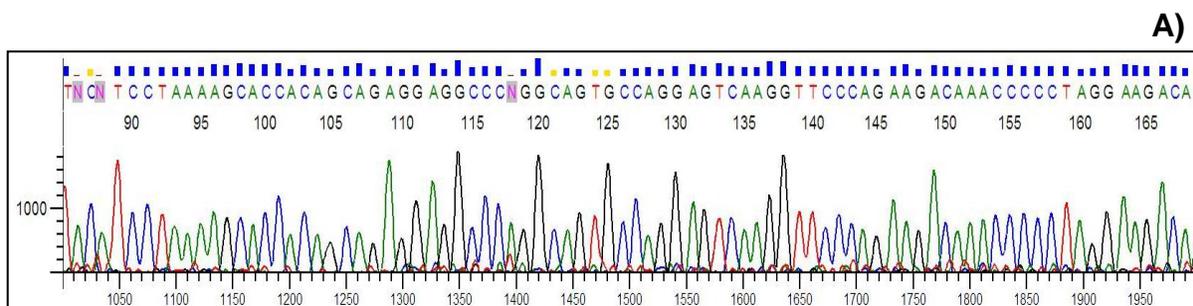
1  tcctgacttc cgctttggag gcgaggacc gagcgagtgt agggggtgcg gcgtctggtc
61  agccaggggt gaattctcag gactggtcgg cagtcaagcc aTcatgcctc gtggtcagaa
121 gagtaagctc cgtgcccctg agaaacgcc caaggcccga gatgagacc ggggtctcaa
181 tgttcctcag gtcactgaag cagaggaaga agaggccccc tgcTgttctc cttctgtttc
241 tgggggtgct gcttcaagct ctctgctgc tggcattccc caggagcctc agagagcccc
301 aaccactgcc gctgctgcgg ctgcggtgtg ttcattccca aatctaaaa aagggtgcaa
361 gagccaccaa ggtgagaaaa atgcaagttc ctcccaggcc tcaacatcca ctaagagccc
421 aagcgaagat cctctaacca ggaagtcagg gtcgttggtg cagttcctgt tgtacaagta
481 taaaataaaa aagtccgtta caaagggaga aatgctgaaa attggtggca aaaggttcag
541 ggagcacttc cctgagatcc tcaagaaagc ctctgagggc ctcagtgttg tctttggcct
601 tgagctgaat aaagtcaacc ccaacggcca cacttacacc ttcattcgaca aggtagacct
661 cactgatgag gaatccctgc tcagttcctg ggactttccc aggagaaagc ttctgatgcc
721 tctcctgggt gtgatcttct taaatggcaa ctcagctact gaggaagaga tctgggaatt
781 cctgaatatg ttgggagtct atgatggaga ggagcactca gtctttgggg aacctggaa
841 gctcatcacc aaagatctgg tgcaggaaaa atatctggag tacaagcagg tgcccagcag
901 tgatcccca cgctttcaat tctgtgggg tccgagagcc tatgctgaaa ccagcaagat
961 gaaagtctg gagtttttgg ccaaggtaaa tggtagcacc cctgtgcct tccaacca
1021 ttacgaaga gctttgaaag atgaagaga agccggagtc tgagccagag ttgtagccag
1081 gccttgact actgccatag ccaatcaatc tcccaaagcc aagtttacct gctgttctca
1141 ccccaatga ggtcttaggc agattcttta ctttgtaatt caaaaggcct gttaaccttt
1201 gttcttgta tgcattgaata acttggtgac ttttttttt tctctttttc aactagtgtt
1261 tcaacagggt tatttagatt cagaatgtaa atttacaaat gatatagatc accctgttat
1321 tgctgttttt cagggacagt agaaagtgt ttgttttttg agtgaacaa cttattaata
1381 aaaatcctta aatcactttt gtaatccagg acaagaaaat gtggcattag agtagaaata
1441 tctttgaaa tgtgaaagac ccatagtga aatatttggg atcagaagcc agagggtgaa
1501 aagtggtcaa ttcttggttt acttcattta atctttcttt tcataaagat acatacctgg
1561 attgttttat gttattcaag aatgtgtgag aaattaaacc atagttagtt aaaaaaaaaa
1621 aaaaaaaaa//

```

Secuencia del mRNA del gen MAGE-B2. En A) se observa un fragmento del producto secuenciado. B) █ Primers utilizados para la amplificación del gen █ secuencia amplificada del nucleótido 72 al 217 dando un producto de 145 pb, secuencia de la figura A

ANEXO 4

MAGE-C1



B)

NCBI Reference Sequence: [NM_005462.4](#)

```
1 gctttgccgg atgtgctttc cggcggcca tcttgggagt ctgaaggacc tgaggcattt
61 tgtgacgagg atcgtctcag gtcagcggag ggaggagact tatagaccta tccagtcttc
121 aaggtgctcc agaaagcagc agttgaagac ctgggtgtga gggacacata catcctaaaa
181 gcaccacagc agaggaggcc caggcagtgc caggagtcaa ggttcccaga agacaaacc
241 cctaggaaga caggcgacct gtgaggccct agagcaccac cttaagagaa gaagagctgt
301 aagccggcct ttgtcagagc catcatgggg gacaaggata tgccactgctc tgggatgccc
361 agtcttctcc agagttcctc tgagagtcct cagagttgtc ctgaggggga ggactcccag
421 tctctctctc agattcccca gatttctctc gagagcgcag acaccctgta tctctccag
481 agtcttcaga gtctgttctga ggggaggac tctcggatc ctctccagag acctcctgag
541 ggaagagact cccagtctcc tctccagatt cccagagtt ctctgaggg cgacgacacc
601 cagtctctc tccagaattc tcagagttct cctgagggga aggactcct gtctcctta
661 gagatttctc agagccctcc tgagggtgag gatgtccagt ctctctgca gaatcctgcg
721 agttcttct tctctctgc tttattgagt atttccaga gttcccctga gagtactcaa
781 agtcttttg aggttttcc ccagtctgtt ctccagattc ctgtgagcgc cgcctctcc
841 tccaatttag tgagtatttt ccagagttcc cctgagagta ctcaaagtc ttttgagggt
901 tttcccagc ctccactcca gattcctgtg agccgctcct tctctccac tttattgagt
961 atttccaga gttcccctga gagaactcag agtactttg aggttttgc ccagtctct
1021 ctccagattc ctgtgagccc ctctcctcc tccactttac tgagtcttt ccagagttt
1081 tctgagagaa ctacaggtac ttttgagggt tttgccagc ctctctcca gattcctgtg
1141 agcccctct tctctccac tttagtgtgt ctttccaga gttcccctga gagaactcag
1201 agtactttg aggttttcc ccagtctct ctccagattc ctgtgagctc ctctcctcc
1261 tccaatttat tgagtctttt ccagagttcc cctgagagaa ctacaggtac ttttgagggt
1321 tttcccagc ctctctcca gattcctatg acctcctcct tctctctac tttattgagt
1381 atttccaga gttctcctga gagtgtcaa agtactttg aggttttcc ccagtctct
1441 ctccagattc ctgggagccc ctctctctc tccactttac tgagtctttt ccagagttcc
1501 cctgagagaa ctacaggtac ttttgagggt tttcccagc ctctctcca gattcctatg
1561 acctcctct tctctctac tttattgagt atttacaga gttctctga gagtgtcaa
1621 agtgttttg aggttttcc ccagtctct ctccagattc ctgtgagctc ctcttctcc
1681 tacactttat tgagtctttt ccagagttcc cctgagagaa ctacaggtac ttttgagggt
```

```

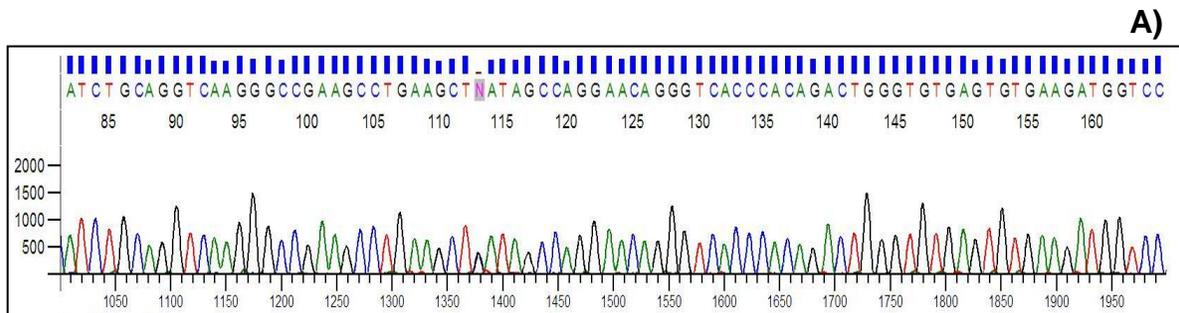
1741 tttccccagt ctctctcca gattcctgtg agctcctcct cctcctcctc cactttattg
1801 agtcttttcc agagttcccc tgagtgtact caaagtactt ttgaggggtt tccccagtct
1861 cctctccaga ttctcagag tcctcctgaa ggggagaata ccattctcc tctccagatt
1921 gttccaagtc ttctgagtg ggaggactcc ctgtctcctc actactttcc tcagagccct
1981 cctcaggggg aggactccct atctcctcac tactttcctc agagccctcc tcagggggag
2041 gactccctgt ctctcacta ctttcctcag agccctcagg gggaggactc cctgtctcct
2101 cactactttc ctcagagccc tcctcagggg gaggactcca tgtctcctct ctactttcct
2161 cagagtcctc ttcaggggga ggaattccag tcttctctcc agagccctgt gagcatctgc
2221 tcctcctcca ctccatccag tcttccccag agtttccctg agagttctca gagtcctcct
2281 gaggggctg tccagtctcc tctccatagt cctcagagcc ctctgaggg gatgcactcc
2341 caatctcctc tccagagtcc tgagagtgtc cctgaggggg aggattccct gtctcctctc
2401 caaatcctc agagtcctct tgagggagag gactccctgt cttctctcca ttttctcag
2461 agtcctcctg agtgggagga ctccctctct cctctccact ttcctcagtt tcctcctcag
2521 ggggaggact tccagtcttc tctccagagt cctgtgagta tctgtcctc ctccacttct
2581 ttgagtcttc cccagagttt ccctgagagt cctcagagtc ctctgaggg gcctgctcag
2641 tctcctctcc agagacctgt cagctccttc ttctcctaca ctttagcgag tcttctccaa
2701 agtcccatg agagtcctca gagtcctcct gaggggctg cccagtctcc tctccagagt
2761 cctgtgagct ctttccccct ctccacttca tcgagtcttt cccagagttc tcctgtgagc
2821 tccttccccct cctccacttc atcgagtctt tccaagagtt cccctgagag tcctctccag
2881 agtcctgtga tctccttctc ctctccact tcattgagcc cattcagtga agagtccagc
2941 agcccagtag atgaatatac aagtccctca gacaccttgc tagagagtga ttcttgaca
3001 gacagcgagt ctttgataga gagcgagccc ttgttctact atactctgga tgaaaagggtg
3061 gacgagttgg cgcggtttct tctcctcaaa tatcaagtga agcagcctat cacaaaggca
3121 gagatgctga cgaatgtcat cagcaggtac acgggctact ttctgtgat cttcaggaaa
3181 gccgtgagt tcatagagat actttttggc atttccctga gagaagtgga ccctgatgac
3241 tcctatgtct ttgtaaacac attagacctc acctctgagg ggtgtctgag tgatgagcag
3301 ggcattgtccc agaaccgcct cctgattctt attctgagta tcatcttcat aaagggcacc
3361 tatgcctctg aggaggtcat ctgggatgtg ctgagtggaa taggggtgcg tgctgggagg
3421 gagcactttg cttttgggga gccaggagg ctctcacta aagtttgggt gcaggaacat
3481 tacctagagt accgggagggt gcccaactct tctcctcctc gttacgaatt cctgtgggggt
3541 ccaagagctc attcagaagt cattaagagg aaagtagtag agtttttggc catgctaaag
3601 aataccgtcc ctattacctt tccatcctct tacaaggatg ctttgaaaga tgtggaagag
3661 agagcccagg ccataattga caccacagat gattcgactg ccacagaaag tgcaagctcc
3721 agtgtcatgt cccccagctt ctcttctgag tgaagtctag ggcagattct tcctctgag
3781 tttgaagggg gcagtcgagt ttctacgtgg tggagggcct ggttgaggct ggagagaaca
3841 cagtgtatt tgcatctctg ttccatatgg gtagttaggg ggtttacctg ttttactttt
3901 gggatatttt caaatgcttt tctattaat aacaggttta aatagcttca gaatcctagt
3961 ttatgcacat gagtcgcaca tgtattgctg tttttctggt ttaagagtaa cagtttgata
4021 ttttgtaaaa acaaaaacac acccaaacac accacattgg gaaaaccttc tgcctcattt
4081 tgtgatgtgt cacagggttaa tgtggtgtta ctgtaggaat tttcttgaaa ctgtgaagga
4141 actctgcagt taaatagtgg aataaagtaa aggattgtta atgtttgcatt tcctcaggt
4201 cctttagtct gttgttcttg aaaactaaag atacatacct ggtttgcttg gcttacgtaa
4261 gaaagtagaa gaaagtaaac tgtaataaat aaaagtgtca gtgactcatt tatttgatga
4321 aaaaaaaaaa aaaaaaa//

```

Secuencia del mRNA del gen MAGE-C1. En A) se observa un fragmento del producto secuenciado. B) Primers utilizados para la amplificación del gen secuencia amplificada del nucleótido 139 al 351 dando como resultado un producto de 212 pb, secuencia de la figura A)

ANEXO 5

GAGE-2



B)

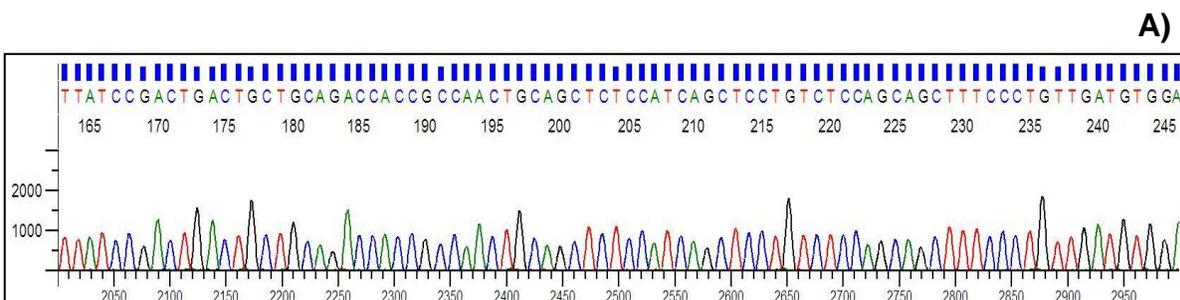
NCBI Reference Sequence: NM_001098411.3

```
1 acgccagga gctgtgaggc agtgetgtgt ggttcctgcc gtcgggactc tttttcctct
61 attgagattc atctgtgtga aatatgagtt ggcgaggaag atcgacctat cggcctagac
121 caagacgcta cgtagagcct cctgaaatga ttgggcc tat gggcccgag cagtt cagtg
181 atgaagtgga accagcaaca cctgaagaag ggaaccagc aactcaacgt caggatcctg
241 cagctgctca ggagggagag gatgagggag catctgcagg tcaagggccg aagcctgaag
301 ctcatagcca ggaacagggc caccacaga ctgggtgtga gtgtgaagat ggtcctgatg
361 ggcagg agat ggaccgcca aatccagagg aggtgaaaac gcctgaagaa ggtgaaaagc
421 aatcacagtg taaaagaag gcacgttgaa atgatgcagg ctgctcctat gttggaaatt
481 tgttcattaa aattctcca ataaagctt//
```

Secuencia del mRNA del gen GAGE-2. En A) se observa un fragmento del producto secuenciado. B) █ Primers utilizados para la amplificación del gen █ secuencia amplificada del nucleótido 213 al 367 dando como resultado un producto de 153 pb, █ secuencia de la figura A)

ANEXO 6

LAGE-1



B)

NCBI Reference Sequence: NM_172377.3

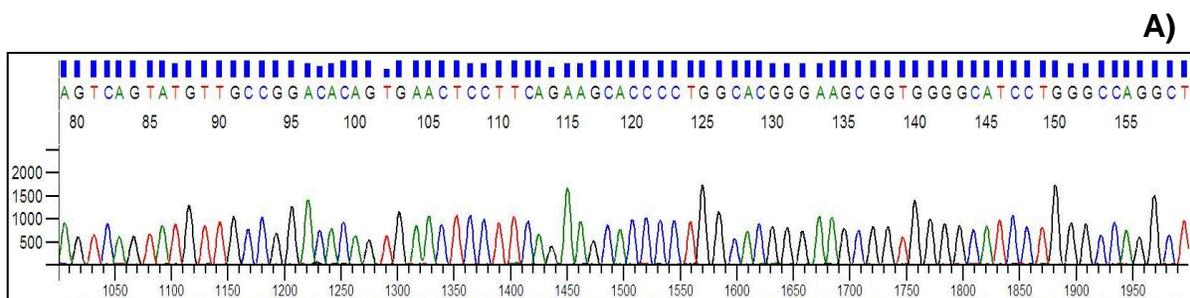
```

1  tctgcctccg  catcctcgtg  ggccctgacc  ttctctctga  gagccgggca  gaggctccgg
61  agccatgcag  gccgaaggcc  agggcacagg  gggttcgacg  ggcgatgctg  atggcccagg
121 aggccctggc  attcctgatg  gcccaggggg  caatgctggc  ggcccaggag  aggcgggtgc
181 cacggggcgg  agaggtcccc  ggggcgcagg  ggcagcaagg  gcctcggggc  cgagaggagg
241 cgcccccggg  ggtccgcatg  gcggtgccgc  ttctg■gcgcag gatggaagg■t gcc■ctg■cg■g
301 ggccaggagg  cgggacagcc  gcttgcctca  gttgcacatc  acgatgcctt  tctcgtcgcc
361 catggaagcg  gagctgggtcc  gcaggatcct  gtcccgggat  gccgcacctc  tcccccgacc
421 aggggcgggt  ctgaaggact  tcaccgtgtc  cggcaaccta  ctgtctatcc  gactgactgc
481 tgcagaccac  cgccaactgc  agctctccat  cagctcctgt  ctccagcagc  tttcc■gt■tt
541 gatgtggatc  acgcagtgct  ttctgcccgt  gtttttggct  caggctccct  cagggcagag
601 gcgc■taagcc  cagcctggcg  ccccttcta  ggtcatgcct  cctcccctag  ggaatggctc
661 cagcacgagt  ggccagttca  ttgtgggggc  ctgattgttt  gtcgctggag  gaggacggct
721 tacatgtttg  tttctgtaga  aaataaagct  gagctacgat  tccgaaaaaa  aaa
  
```

Secuencia del mRNA del gen LAGE-1. En A) se observa un fragmento del producto secuenciado. B) ■ Primers utilizados para la amplificación del gen ■ secuencia amplificada del nucleótido 329 al 604 dando como resultado un producto de 275 pb, ■ secuencia de la figura A)

ANEXO 7

NY-ESO-1



B)

NCBI Reference Sequence: NM_001327.2

```

1 atcctcgtgg gccctgacct tctctctgag agccgggcag aggctccgga gccatgcagg
61 ccgaaggccg gggcacaggg ggttcgacgg gcgatgctga tggcccagga ggccctggca
121 ttctgatgg cccagggggc aatgctggcg gcccaggaga ggcgggtgcc acgggcggca
181 gaggtccccg gggcgcaggg gcagcaaggg cctcggggcc gggaggaggc gccccgcggg
241 gtccgcatgg cggcgcggct tcagggtga atggatgctg cagatgcggg gccagggggc
301 cggagagccg cctgcttgag ttctacctcg ccatgccttt cgcgacacc atggaagcag
361 agctggcccc caggagcctg gcccaggatg cccaccgct tcccgtgcc ggggtgcttc
421 tgaaggagtt cactgtgtcc ggcaacatac tgactatccg actgactgct gcagaccacc
481 gccaaactgca gctctccatc agctcctgtc tccagcagct ttccctgttg atgtggatca
541 cgcagtgctt tctgcccgtg ttttggctc agcctccctc agggcagagg cgctaagccc
601 agcctggcgc cccttctag gtcatgcctc ctcccctagg gaatggtccc agcacgagtg
661 gccagttcat tgtggggggc tgattgtttg tcgctggagg aggacggctt acatgtttgt
721 ttctgtagaa aataaaactg agctacgaaa aa//

```

Secuencia del mRNA del gen NY-ESO-1. En A) se observa un fragmento del producto secuenciado. B) Primers utilizados para la amplificación del gen secuencia amplificada del nucleótido 313 al 502 dando como resultado un producto de 189 pb, secuencia de la figura A)

ANEXO 8

REACTIVOS

PBS 1X

NaCl	0,3 M
KCl	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	0,2 mM
Na ₂ HPO ₄	0,01 M
pH	7,3
Volumen final	1000 mL

MEDIO RPMI 1640

RPMI Medium 1640	10,4 gr
NaHCO ₃	2,0 gr
Estreptomicina	100 µg/mL
Penicilia	100U/mL
SFB	10%
Volumen final	1000 mL

TAE 10X

FICOLL

BUFFER DE CORRIDA

BUFFER DE TRANSFERENCIA

BUFFER DE TEJIDOS

RGB

SGB

PBS-LECHE

EDTA 0,5 M