



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento Medicina y Dermatología

Tesis Doctoral

IDENTIFICACIÓN DE UNA FIRMA DE EXPRESIÓN GÉNICA
MEDIANTE EL SISTEMA DE ANÁLISIS NCOUNTER COMO
MARCADOR PRONÓSTICO DE RECAÍDA EN PACIENTES CON
TUMORES DE CÉLULAS GERMINALES NO SEMINOMA ESTADIO I

Laura Gálvez Carvajal


Málaga, 2020





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Laura Gálvez Carvajal

 <http://orcid.org/0000-0002-7952-598X>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es





DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña LAURA GÁLVEZ CARVAJAL

Estudiante del programa de doctorado BIOMEDICINA INVESTIGACION TRASLACIONAL Y NUEVAS TECNOLOGÍAS EN SALUD de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: "IDENTIFICACIÓN DE UNA FIRMA DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE EL SISTEMA DE ANÁLISIS N-COUNTER COMO MARCADOR PRONÓSTICO DE RECAÍDA EN PACIENTES CON TUMORES DE CÉLULAS GERMINALES NO SEMINOMA ESTADIO I"

Realizada bajo la tutorización de EMILIO ALBA CONEJO y dirección de EMILIO ALBA CONEJO Y ALFONSO SÁNCHEZ MUÑOZ (si tuviera varios directores deberá hacer constar el nombre de todos)

DECLARO QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante a la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 07 de ENERO de 2020

Fdo.: LAURA GÁLVEZ CARVAJAL



EFQM AENOR



Edificio Pabellón de Gobierno. Campus El Ejido.

29071

Tel.: 952 13 10 28 / 952 13 14 61 / 952 13 71 10

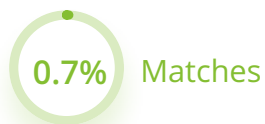
E-mail: doctorado@uma.es



Revisión por Unicheck

Cargado: 02/12/2020 | Verificado: 02/12/2020

● Matches ● Cita ● Referencia ● Parte sustituida



Matches

Web fuentes

153

1	www.laproteina.es https://www.laproteina.es/tienda/3956-pure-bcaa-r811-300-gr.html	0.09%
2	documentop.com https://documentop.com/investigar-con-y-para-la-sociedad-uca_59fa65801723dd386241e125.html	0.09%
3	mafiadoc.com https://mafiadoc.com/utilizacion-de-material-didactico-con-recursos-de-ajedrez-para-la-_599c8d241723dd0f406ee02b.html	0.07%
4	accessmedicina.mhmedical.com https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?sectionid=114914497	0.04%
5	panelvida.blogspot.com https://panelvida.blogspot.com/2011_12_14_archive.html	0.04%
6	www.slideshare.net https://www.slideshare.net/ArturoLennon/oncologa23	0.04%
7	www.psicoeureka.com.py https://www.psicoeureka.com.py/sites/default/files/publicaciones/eureka-13-2_0.pdf	0.04%
8	www.fundacioncsz.org http://www.fundacioncsz.org/ArchivosPublicaciones/183.pdf	0.04%
9	helvia.uco.es http://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/11794/2014000000920.pdf.txt?sequence=3	0.03%
10	www.aecc.es https://www.aecc.es/sites/default/files/migration/actualidad/publicaciones/documentos/glosario.pdf	0.03%



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Dr. Emilio Alba Conejo

Catedrático de Medicina de la Universidad de Málaga.

Director del Centro de Investigaciones Médico-Sanitarias (CIMES) de la Universidad de Málaga.

Dr. Alfonso Sánchez Muñoz

Profesor del Departamento Medicina y Dermatología de la Universidad de Málaga

AUTORIZAN a Dña. Laura Gálvez Carvajal a la lectura y defensa de esta memoria de Tesis Doctoral titulada: “Identificación de una firma de expresión génica mediante el sistema de análisis nCounter como marcador pronóstico de recaída en pacientes con tumores de células germinales no seminoma estadio I”.

Asimismo, los directores de esta Tesis Doctoral certifican que las publicaciones que la avalan no han sido utilizadas en Tesis anteriores y han sido generadas, parcial o totalmente, a partir de resultados y metodología desarrolladas durante la realización de la Tesis Doctoral de Dña. Laura Gálvez Carvajal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente documento en Málaga a 10 de enero de 2020.

Dr. Emilio Alba Conejo

Dr. Alfonso Sánchez Muñoz



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi tutor y codirector de tesis, Emilio Alba, la gran oportunidad que me brindó al confiar en mí para llevar a cabo este bonito proyecto de investigación.

A mis dos codirectores de tesis, Emilio Alba y Alfonso Sánchez, me gustaría expresar mi más sincera gratitud por todo el apoyo aportado, resolución de cualquier inconveniente surgido durante los últimos años, así como, por todos los comentarios y recomendaciones constructivas que no sólo me construyeron como investigadora sino que también contribuyeron a mi crecimiento personal.

Mención importante en los agradecimientos, merecen todos los pacientes y sus familiares que dieron su consentimiento para formar parte del proyecto de investigación, donando las muestras tumorales para este, así como otros proyectos de investigación.

Esta Tesis Doctoral no hubiese sido posible sin el equipo de investigación del Centro de Investigaciones Médico Sanitarias (CIMES) de Málaga, al que agradezco profundamente todo el trabajo realizado y amabilidad con el que resolvieron todas mis dudas sobre metodología de trabajo y otras múltiples consultas, con especial atención a Martina Álvarez, Ángela Santonja, Alicia Garrido, M. Rosario Chica y Rocío Lavado.

Tampoco hubiese sido posible el adecuado análisis de los resultados obtenidos sin la gran colaboración de los bioestadísticos / bioinformáticos Julio Montes, Aurelio Moya y a Marco del Rey y Emilio Alba Linero del equipo Foqum. Gracias por introducirme un poco en el complejo mundo del análisis bioinformático, con todas aquellas explicaciones que me permitieron comprender todo el estudio estadístico y bioinformático realizado.

Y por último, aunque no menos importante, expresar mi más profundo agradecimiento a mi familia. Sin el constante apoyo y facilidades para poder trabajar fuera de mi horario laboral, no hubiese sido posible realizar este trabajo.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

Actualmente para el 15-20% de los pacientes con tumores de células germinales (TCG) metastásicos las opciones curativas son limitadas, estando en investigación la respuesta a terapias dirigidas (1). Como estrategias postorquiectomía en los pacientes con tumores de células germinales no seminoma (TCGNS) estadio I son válidas la quimioterapia adyuvante, la linfadenectomía retroperitoneal y la vigilancia activa. La infiltración linfovascular es el factor pronóstico más aceptado y asociado al riesgo de recaída en TCGNS (aumentándolo hasta en un 50%) (2–5). El tratamiento quimioterápico adyuvante en estos pacientes con estadio I basado en la presencia de infiltración linfovascular supone el sobretratamiento del restante 50%, con la consiguiente toxicidad aguda y a largo plazo, por lo que se requieren marcadores más fidedignos de recaída. En los tumores de células germinales testiculares (TCGT) los estudios de expresión génica se encuentran en etapas muy iniciales de investigación.

METODOLOGÍA Y OBJETIVO

Previo al presente estudio se realizó un trabajo de revisión bibliográfica sobre terapias dianas en pacientes con TCG. Las publicaciones encontradas presentaban una causística reducida y heterogénea, sobre todo, centradas en estadios avanzados, sin demostrar una efectividad razonable con los tratamientos diana estudiados (6). Este hecho puso de manifiesto la necesidad de centrar el presente trabajo en estadios iniciales, focalizando la investigación en identificar aquellos pacientes con mayor riesgo de recaída, los cuales serían candidatos a un tratamiento adyuvante. Se ha realizado un estudio de casos y controles de carácter retrospectivo, donde se han incluido 54 pacientes con tumores de células germinales no seminoma (TCGNS)

estadio I, pertenecientes a varios centros de España, que no habían recibido quimioterapia adyuvante tras la orquiectomía. El objetivo del estudio fue encontrar un conjunto de genes cuyas variaciones en la expresión estuviese relacionado con el riesgo de recaída. De los pacientes incluidos, el 48% (n=26) lo constituían pacientes con recaída y el restante 52% (n=28) pacientes sin recaída. Se han analizado retrospectivamente las variaciones en los perfiles de expresión de grupos de genes realizados con las trece rutas canónicas del cáncer, utilizando el panel PanCancer con el sistema de análisis nCounter™ de Nanostring (7). Los resultados obtenidos fueron evaluados mediante clusterización y análisis estadístico con herramientas bioinformáticas adecuadas para identificar una firma génica cuya variación en la expresión estuviese relacionada con la recaída.

RESULTADOS

Se obtuvo un modelo de nueve genes resultante del análisis bioinformático (MPL, Col24a1, NR4A1, FOSL1, CREB5, FANCB, LAMB4, ZBTB16, CALML3) con capacidad de predecir el riesgo de recaída en los pacientes con TCGNS estadio I sin tratamiento adyuvante con AUC de 0.8. De esta firma de nueve genes, cuatro están relacionados con la vía de señalización PI3K (Col24a1, NR4A1, CREB5, LAMB4). Respecto a la expresión diferencial individual de cada gen, se detectaron varios genes con expresión diferencial próxima a la significación estadística entre ambos grupos de pacientes (destacando AKT3, BAIAP3, ZBTB16, RASGRP1, KIT, IL13RA2, ITGA3, ACVR1B, TGFB3, HHEX, CCNA1, NR4A1, PLA2G10, FGF7 y GADD45A), así como un modelo de red de coexpresión con una correlación con la recaída de 0.39 (p=0.003) constituido por 31 genes de los que cinco tenían una expresión diferencial próxima a la significación estadística (IL13RA2, CCNA1, PLA2G10, GADD45A, RRAS2). Del modelo de nueve genes obtenido con el análisis bioinformático, destaca FOSL1 con una correlación con la recaída de 0.43 y, NR4A1 y ZBTB16 con una expresión diferencial próxima a la significación estadística (0.075 en ambos casos).

CONCLUSIONES MÁS RELEVANTES

1). En TCGNS estadio I tratados con orquiectomía sin tratamiento adyuvante se ha identificado una firma génica de nueve genes (MPL, Col24a1, NR4A1, FOSL1, CREB5, FANCB, LAMB4, ZBTB16, CALML3) que permite seleccionar aquellos pacientes con alta probabilidad de recaída.

2). La posible aplicabilidad clínica de esta firma génica requiere una validación en una cohorte igual de homogénea pero con un mayor número de pacientes.

3). Hasta la fecha no existe una terapia diana con validez demostrada en pacientes con TCG.



LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
AFP	α -fetoproteína.
AP-1	Activator protein 1.
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNi	Ácido ribonucleico de interferencia.
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero.
AUC	Area under the curve.
BEP	Bleomicina, etopósido, cisplatino.
BGP	Bleomicina, gemcitabina, platino.
β HCG	β -gonadotropina coriónica humana.
BOMP-EPI	Bleomicina, vincristina, metotrexato, cisplatino – etopósido, ifosfamida, cisplatino.
BTK	Bruton's tyrosine kinase.
CAMKII	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase II.
CCND2	Ciclina D2.
CDDP	Cisplatino.
CDK	Quinasas dependientes de ciclinas.
CIMES	Centro de Investigaciones Médico Sanitarias.
CPCNP	Carcinoma de pulmón de células no pequeñas.
EGFR	Epidermal growth factor receptor.
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica.
EMT	Epithelial-mesenchymal transition.

EP	Etopósido, cisplatino.
ERK	Extracelular-signal-regulated kinases.
GADD45A	Growth arrest and DNA damage-induced 45 alpha
GOP	Gemcitabina, oxaliplatino y paclitaxel.
HDAC	Histonas desacetilasas.
HDCT-ASCT	High-dose chemotherapy - autologous haemopoetic stem cell transplantation.
HGF	Hepatocyte grow factor.
HIF	Hypoxia inducible factor.
HR	Hazard ratio.
IBIMA	Instituto de Investigación Biomédica de Málaga.
ICCCGC	International Germ Cell Cancer Collaborative Group.
IFN	Interferón
IHQ	Inmunohistoquímica.
ITGCNU	Neoplasias de células germinales in situ.
JNK	c-Jun N-terminal kinase.
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.
LDRP	Linfadenectomía retroperitoneal.
MCE	Muerto con enfermedad.
MDM2	Murine doble minute 2.
MMP2	Metalloproteinase 2.
MMP9	Metalloproteinase 9.
LDCGB	Linfoma difuso de células grandes B.
MSE	Muerto sin enfermedad.

mTOR	Mammalian Target of Rapamycin.
NGIS	Neoplasia de células germinales in situ.
NK	Células natural killer.
OR	Odds ratio.
PARP	Poly ADP-ribose polymerase.
PCR	Polymerase Chain Reaction.
PD-1	Programmed Death 1.
PDGF	Platelet derived growth factor.
PD-L1	Programmed Death-ligand 1.
PET	Positron Emission Tomography.
PGC	Células germinales primordiales.
PI3K	Phosphatidyl-inositol-3-kinase.
PLZF	Promyelocytic leukemia zinc finger.
pRB	Proteína del retinoblastoma.
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa.
RC	Respuesta completa.
RP	Respuesta parcial.
ROS	Reactive oxygen species.
RR	Riesgo relativo.
S6K	Ribosomal protein S6 kinase.
SCF-1	Colony stimulating factor 1.
SG	Supervivencia global.
SIRT1	Silent mating type information regulation 2 homolog 1.



SLP	Supervivencia libre de progresión.
SNC	Sistema nervioso central.
SWENOTECA	Swedish and Norwegian Testicular Cancer Project.
TC	Tomografía computerizada.
TCG	Tumor de células germinales.
TCGA	The Cancer Genome Atlas.
TCGNS	Tumor de células germinales no seminoma.
TCGS	Tumor de células germinales seminoma.
TCGT	Tumor de células germinales testicular.
TCM	Trasplante de células madres.
TCR	Receptor de células T.
TGF- β	Transforming growth factor β .
TIP	Paclitaxel, ifosfamida, cisplatino.
TPO	Trombopoyetina.
UMA	Universidad de Málaga.
VCE	Vivo con enfermedad.
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor.
VSE	Vivo sin enfermedad.

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINAS
Resumen	I - III
Lista de abreviaturas	V - VIII
Lista de figuras	XIII - XV
Lista de tablas	XVII
I.INTRODUCCIÓN	3 - 53
1. FORMACIÓN DE LOS TCGT	5 - 9
2. CLASIFICACIÓN DE LOS TCGT	9 - 11
3. PRINCIPALES ABERRACIONES GENÉTICAS QUE FAVORECEN LA FORMACIÓN DE LOS TCGT	12 - 13
4. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA PATOGÉNESIS DE LOS TCGT	13 - 22
5. FACTORES DE RIESGO DE LOS TCGT	22 - 23
6. TCGT EN ESTADIOS INICIALES	23 - 35
a. TGCT en estadios iniciales de BAJO riesgo. Opciones tras orquiectomía	27 - 30
I. Opción 1: Vigilancia activa	27 - 29
II. Opción 2: Quimioterapia adyuvante	29 - 30
III. Opción 3: Linfadenectomía retroperitoneal	30
b. TCGT en estadios iniciales de ALTO riesgo. Opciones tras orquiectomía	31 - 35
I. Opción 1: Vigilancia activa	31 - 32
II. Opción 2: Quimioterapia adyuvante	32 - 35
III. Opción 3: Linfadenectomía retroperitoneal	35
7. TCG EN ESTADIOS AVANZADOS	36 - 37
8. FACTORES BIOMOLECULARES PRONÓSTICOS / PREDICTIVOS DE RESPUESTA	37 - 53
II.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	57

III.MATERIAL Y MÉTODOS 61 - 75

**REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA “TERAPIAS DIANA EN PACIENTES
CON TUMORES GERMINALES” 61**

**ESTUDIO DE EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL EN
PACIENTES CON TCGNS ESTADIO I 61 - 75**

- 1. POBLACIÓN DE ESTUDIO 61 - 64**
 - a. Consentimiento informado 64
- 2. MÉTODOS 64 - 75**
 - a. Obtención y procesamiento de las muestras 64 - 66
 - b. Estudio de expresión génica 66 - 67
 - c. Análisis de los datos 68 - 75
 - I. Estudio descriptivo 68 - 70
 - II. Estudio de supervivencia 70
 - III. Redes de coexpresión 70 - 73
 - IV. Análisis bioinformático 74 - 75
- 3. LIMITACIONES DEL ESTUDIO 75**

IV.RESULTADOS 79 - 116

**RESULTADOS DEL ESTUDIO DE EXPRESIÓN GÉNICA
DIFERENCIAL EN PACIENTES CON TCGNS ESTADIO I 79 - 103**

- 1. CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS 79 - 85**
- 2. ESTUDIO DE SUPERVIVENCIA 85 – 87**
- 3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL
DE LOS 730 GENES..... 87 - 89**
- 4. ANÁLISIS DE REDES DE COEXPRESIÓN..... 89 - 93**
- 5. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO..... 93 - 97**
- 6. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL DEL
MODELO DE NUEVE GENES..... 97 - 103**

**RESULTADOS DE LA REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA “TERAPIAS
DIANA EN PACIENTES CON TUMORES GERMINALES” 104 - 116**

- 1. FAMILIA EGFR 104**

2. PI3K/AKT/mTOR	104 - 105
3. cKIT/STEM CELL FACTOR	106 - 107
4. AGENTES ANTIANGIOGÉNICOS	107 - 109
5. INHIBIDORES MÚLTIPLES TIROSÍN QUINASA	109 - 111
6. ANTI-PD1	111 - 113
7. INHIBIDORES DE CICLINAS	113 - 114
8. INHIBIDORES PARP	114 - 115
9. MET/HGF	115
10. CD30	115 - 116
V.DISCUSIÓN	119 - 157
1. Revisión en la literatura de estudios de expresión génica en TCG.....	121 - 124
2. Discusión de resultados obtenidos del estudio de expresión génica en TCGNS.....	124 - 125
7. Discusión de resultados del estudio de redes de coexpresión...	125 - 136
8. Discusión de resultados del estudio bioinformático.....	136 - 155
9. Curiosidades obtenidas.....	155 - 156
10. Limitaciones del estudio.....	156
11. Directrices futuras.....	157
VI.CONCLUSIONES	161 - 162
VII.BIBLIOGRAFÍA	165 - 193



LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tasa de incidencia y mortalidad del cáncer testicular.....	4
Figura 2: Espermatogénesis normal y desarrollo de los tumores de células germinales testiculares.....	5
Figura 3: Patogénesis en la formación de las NCGIS.....	6
Figura 4: Etiopatogenia de los TCGT.....	8
Figura 5: Desarrollo embrionario normal y origen del linaje de las células germinales.....	9
Figura 6: Composición histológica evaluada por hematoxilina-eosina de los tumores de células germinales testiculares.....	10
Figura 7: Representación de los distintos tipos de TCGT.....	11
Figura 8: Representación del proceso fisiológico del desarrollo de células germinales masculinas.....	11
Figura 9: Representación de la vía p53 normal y alterada.....	15
Figura 10: Vía de señalización del receptor tirosín quinasa en los TCGT...	17
Figura 11: Principales alteraciones que ocurren en los TCGT tipo II.....	18
Figura 12: Vías de señalización incluidas en el panel PanCancer de nanostring.....	40
Figura 13: Representación la vía de señalización TGF- β	47
Figura 14: Vía de activación de la vía MAPK/ERK.....	49
Figura 15: Vías reguladas por PI3K.....	50
Figura 16: Vías que regulan la señalización PI3K.....	51
Figura 17: Vía de transducción de señales RAS-ERK.....	52
Figura 18: Representación del ciclo celular.....	53

Figura 19: Representación de los pasos del procesamiento de las muestras.....	65
Figura 20: Visión general del análisis de expresión génica con nCounter...67	
Figura 21: Descripción general del análisis de redes de coexpresión génica, con un ejemplo de tumores del SNC y las redes de coexpresión relacionadas con la supervivencia.....	73
Figura 22: Subtipos histológicos constituyentes de los tumores mixtos.....	82
Figura 23: Subtipos histológicos constituyentes de los pacientes con TCGT puro con recaída.....	82
Figura 24: Subtipos histológicos constituyentes de los pacientes con TCGT puro sin recaída.....	83
Figura 25: Curva de Kaplan Meier para SLP en pacientes con recaída y sin recaída.....	86
Figura 26: Curva de Kaplan Meier de SG en pacientes con recaída y sin recaída.....	87
Figura 27: Gráfico tipo volcán. Representa la expresión diferencial de los genes tras el análisis de las 54 muestras tumorales de pacientes con TCGNS, incluyendo tanto a pacientes con recaída como sin recaída.....	88
Figura 28: Escala de correlación y significación de los distintas redes de coexpresión génica encontrados en los 730 genes analizados en ambos grupos (recaída y no recaída).....	90
Figura 29: Representación de la correlación individual de cada gen con la recaída, así como con el grado de asemejación y contribución de cada gen con el modelo.....	93
Figura 30: Representación del número de genes seleccionados con cada uno de los criterios en función del tamaño umbral empleado.....	95

Figura 31: Mapa de calor de las 54 muestras con TCGNS con los nueve genes del modelo obtenido con el análisis bioinformático.....101

Figura 32: Mapa de calor de las 28 muestras de pacientes con TCGNS sin recaída con los nueve genes del modelo obtenido con el análisis bioinformático.....102

Figura 33: Mapa de calor de las 26 muestras con TCGNS con recaída con los nueve genes del modelo obtenido con el análisis bioinformático.....103



LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Características clinicopatológicas de los pacientes.....	81
Tabla 2: Pacientes con recaída. Descripción del tiempo a la recaída, lugar y tratamiento a la recaída, tratamientos posteriores y estado en la última visita.....	85
Tabla 3: Significación estadística de los genes más representativos del análisis de expresión diferencial.....	89
Tabla 4: Características de los genes que conforman el modelo de coexpresión ME.purple.....	91 - 92
Tabla 5: Resultados de AUC con los entrenamientos iniciales en cada modelo del análisis bioinformático.....	94
Tabla 6: Simulaciones en el análisis bioinformático con un número creciente de genes seleccionados y resultados de AUC.....	96
Tabla 7: Expresión génica en los pacientes SIN recaída.....	98
Tabla 8: Expresión génica en los pacientes CON recaída.....	99
Tabla 9: Media y rango de expresión de cada uno de los nueve genes del modelo obtenido con el análisis bioinformático.....	99
Tabla 10: Análisis comparativo de los nueve genes del modelo bioinformático entre los dos grupos de pacientes usando la prueba estadística t student.....	100



I.INTRODUCCIÓN





Los tumores de células germinales testiculares (TCGT) representan el tumor sólido más frecuente en varones adolescentes y adultos jóvenes (de 15 a 35 años), donde llega a suponer el 30% de las neoplasias del hombre. Además los TCGT constituyen el 95% de los tumores del testículo y el 1% del cáncer en el varón (8). Estos tumores se forman a partir de la transformación de las células espermatogónicas, mostrando propiedades pluripotenciales para diferenciarse en diferentes tipos celulares embrionarios y extraembrionarios. Los TCGT se clasifican en función de su diferenciación en dos grandes grupos: seminoma (TCGS) (típico, indiferenciado, espermatocítico) que constituye el 40-50% de los casos y no seminoma (TCGNS) (carcinoma embrionario, teratoma y teratocarcinoma, tumor de yolk sac, coriocarcinoma y tumores mixtos) que constituye el restante 50-60% de los casos (9–11).

La incidencia del cáncer testicular está aumentando de forma global, fundamentalmente en los países desarrollados, sin conocer las causas exactas (12–15). La incidencia del cáncer testicular abarca menos de un individuo afecto por cada 100,000 hombres en gran parte de Asia y África a 9.9 individuos afectados por cada 100,000 varones en Noruega, 9.4 individuos afectados/100,000 varones en Dinamarca y 9.2 afectados/100,000 varones en Suiza (16). En Estados Unidos el cáncer testicular es más frecuente en varones de raza blanca (6.9 afectados/100,000 varones) respecto a los americanos africanos (1.2 afectados/100,000 varones) (17).

A pesar de la mayor incidencia del cáncer testicular en Europa, América del Norte, Australia y Nueva Zelanda, estas áreas sólo constituyen una quinta parte de las muertes causadas por el cáncer testicular. De hecho, el ratio incidencia-mortalidad en el norte de Europa es 26:1, comparado con 2:1 del suroeste de Asia, Asia centrosur y África (16), poniendo de manifiesto la importancia de los tratamientos en la supervivencia (*figura 1*).

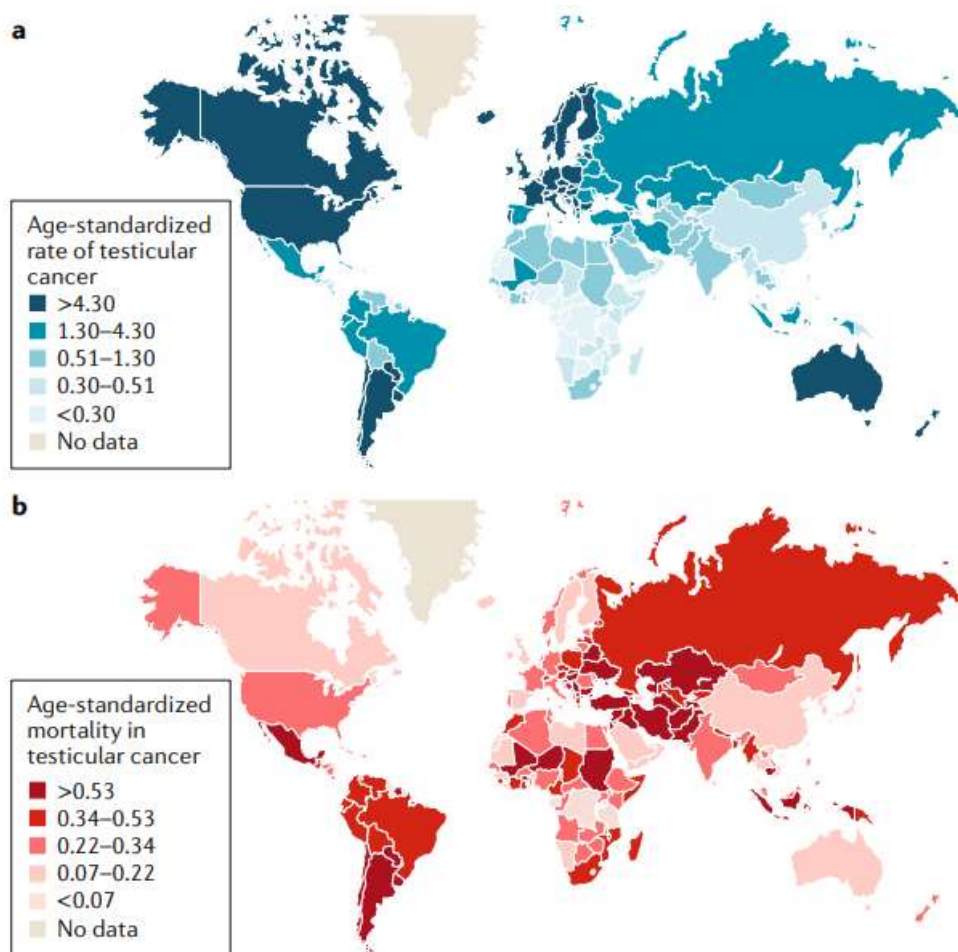


Figura 1. Tasa de incidencia y mortalidad del cáncer testicular (18).

Los TCGT constituyen uno de los tumores malignos con más alta tasa de curación, fundamentalmente por su alta sensibilidad a la quimioterapia basada en platino. Sólo un 3 – 5% de los pacientes con TCGT morirán por el tumor (19–21). La supervivencia a cinco años del cáncer testicular metastásico ha crecido desde una tasa inferior al 30% en los años de 1950 al 95% aproximadamente a día de hoy, debido al tratamiento multidisciplinar y la alta sensibilidad a la terapia sistémica (22–24).

1. FORMACIÓN DE LOS TCGT

Los TCGT se forman a partir de la transformación maligna de las células germinales testiculares, facilitado por un microambiente testicular alterado (con alteraciones en la señalización) y, a menudo asociado a una disgenesia gonadal (figura 2) (25–30). El origen de los TCGT tiene lugar durante el desarrollo embrionario a partir, fundamentalmente, de las células germinales primordiales, las cuales expresan antígenos específicos relacionados con sus principales características, como la pluripotencia (SOX2, OCT3/4, NANOG), supervivencia (cKIT) y migración (BLIMP1). Estas células germinales primordiales y, en menor medida, los gonocitos fetales, son el origen de las células que conforman las neoplasias de células germinales in situ (NCGIS), origen de los TCGT (31–33). Las alteraciones citogenéticas de las células de las NCGIS son similares en TCGS y TCGNS, sugiriendo un origen común (34).

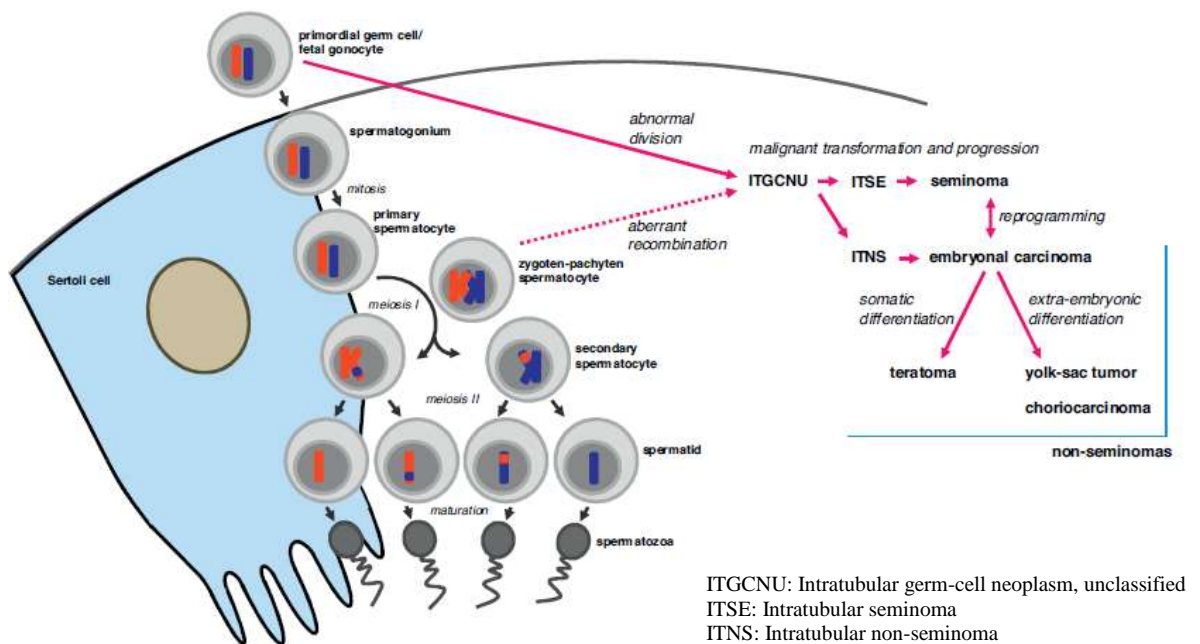


Figura 2. Espermatogénesis normal a la izquierda y desarrollo de los tumores de células germinales testiculares a la derecha. Se cree que las células madres de los TCGT están representadas por las células que conforman las neoplasias de células germinales in situ (ITGCNU), las cuales proceden principalmente de las células germinales primordiales (PGC), o bien, de los gonocitos fetales, provocando un bloqueo en la diferenciación y una proliferación constitutiva, lo cual conlleva una alteración en la mitosis/meiosis normal. Entre los seminomas y carcinomas embrionarios puede existir una reprogramación, cambio del linaje celular, por ello a menudo los TCGNS contienen regiones de seminoma (35).

Durante la maduración fisiológica de las células germinales primordiales o gonocitos a las pre-espermatogonias o espermatogonias, OCT4 y el receptor de KIT se encuentran infraexpresados y AKT se mantiene en un estado inactivo durante los primeros años postnatales. Esto puede dar lugar a una supervivencia aberrante de las células germinales embrionarias, con características pluripotentes, en los testículos de 6 meses a 1 año, con la posibilidad de formación de las NCGIS. En las células preesmartogónicas se induce la expresión de TSPY (expression of testis-specific Y-encoded protein 1) y se establece el patrón de imprinting genómico paterno. Luego, OCT4-KIT y TSPY no se co-expresan durante el desarrollo normal. Por otro lado, el estrés durante el desarrollo embrionario facilitado por aberraciones genéticas y factores ambientales, puede llevar a la sobreexpresión de KITLG (que codifica el ligando de KIT), provocando la activación de OCT4, del promotor de AKT y TSPY, conllevando todo esto a un retraso o bloqueo de la maduración, con una supervivencia totipotente capaz de formar las NCGIS (figura 3) (18).

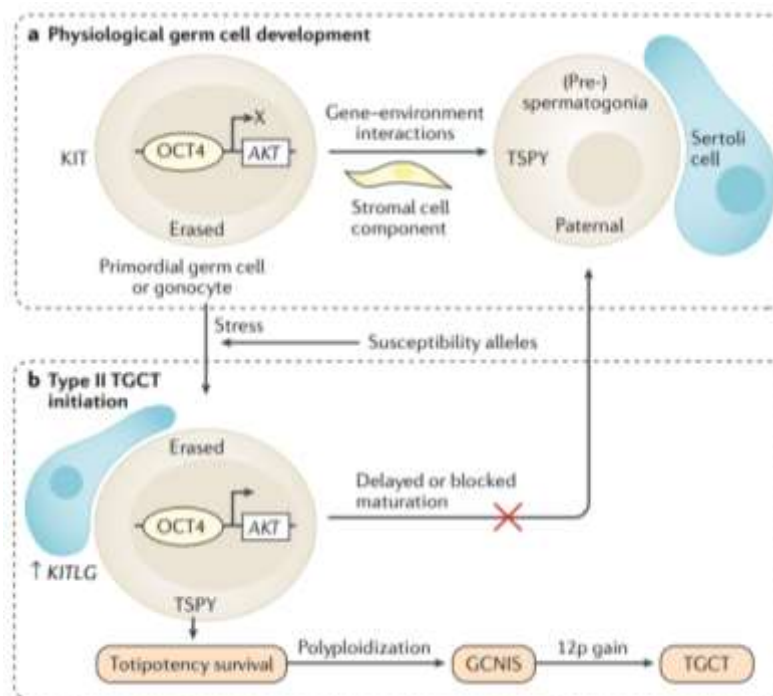


Figura 3. Patogénesis en la formación de las NCGIS (18).

Los TCGT expresan antígenos característicos que ayudan a identificarlos y diferenciarlos de otros tumores, destacando SOX2, SOX17, NANOG, OCT3/4, HMGA1, HMGA2, PATZ1, cKIT, Aurora-B, PLAP (36,37). Como se ha indicado, la tumorigénesis se inicia con la conformación de las NCGIS durante el desarrollo embrionario, posteriormente existe un periodo de inactividad hasta la pubertad, que es cuando las hormonas sexuales y la activación de la espermatogénesis provocan cambios genéticos que contribuyen a la transformación de las NCGIS en tumores invasivos, los TCGT (*figura 4*).

Las células de las NCGIS son células totipotentes/pluripotentes, con capacidad de autorenovación y diferenciación aberrante en varios tejidos, y comparten con las células germinales primordiales y gonocitos características morfológicas, perfiles inmunológicos, expresión genómica y características funcionales como el control del ciclo celular y la reparación del ADN (ácido desoxirribonucleico). Esto es así porque las NCGIS imitan las células germinales embrionarias y migran desde la parte proximal del saco vitelino hasta la cresta genital (en este momento constituyen las células germinales primordiales (PGC)) y hasta su llegada a la cresta neural antes del primer paso madurativo (constituyendo los gonocitos) (*figura 5*).

Las NCGIS, las cuales pueden desarrollar cualquier subtipo histológico de TCGT, se encuentran en la perifería de los TCGT y en aproximadamente el 5% del testículo contralateral. Los varones con NCGIS presentan hasta un 50% de riesgo de desarrollar un TCGT en los primeros 5 años (36,38,39).

A partir del síndrome de disgenesia testicular se han desarrollado también tumores de células germinales testiculares. Dicho síndrome incluye la disgenesia gonadal (malformaciones gonadales, criptorquismo y síndromes intersexuales, entre otros), disminución de la fertilidad y aumento del riesgo de TCGT (40). En las gónadas con disgenesia se puede afectar tanto la diferenciación de las células germinales como la función de las células somáticas de Sertoli y Leydig. La adecuada secreción hormonal y de factores paracrinicos por las células de Sertoli y Leydig, junto a otras células

estromales, forman el adecuado microambiente para la diferenciación normal de las células germinales.

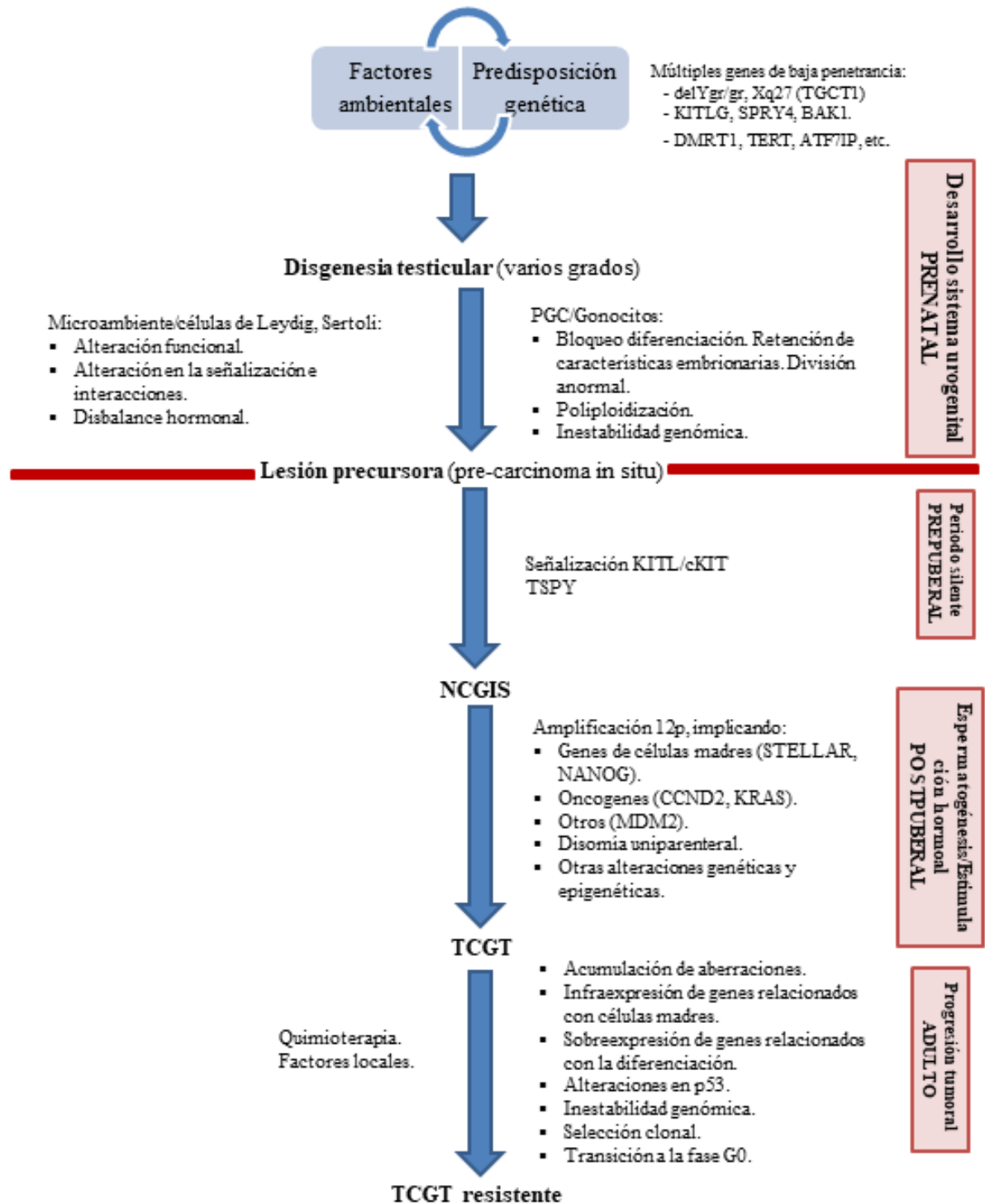


Figura 4. Etiopatogenia de los TCGT (35).

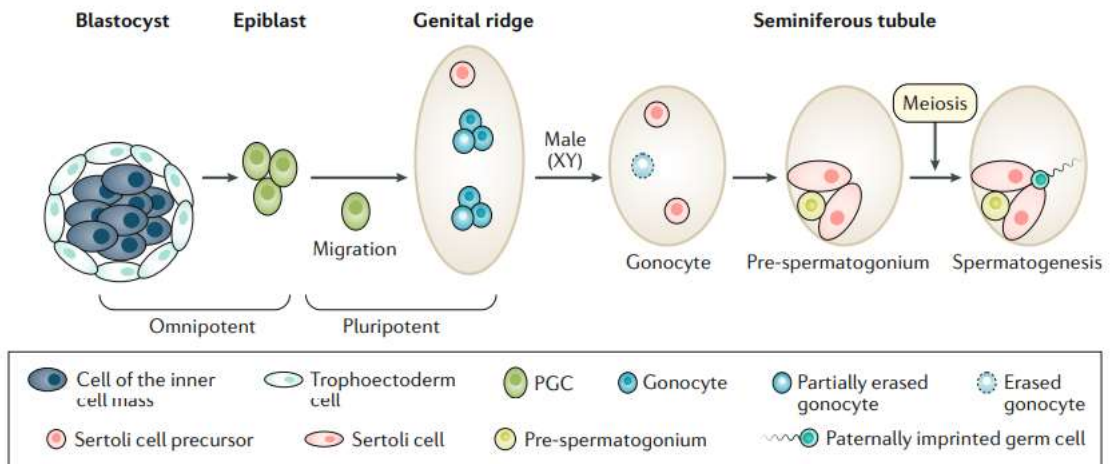


Figura 5. Desarrollo embrionario normal y origen del linaje de las células germinales. Las células germinales primordiales (PGC) se originan en el epiblasto desde donde migran a la cresta genital, tras la cual se donominan gonocitos. Los gonocitos se pueden diferenciar en pre-espermatogonias u ovocitos (18).

2. CLASIFICACIÓN DE LOS TCGT

Actualmente los TCGT se clasifican siguiendo el sistema de clasificación de la Organización Mundial de la Salud (WHO) de 2016 en dos grandes grupos: TCGT relacionados con las NCGIS y TCGT no relacionados con las NCGIS (*figura 6 y 7*).

Los TCGT no relacionados con las NCGIS se subdividen en dos grandes grupos (18):

- Tipo I, compuesto fundamentalmente por teratoma prepuberal (tumor benigno) y tumor de yolk sac (tumor maligno). Tiene lugar generalmente en población pediátrica, prepuberal por debajo de los 14 años. Estos tumores generalmente carecen de anomalías en el cromosoma 12.
- Tipo III (previamente conocido como tumor espermatocítico), compuesto por poblaciones polimorfas de tres tipos celulares: células tumorales pequeñas, intermedias y gigantes. Estos tumores indolentes generalmente tienen lugar en varones de edad avanzada, y no presentan anomalías en el cromosoma 12.

Los TCGT relacionados con las NCGIS son los TCGT tipo II, constituyendo la mayoría de TCGT, siendo siempre tumores malignos. Se dividen en seminomas (originados del epitelio germinal de los túbulos seminíferos) y no seminomas (compuestos por elementos puros o mixtos de carcinoma embrionario, teratoma, tumor de yolk sac, coriocarcinoma y seminoma). Los TCGT tipo II tienen lugar en adolescentes o adultos jóvenes y generalmente se asocian a anomalías en el brazo corto del cromosoma 12 (12p).

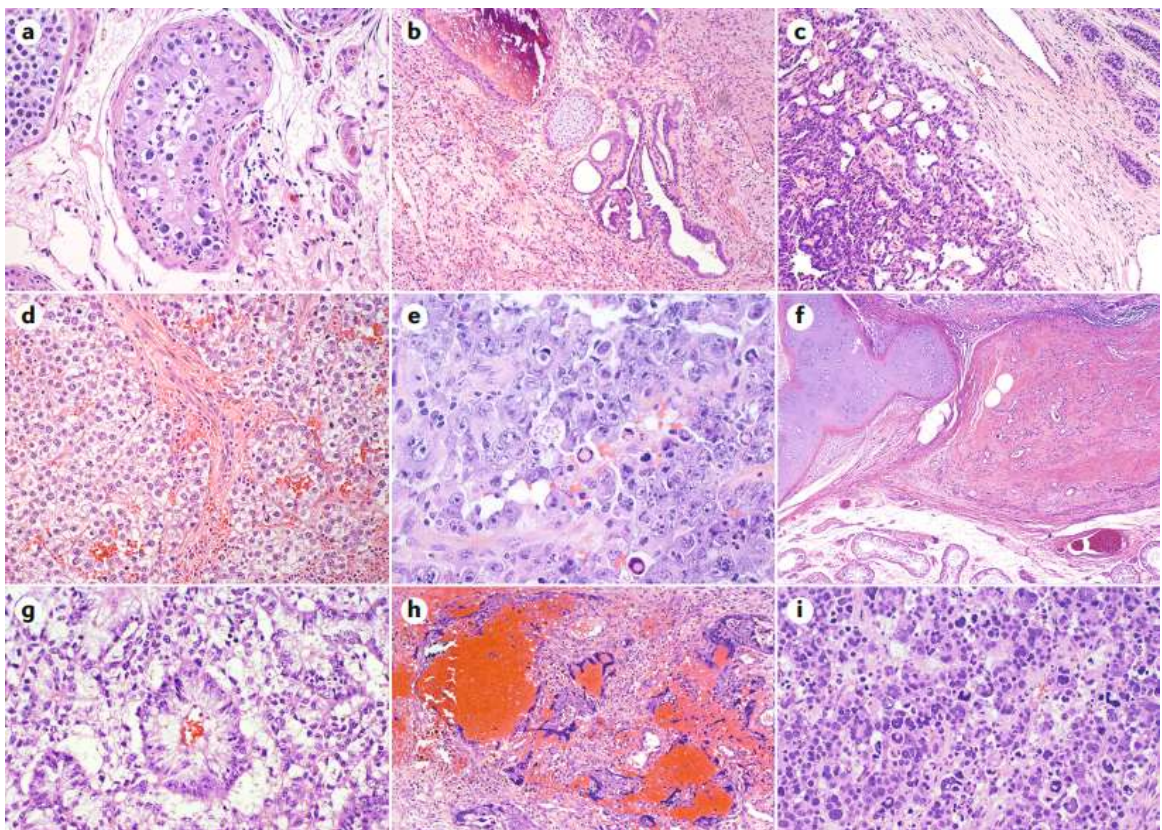


Figura 6. Composición histológica evaluada por hematoxilina-eosina de los tumores de células germinales testiculares. a) NCGIS; b) teratoma prepuberal (TCGT tipo I); c) tumor prepuberal yolk sac (TCGT tipo I); d) TCGT tipo II tipo seminoma; e) TCGT tipo II no seminoma, subtipo carcinoma embrionario; f) TCGT tipo II no seminoma, subtipo teratoma; g) TCGT tipo II no seminoma, subtipo yolk sac; h) TCGT tipo II no seminoma, subtipo coriocarcinoma; i) TCGT tipo III, tumor espermatocítico (18).

La edad de presentación del TCGT es importante para su clasificación, debido a la posible superposición en la apariencia histológica.

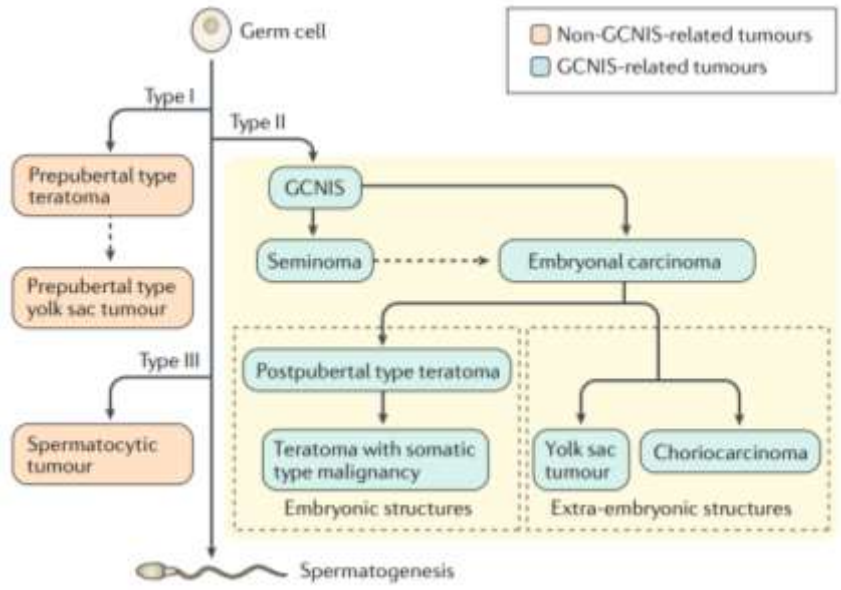


Figura 7. Representación de los distintos tipos de TCGT (18).

En la figura 8 se representa el proceso fisiológico de desarrollo de las células germinales masculinas, así como su relación con los distintos subtipos de TCGT.

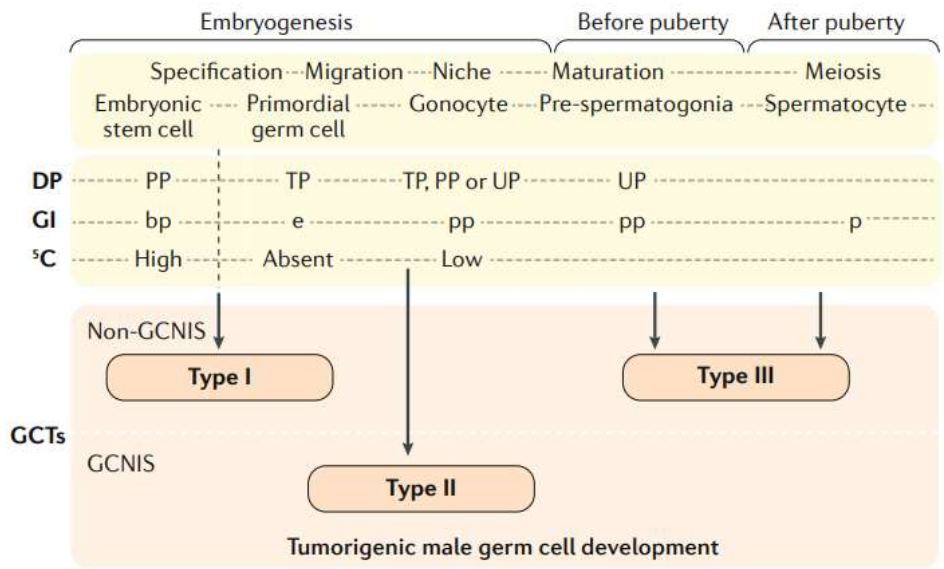


Figura 8. Representación del proceso fisiológico del desarrollo de células germinales masculinas, durante la embriogénesis, antes y después de la pubertad. DP: potencial desarrollo, GI: patrones de imprinting genómico, C: estado de metilación global del ADN. El potencial desarrollo se clasifica en totipotente (TP), pluripotente (PP) o unipotente (UP). El imprinting genómico se clasifica en biparenteral (bp), borrado (e) o parenteral (pp para células diploides y p para células haploides). El estado de metilación global del ADN se clasifica en alto (high), bajo (low) o ausente (absent).

3. PRINCIPALES ABERRACIONES GENÉTICAS QUE FAVORECEN LA FORMACIÓN DE LOS TCGT

La constitución genética de los TGCT refleja el carácter embrionario de las células tumorales que lo conforman, diferenciando de otros tumores que derivan de tejido somático, con una incidencia generalmente baja de mutaciones, frecuentes disomías uniparentales, pérdida del patrón parental de impronta genómica y un perfil distinto de metilación del ADN.

La primera alteración que ocurre durante los estadios iniciales de la transformación maligna es la sobreexpresión de la proteína KITL/SCF, cuya presencia puede distinguir las células germinales premalignas de las células germinales normales o maduras tardías (41). Y la aberración genética típica en los TCGT es la ganancia del brazo corto del cromosoma 12 (12p), presente en prácticamente todos los tumores de células germinales; en el 80% de los casos como isocromosoma i(12p), en el resto de los casos como amplificación y, en raras ocasiones, como inserciones (42–45). Se cree que la ganancia de 12p está asociada con la supervivencia de las NCGIS independientemente de las células de Sertoli, con la adquisición del fenotipo invasivo y la progresión a TCGT (46–49). Algunos de los genes localizados en el cromosoma 12p se encuentran sobreexpresados en todos o casi todos los TCGT, teniendo probablemente un importante papel en el su desarrollo. Estos genes incluyen entre otros: genes relacionados con las células madres como STELLAR, NANOG, GDF3, EDR1, necesarios para el fenotipo pluripotente con capacidad de autorenovación; genes reguladores del ciclo celular como CCND2 (ciclina D2) que permite escapar del control apoptótico de p53; oncogenes como KRAS; receptores de factores de crecimiento; genes implicados en el metabolismo de la glucosa como GLUT3, GAPDH, TPI1; genes reguladores transcripcionales como SOX5, ETV6/TEL, DDX11; genes implicados en la protección celular contra el daño oxidativo y reparación del ADN como MGST1 y RAD52 (26,44,50). Por tanto, la mayoría de las hipótesis apoyan como elementos claves en el desarrollo de los TCGT, la expresión de la ciclina D2 en las células de las NCGIS y la sobreexpresión de p53 no mutado, ambos secundarios a la amplificación del

cromosoma 12p. Las células con dichas alteraciones pueden escapar del control apoptótico de p53 y volver a entrar en el ciclo celular (51).

Otras aberraciones cromosómicas son, por ejemplo, la ganancia de 17q o Xq13, frecuentemente encontradas en los TCGT (52–54).

En un estudio publicado recientemente, se observó que en CHEK2 se localizaban la tercera parte de las variantes patogénicas germinales de genes reparadores del ADN (22 de 48) en varones con TCGT. En este estudio, los varones con TCGNS (n=205) presentaban un riesgo cuatro veces mayor de ser portadores de una variante germinal (con pérdida de la función) de CHEK2 (p.Ile157Thr), comparado con los varones sanos (n=27,173) (odds ratio (OR) 3.87, 95% CI: 1.65 – 8.86, p=0.006). Además individuos con dicha variante desarrollaban el TCGT seis años antes que aquellos con CHEK2 wild-type (5.95 años; 95% CI, 1.48 – 10.42, p=0.009) (55). Sin embargo, aquellos pacientes con TCGT y variante germinal patogénica de CHEK2 con pérdida de la función, no tenían más probabilidad de tener una historia familiar de TCGT, debido a su baja penetrancia en la predisposición al cáncer (55). Esta variante también se ha asociado a un modesto aumento del riesgo de cáncer de mama, colon y próstata (56–58).

Mientras que las aberraciones cromosómicas y alteraciones en el número de copias son críticos para el inicio y desarrollo de los TCGT, la diferenciación en los distintos subtipos histológicos parece estar determinada probablemente por la expresión de genes de diferenciación, regulados por cambios epigenéticos, fundamentalmente metilación del ADN, en regiones de promotores genéticos (30,59).

4. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA PATOGÉNESIS DE LOS TCGT

Las mutaciones en el gen supresor tumoral TP53 es la alteración genética más comúnmente encontrada en los tumores sólidos, generalmente

asociada con un mayor crecimiento tumoral, resistencia a la quimioterapia y peores resultados. En los TCGT, las mutaciones en TP53 son muy raras (hasta el 1 - 5% de los casos), encontrándose fundamentalmente en seminomas (30,60–63). En la *figura 9* se representa la vía normal de TP53 y cuando está mutada, lo cual está asociado a una alta quimioresistencia en múltiples tumores sólidos incluyendo los TCGT, pero como las mutaciones en esta vía son raras en los TCGT no representa la principal causa de quimioresistencia en estos tumores.

Pequeños grupos de microARN (micro ácido ribonucleico), como microARN 371-373 y microARN 302a, b y c (normalmente implicados en la diferenciación de las células madres germinales), están sobreexpresados en los TCGT. En los TCGT los microARN 371-373 pueden neutralizar la inhibición de quinasas dependientes de ciclinas (CDK) y el bloqueo del ciclo celular mediado por p53. Estos microARN no se encontraron en los TCGT con TP53 mutado, pudiendo discriminar TCGT de testículos normales (64). La familia microARN 302 inhibe la expresión de p21 en las células madres humanas embrionarias y probablemente contribuye en el eje no funcional p53-p21 con proteínas p21 no detectables (65). TP53 también activa ciertos microARN que también inhiben, en última instancia, la expresión de p21. De hecho, la proteína p21 no es detectable en la mayoría de los subtipos de TCGT, con la excepción de los teratomas y su inherente resistencia al cisplatino (66–68).

La sobreexpresión de CHK2 y activación constitutiva de ATM también se han descrito en las células de los TCGT (69,70).

La fosforilación de la proteína del retinoblastoma (pRB), mediada por las CDKs 4 y 6 (junto con la ciclina D), lleva al paso de la fase G1 del ciclo celular a la fase S, estimulando el crecimiento tumoral (71). Aunque los TCGT indiferenciados (como los carcinomas embrionarios) apenas expresan pRB, los TCGT más diferenciados como los teratomas han demostrado presentar altos niveles de expresión de pRB (72,73). De esta forma, la disfunción del gen supresor tumoral del retinoblastoma, pérdida de expresión de inhibidores de CDK4/6, sobreexpresión de p27kip1 y CDK4/ciclina D2 e

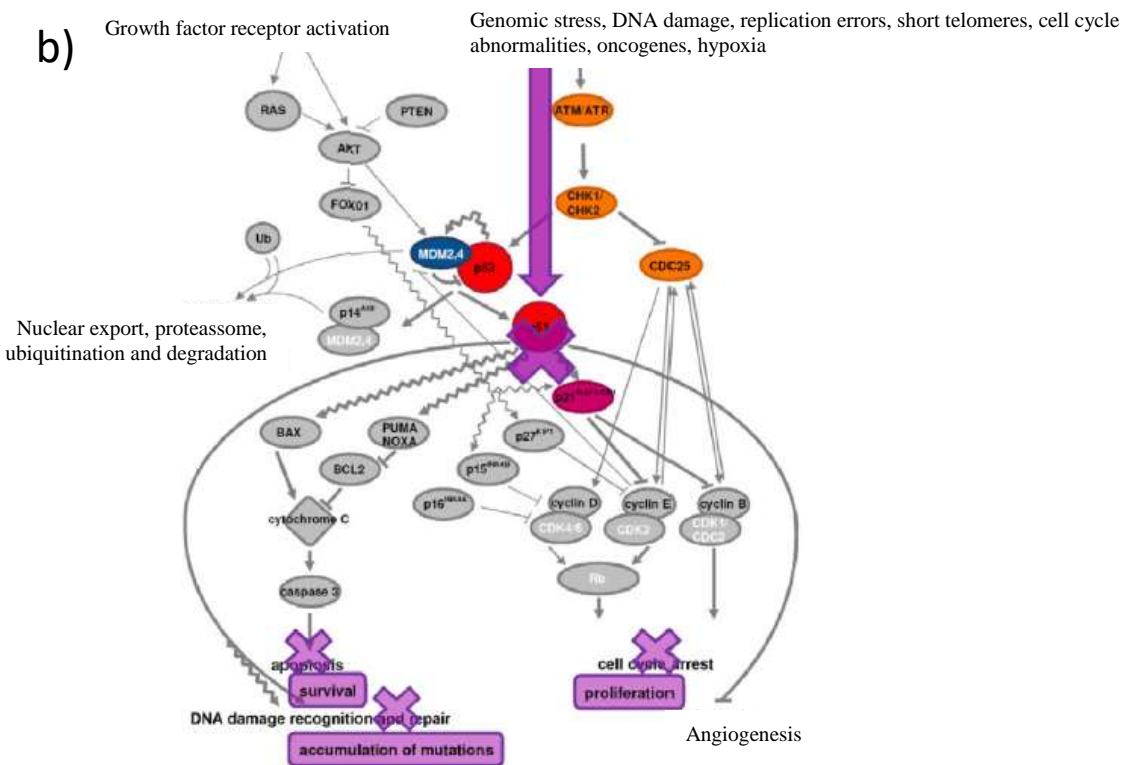
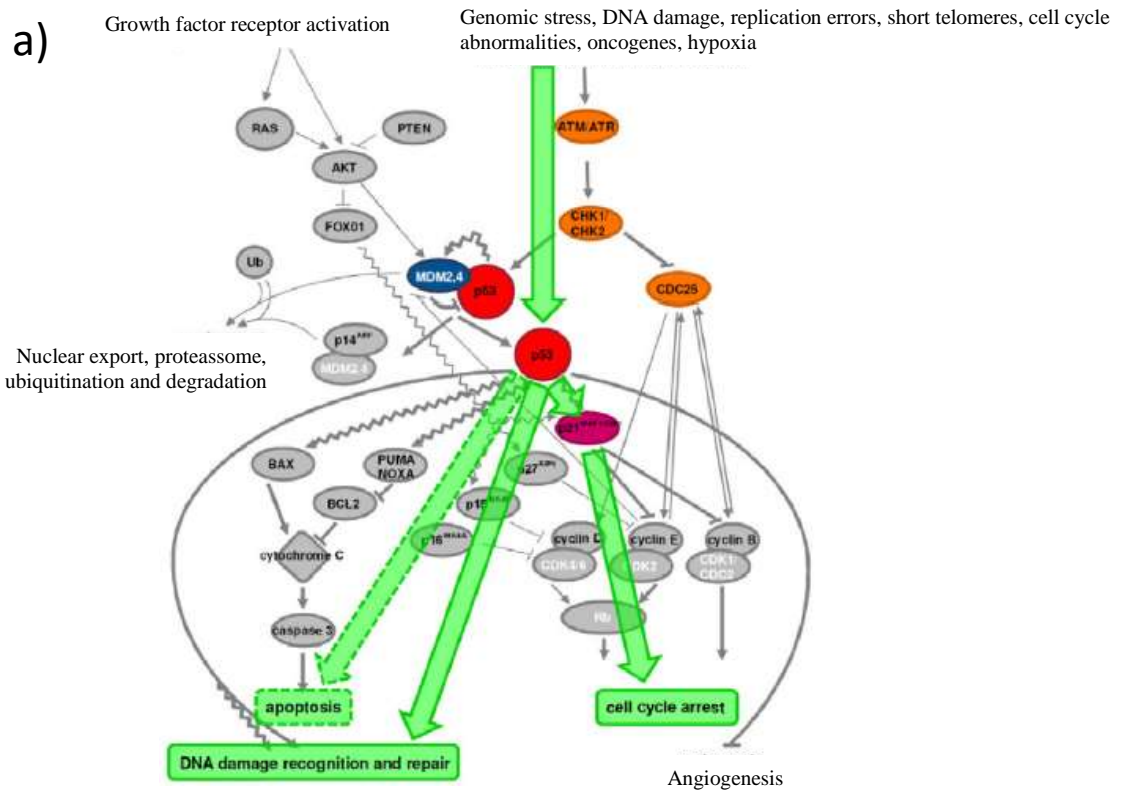


Figura 9. a) Vía normal de señalización p53, provocando finalmente un aumento de la apoptosis, reconocimiento y reparación del ADN, así como, bloqueo/arresto del ciclo celular. b) Representación de esta vía alterada, provocando un aumento en la supervivencia celular, acumulación de mutaciones y proliferación (35).

infraexpresión de CDK2/ciclina E se han encontrado en los TCGT y pueden alterar el control de la progresión de la fase G1 a la fase S del ciclo celular, así como, la reparación de los daños del ADN (69,72,74–78). La amplificación de CCND2, a través de la ganancia de 12p, activa CDK4/6 y permite la progresión de las células tumorales en el ciclo celular, mejorando su supervivencia.

El protooncogén cKIT (también conocido como receptor del factor de crecimiento de células madres (SCF), CD117) codifica una proteína miembro de la familia de receptores tirosín quinasa tipo III, que incluye los receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor estimulador de colonias de macrófagos y de monocitos. La vía cKIT/SCF es crucial para el desarrollo embrionario del testículo y la espermatogénesis (79). Esta vía participa en el desarrollo de múltiples tumores sólidos, donde varios de los factores implicados se han usado como marcadores pronósticos y como objetivo de tratamientos diana. En los TCGT se han observado alteraciones en las dos partes de esta vía: cKIT-RAS-RAF-MEK-ERK y cKIT-PI3K-AKT-mTOR-STAT (*figura 10*).

CKIT se expresa en una alta proporción de tumores germinales refractarios, presentándose en un estudio en un 48% de los casos (11 pacientes positivos de 23). Sin embargo, la expresión del protooncogén cKIT no se presenta de forma uniforme en todos los subtipos histológicos, siendo su expresión mayoritaria en los seminomas (80 – 100%), expresándose en un 7 – 48% en los no seminomas y estando la expresión ausente o casi ausente en el caso del coriocarcinoma y teratocarcinoma (80–85).

Esta vía regula la supervivencia, proliferación y migración de las células germinales primordiales y, está fuertemente implicada en el desarrollo de los TCGT. Las mutaciones en cKIT constituyen la mutación más frecuente en los TCGT, y esta vía puede potenciarse por su ligando KITL/SCF secretado por las células de Sertoli (86). Las mutaciones activadoras, la sobreexpresión o la amplificación son más frecuentes en los seminomas (hasta un 20%) que en los no seminomas (hasta un 2%) (33,87).



Por otro lado, la sobreexpresión de AKT se encuentra presente en la mayoría de los TCGT independientemente del estado mutacional cKIT, indicando mecanismos adicionales como la pérdida de función PTEN (fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa) (88,89). En los testículos, el gen supresor tumoral PTEN (asociado con la disregulación de la vía PI3K/AKT/mTOR) está altamente expresado en las células germinales normales, mientras que está ausente en un porcentaje significativo de seminomas, carcinomas embrionarios y en casi todos los teratomas. Las NCGIS expresan altos niveles de PTEN, sugiriendo que la pérdida de expresión PTEN está relacionada con el bloqueo de la diferenciación de las células germinales, la transformación maligna, la transición a TCGT invasivo así como con la progresión tumoral (90–92) (figura 11).

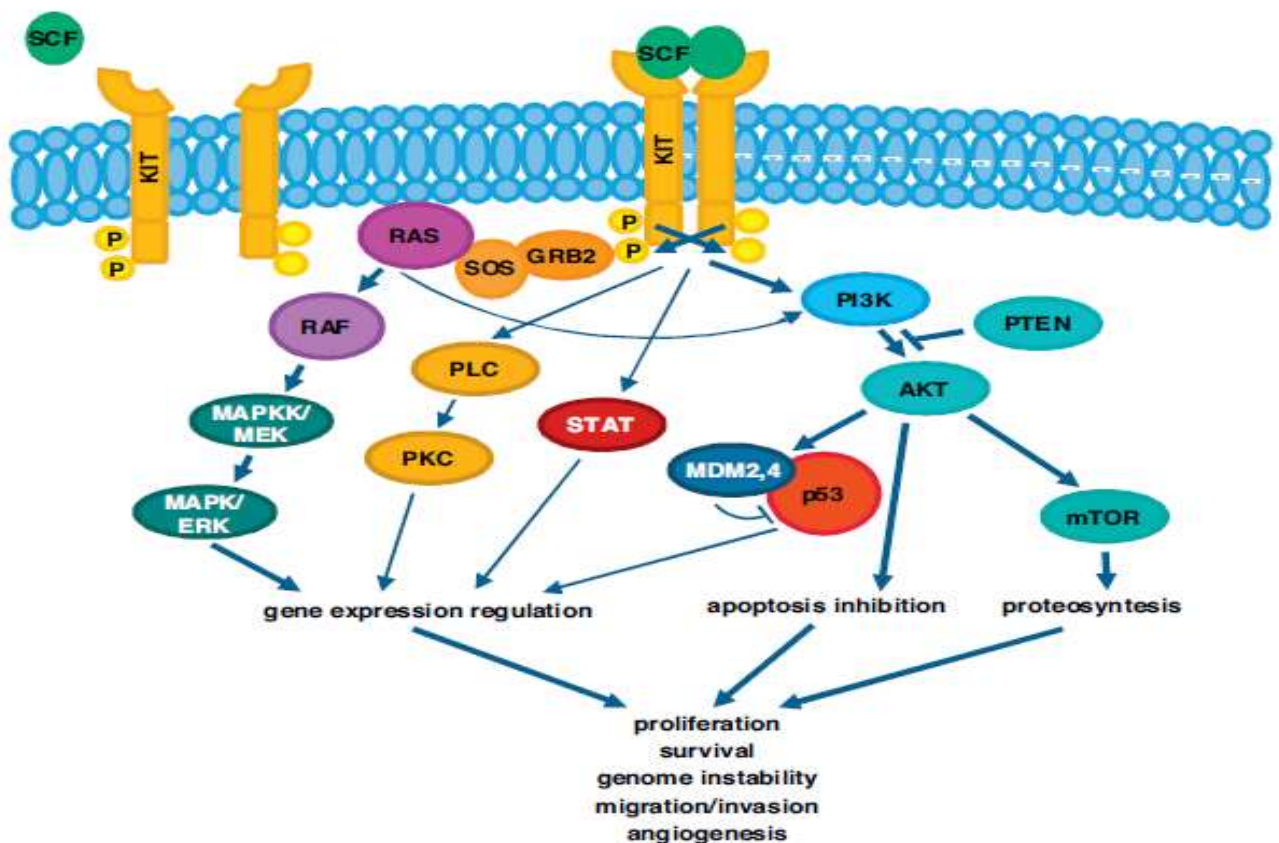


Figura 10. Vía de señalización del receptor tirosín quinasa en los TCGT (35).

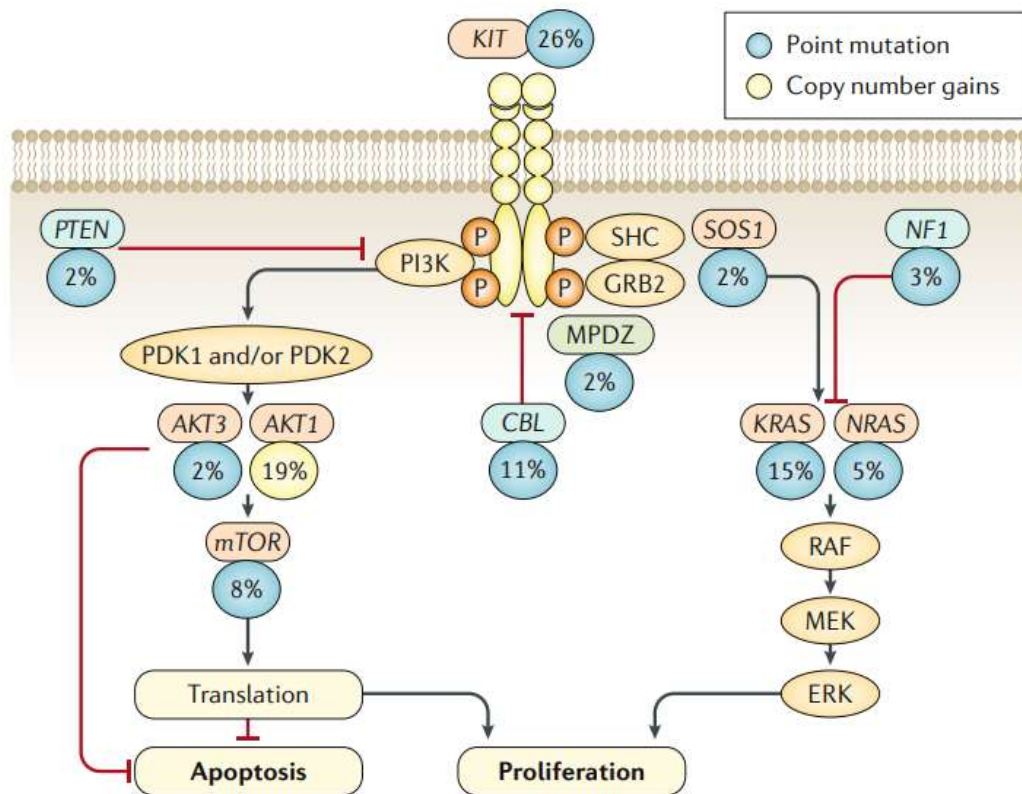


Figura 11. Principales alteraciones que ocurren en los TCGT tipo II. En azul se representan aquellos genes que codifican proteínas que regulan negativamente esta vía y en rojo los que intervienen activando esta vía (18).

La familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR (epidermal growth factor receptor)) está compuesta por cuatro miembros: EGFR/HER1, HER2, HER3 y HER4. La activación de estos receptores, lleva finalmente a la activación de una cascada de vías intracelulares con genes implicados en la proliferación, diferenciación, angiogénesis, migración y supervivencia celular. La amplificación o sobreexpresión de estos receptores tirosín quinasa, se han detectado en los TCGT pero se desconoce su relación con el desarrollo de estos tumores y la respuesta al tratamiento. Con respecto a la positividad para HER2, y a diferencia de lo que sucede en el cáncer de mama, en los TCGT hay una falta de concordancia entre la determinación por inmunohistoquímica y la determinación por inmunofluorescencia (FISH). La expresión inmunohistoquímica (IHQ) oscila del 28 al 65% en los TCGT, mientras que la amplificación génica está en torno al 5% (80,81,93,94).

La expresión de EGFR en los TCGT aún es controvertido, sin conocerse exactamente su contribución al desarrollo, diferenciación y progresión tumoral. Se ha publicado un 71% de expresión EGFR en los teratomas, 100% en coriocarcinomas, 29% en carcinomas embrionarios y un 0% en seminomas y tumores de yolk sac (95).

KRAS, localizado en el cromosoma 12p, puede estar implicado en los TCGT. La amplificación, mutaciones activadoras o sobreexpresión de RAS (KRAS, NRAS) se ha detectado hasta en el 10% de los casos de TCGT (33,88,96–100). Por otro lado, las mutaciones en BRAF ocurren hasta en el 10% de los TCGT, fundamentalmente en no seminomas (88,96).

El receptor tirosínquinasa MET y su ligando, el factor de crecimiento hepatocítico (HGF (hepatocyte grow factor)), se expresan en el tejido testicular humano y están implicados en el desarrollo testicular y la espermatogénesis (101). El protooncogén MET está implicado en la regulación de la supervivencia, adhesión, migración y angiogénesis celular a través de las vías AKT/MAPK (102).

También se han descrito polimorfismos genéticos en los receptores de estrógeno ESR1/2, en enzimas metabólicas de hormonas esteroideas CYP1A1 (citocromo P450) y en HSD17B4 (17beta-hydroxysteroid dehydrogenase), relacionados con la susceptibilidad a tumores testiculares (103–107). También se han encontrado mutaciones en los receptores de andrógenos en pacientes con TCGT, no así en varones sin tumor (108).

Además, los genes y vías implicadas en el desarrollo embrionario y gonadal de los testículos pueden también estar implicados en la patogénesis de los TCGNS. Las vías de señalización HOX, WNT, Hedgehog y NODAL son esenciales para la embriogénesis normal y la disregulación de estas vías se han encontrado repetidamente en los TCGT (99,109–111). Los genes TSPY (testis-specific protein on the Y chromosome), SRY (sex-determining region Y) y DMRT1 (doublesex and mab-3 related transcription factor 1), cruciales para la formación gonadal, también pueden estar implicados en la patogénesis de los TCGT (112,113).



La señalización SDF1/CXCL12-CXCR4 representa un papel crucial en las interacciones que ocurren entre las células tumorales y el microambiente tumoral. SDF1/CXCL12 (stromal cell-derived factor 1) es una importante quimiocina que participa en la migración prenatal de las células germinales primordiales y en el mantenimiento de los nichos de las células madres adultas. SDF1/CXCL12 se une al receptor CXCR4. La señalización CXCR4 estimula la supervivencia y crecimiento de las células neoplásicas, promueve la angiogénesis y es esencial para la diseminación metastásica a otros órganos, donde se expresa CXCL12. Esta vía se puede desarrollar en etapas tempranas de los TCGT, pero su papel principal tiene lugar en la etapa de progresión tumoral (114,115).

Alteraciones en la vía de señalización del TGF- β (transforming growth factor beta) se ha observado también en los TCGT. Esta citoquina controla la proliferación y diferenciación celular, puede inducir apoptosis vía SMAD o DAXX y regular el ciclo celular mediante la sobreexpresión de p21 y p15 e infraexpresión de myc (116,117).

Respecto a la angiogénesis, la cual raramente ocurre en tejidos normales adultos, es un factor clave en el crecimiento tumoral y desarrollo de metástasis. El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF (vascular endothelial growth factor)) es un factor angiogénico fundamental en el desarrollo embrionario y postnatal inmediato. Los receptores VEGF están casi exclusivamente expresados en la superficie de las células endoteliales y, sin embargo, están sobreexpresados en los TCGT. VEGF estimula la proliferación, migración, supervivencia de las células endoteliales, incrementa la permeabilidad vascular e inhibe la apoptosis, procesos muy relacionados con el desarrollo y diseminación tumoral. La densidad microvascular, puede ser predictiva de la presencia de metástasis ganglionares en los TCGT localizados, así como de un peor pronóstico (118). En el estudio de Fukuda et al. (1999), que incluyó 80 TCGT, la expresión VEGF se relacionó significativamente con la densidad microvascular ($p=0.001$). En el caso de los TCGNS ($n=47$), cuatro variables se relacionaron con la presencia de metástasis: expresión VEGF, densidad microvascular, invasión venosa y presencia de carcinoma embrionario en el tumor primario; aunque únicamente la expresión VEGF y la densidad

microvascular fueron significativos en el análisis multivariante ($p=0.007$ y $p=0.001$, respectivamente). Este estudio sugiere por tanto que la expresión VEGF está involucrada en el desarrollo tumoral, angiogénesis y metástasis en los TCGT (119).

La vía PARP (poly (ADP-ribose) polymerase) incluye una familia de enzimas que participan en la reparación del daño del ADN. PARP-1 es el miembro más frecuente de la familia PARP y, juega un papel importante en la reparación del ADN, estabilidad genómica, metabolismo energético, regulación transcripcional, inflamación y muerte celular. La reparación del ADN es un proceso complejo y multifacético, que es crítico para la supervivencia celular. Cuando se inhibe la vía PARP se acumulan los daños en una sola hebra del ADN, pudiendo llevar posteriormente al daño en las dos hebras y finalmente a la muerte selectiva de las células. Estos daños en una sola hebra, normalmente se reparan por recombinación homóloga de doble hebra del ADN, en los que juegan un papel fundamental BRCA1 y BRCA2, participantes en la vía PARP. Esta vía sobreactivada puede ser uno de los mecanismos por los que las células tumorales evitan la apoptosis tras el daño del ADN, de ahí que la inhibición de la vía PARP-1 sea una potente diana en el tratamiento de tumores, fundamentalmente aquellos platino sensibles (como lo son los TCGT).

En un estudio traslacional se estudió la expresión de la vía PARP en 124 pacientes con TCGT. Se observó una alta tasa de expresión, la mayor en NCGIS (con un 100%), le seguían los seminomas con un 52.6% de expresión, carcinomas embrionarios 47%, tumor de yolk sac 33.3%, teratomas 26.7% y coriocarcinomas 25%. Mientras que en los tejidos testiculares normales, únicamente se presentaba en un 1.9%. No hubo diferencias clínicas entre la población con sobreexpresión PARP de la que no la tenía (120).

Por otro lado, es típico en los TCGT la presencia de alteraciones epigenéticas, incluyendo la metilación del ADN de los islotes CpG, la remodelación de la cromatina debido a la modificación postraducciona de las histonas y el posicionamiento de los nucleosomas a lo largo de la

molécula de ADN y, la regulación de los microARN. En los TCGT más desarrollados, como teratomas, el grado de metilación del ADN aumenta y con ello la condensación de la cromatina, disminuyendo la quimiosensibilidad (121,122).

5. FACTORES DE RIESGO DE LOS TCGT

En la etiología de los TCGT juega un papel importante tanto la predisposición genética como los factores ambientales. El factor de riesgo principal para los TCGT es la historia familiar de tumor testicular (riesgo relativo (RR) \approx 4-6 para hijos y 8-10 para hermanos), la criptorquidia (RR \geq 3.18), las hipospadias (RR \approx 2.41), la hernia inguinal (RR \approx 1.37) y el diagnóstico previo de un tumor testicular contralateral (RR \approx 25). Entre los pacientes con carcinoma testicular, aproximadamente el 5% desarrollarán un nuevo tumor contralateral (en dos terceras partes de los casos presentado de forma metacrónica y en una tercera parte como sincrónicos). Tras haber presentado previamente un TCGS, el riesgo relativo de presentar un segundo carcinoma testicular es de 29 y tras un TCGNS el riesgo relativo es de 13 (123,124). El riesgo familiar queda más marcado en los TCGT en comparación con la mayoría de carcinomas, de hecho el 1.8% de los pacientes afectos tienen también a padre o hermano afectados, siendo este riesgo familiar fundamentalmente hacia las estirpes mixtas o no seminoma (125).

El aumento de la incidencia de los TCGT parece corresponderse con la disminución de la fertilidad en los hombres, estando por tanto relacionado la infertilidad/disminución de la fertilidad con los TCGT (RR hasta el 20% en los varones con infertilidad) (126–129). También están implicados otros factores de riesgo menores, por ejemplo, relacionados con la exposición a estrógenos tanto en la etapa prenatal como postnatal temprana (130,131). En el caso de la criptorquidia, existe un mayor riesgo de cáncer testicular ipsilateral (RR 6.33) que contralateral (RR 1.74) (132).

Desde el punto de vista genético, se cree que polimorfismos de un solo nucleótido, de moderado y alto riesgo, pueden explicar el 37% del riesgo familiar de padres a hijos, sin embargo, la mayoría del componente hereditario en estos casos es desconocido. Varios loci pueden contribuir a la susceptibilidad (por ejemplo TGCT1 en el cromosoma Xq27, relacionado con el criptorquismo; delección gr/gr en la región AZFc en el cromosoma Y) y predisposición de los TCGT (KITLG, SPRY4, BAK1, DMRT1, TERT, ATF7IP) (126,133–139).

6. TCGT EN ESTADIOS INICIALES

En la gran mayoría de los casos los TCGT debutan como estadio I (70-78%), mientras que esta frecuencia es menor en el subgrupo de pacientes con TCGNS, los cuales se presentan al diagnóstico como estadio I sólo en el 42% de los casos (8,140). Nos encontramos ante un estadio I de TCGT en el caso de que tras la orquiectomía no exista enfermedad regional ni a distancia y los marcadores tumorales sean normales.

Ante la sospecha de un tumor testicular, el procedimiento de elección diagnóstico y terapéutico es la orquiectomía radical inguinal con ligadura del cordón espermático, excepto excepcionalmente cuando se presenta como una enfermedad diseminada. Muy excepcionalmente se puede llevar a cabo una orquiectomía parcial, que nos la plantearíamos con el objetivo de conservar la fertilidad en los casos de alta sospecha de tumor benigno, tumor testicular bilateral y pacientes con testículo único. De elección es la orquiectomía radical inguinal, debido a que hasta en un 85% de los casos hay asociado NCGIS (141). En los pacientes con TCGT, la incidencia de NCGIS contralateral es del 4.4 - 8.1% y los factores de riesgo principales para su desarrollo son la atrofia testicular, criptorquidia, edad menor a 40 años, microlitiasis testicular e infertilidad (142,143). Debido a que las NCGIS suelen estar presentes en el testículo años antes de presentarse como TCGT existe la duda de si se debería realizar una biopsia al testículo contralateral en el acto de la orquiectomía, pero al no haber datos de que

esto pueda mejorar la supervivencia del paciente no hay consenso y de forma rutinaria no se lleva a cabo en la mayoría de los centros (144).

El 85% de los TCGS estadio I estarán curados sólo con la orquiectomía, mientras que en el caso de los TCGNS estadio I esta tasa baja al 70% (tasa de recaída de los TCGNS a los 5 años del 30.6% (2)). Estos pacientes no requerirán, por tanto, más tratamiento y todo tratamiento añadido supondría un sobretratamiento. La mediana de tiempo a la recaída es de 6.3 meses en el caso de los TCGNS y de 11.5 meses en los TCGS. Estos datos ya ponen de manifiesto la necesidad de un seguimiento más estrecho en los pacientes con TCGNS estadio I sin tratamiento adyuvante, en comparación con los pacientes con TCGS, fundamentalmente en los primeros años tras la orquiectomía (145).

Debido a esta alta tasa de curación con tan sólo orquiectomía, el tratamiento adyuvante quimioterápico podría reducir el riesgo de recidiva pero supondría el sobretratamiento de la mayoría de los pacientes, con las subsiguientes complicaciones no sólo agudas sino también a largo plazo. Por ello, el objetivo en los pacientes con TCGT es identificar aquellos con mayor riesgo de recaída que se beneficiarían del tratamiento adyuvante. Es más, aún está más entredicho el papel de la quimioterapia adyuvante si tenemos en cuenta que la mayoría de los pacientes en recaída se podrán curar, siendo la supervivencia a largo plazo del 99% (146,147), aportando la adyuvancia en tal caso disminuir el número de ciclos con el esquema de quimioterapia BEP (bleomicina, etopósido, cisplatino) de 3-4 ciclos en recaídas (según la clasificación pronóstica ICCCGC (International Germ Cell Cancer Collaborative Group)) a 1-2 ciclos en adyuvancia.

Han sido múltiples los estudios llevados a cabo para determinar los factores de riesgo en los pacientes con TCGNS estadio I, con objeto de poder seleccionar aquellos de mayor riesgo. Los factores de riesgo más ampliamente aceptados son la infiltración linfovascular, ausencia de elementos yolk sac, presencia de células indiferenciadas, presencia de carcinoma embrionario predominante en el tumor primario (en la mayoría de los estudios si es superior al 40%) y estadio T3 o T4 (148). En el estudio de Amato et al. (2004) se determinó como factores de riesgo la infiltración linfovascular, la presencia de carcinoma embrionario $\geq 80\%$ y unos niveles

de α -fetoproteína ≥ 80 ng/dL, definiendo bajo riesgo a aquellos TCGNS estadio I sin estos factores de riesgo, o bien, con $\geq 50\%$ de teratoma sin infiltración linfovascular (149). Ante la ausencia de todos estos factores de riesgo estaríamos ante un paciente de bajo riesgo con unas tasas de recaída del 10 al 14%, y la presencia de cualquiera de dichos factores nos llevaría a un paciente de alto riesgo, con unas tasas de recaída del 40 - 55%. Entre todos ellos, los factores con mayor valor en el riesgo de recaída son la infiltración linfovascular y la predominancia del componente carcinoma embrionario, que cuando están presentes simultáneamente el riesgo de recaída supera el 50% (2,146,147,150–152).

Según los resultados de un estudio con 226 pacientes con TCGNS estadio I, tanto el riesgo relativo de recaída como el tiempo de la recaída variaba según estaba presente uno, dos o ningún factor de riesgo (considerando únicamente la predominancia de carcinoma embrionario y la infiltración linfovascular). En este estudio, la tasa de recaída y mediana del tiempo a la recaída de los pacientes sin ningún, uno o dos factores de riesgo fue del 25%/8.5 meses, 41%/6.8 meses y 78%/3.8 meses, respectivamente (145).

Y seleccionando aún más entre los factores de riesgo en los TCGNS estadio I, la infiltración linfovascular es el más ampliamente aceptado como predictor de enfermedad micrometastásica oculta y de la subsiguiente progresión tumoral. Esta infiltración linfovascular suele estar presente aproximadamente en el 30% de los casos (2–5). En el caso de los TCGNS estadio I con infiltración linfovascular, la mediana de tiempo a la recaída es de 4 meses vs 8 meses cuando no está presente. La predominancia del carcinoma embrionario parece ser otro factor de riesgo independiente, pero en la mayoría de los casos se encuentra asociada a la presencia de infiltración linfovascular y su forma de medición es muy variable en los distintos informes anatomopatológicos (algunos lo expresan como presente/ausente, otros como predominante o no, otros como puro o mixto y otros con porcentajes).

Moul et al. (1994) publicó que aquellos TCGNS estadio I sometidos a orquiectomía con un porcentaje inferior al 45% de carcinoma embrionario y sin infiltración linfovascular tenían un estadio I en el 91.5% de los casos,

mientras que aquellos con más del 80% de carcinoma embrionario e infiltración linfovascular presentaban un estadio II en el 88% de los casos (153).

Aún no existen ensayos clínicos randomizados que comparen las distintas opciones a seguir tras la orquiectomía en un paciente con TCGT, debido a la baja incidencia de esta neoplasia con la subsiguiente dificultad de conseguir un tamaño muestral adecuado. En los TCGS estadio I podemos optar tras la orquiectomía por el seguimiento estrecho, tratamiento quimioterápico adyuvante o bien radioterapia adyuvante. En los TCGNS estadio I, las opciones tras orquiectomía son vigilancia activa, tratamiento quimioterápico adyuvante o linfadenectomía retroperitoneal (LDRP).

Como se ha mencionado previamente, debido a la alta supervivencia causa específica a largo plazo (99%), la elección de una u otra opción dependerá del riesgo de recaída, las diferentes toxicidades de cada opción en el paciente en concreto, las preferencias del paciente y la capacidad de adherencia a una vigilancia activa. Volviendo a recalcar la alta supervivencia causa específica, en un estudio con casi 1300 pacientes con TCGNS estadio I, la tasa de recaída a 5 años fue del 30.6%, con una mediana de tiempo a la recaída de cinco meses, y a pesar de ello la tasa de mortalidad fue inferior al 0.5% con sólo seis pacientes muertos por el propio tumor (2). Es importante también conocer los lugares más frecuentes de recaída, en los que focalizar el seguimiento, estando afectados los ganglios paraórticos retroperitoneales aproximadamente en el 60% de los casos, en el 25% los pulmones, en el 7% el mediastino y en un 3% los ganglios supraclaviculares (4).

Entre los pacientes con TCGNS estadio I con infiltración linfovascular, la tasa de recaída de aproximadamente el 50% con vigilancia activa se reduciría a menos del 10% con un ciclo de quimioterapia adyuvante BEP, a costa de sobretratar al restante 50% que no progresarán tras orquiectomía con solo vigilancia. En los pacientes con TCGNS estadio I sin infiltración linfovascular, de bajo riesgo, la tasa de recaída del 15% con vigilancia activa se reduciría a un 5 - 10% tras un ciclo de BEP (154).

a. TCGT en estadios iniciales de BAJO riesgo. Opciones tras orquiectomía

El riesgo de recaída en los pacientes con TCGNS estadio I de bajo riesgo es de aproximadamente un 10-15%, lo cual se debe tener en cuenta a la hora de decidir qué actitud se va a seguir en cada paciente (vigilancia activa vs quimioterapia adyuvante vs linfadenectomía retroperitoneal), teniendo en cuenta los beneficios y posibles complicaciones de cada una de las opciones en cada paciente en particular.

i. Opción 1: Vigilancia activa

El beneficio de la vigilancia activa respecto a la quimioterapia adyuvante es que evita las toxicidades secundarias de la misma (146,147,155), incluyendo no sólo las complicaciones agudas sino también las tardías, fundamentalmente cardiovasculares y segundas neoplasias. Respecto a la linfadenectomía retroperitoneal, la vigilancia activa evita las posibles complicaciones postquirúrgicas.

Requisito imprescindible para optar a la vigilancia activa es la adherencia al seguimiento estrecho, tras explicar los posibles riesgos de la recurrencia tumoral y ser capaces de llevar a cabo adecuadamente el seguimiento durante un mínimo de cinco años, con posibilidad de extenderse a diez años. En un estudio canadiense de 1239 pacientes con TCGT estadio I sometidos a vigilancia activa tras orquiectomía, la gran mayoría de las recaídas ocurrieron en los dos primeros años del seguimiento, siendo la tasa de recaída de tan solo el 0 - 5.6% del tercer al quinto año de seguimiento (156).

En un estudio danés con 3366 pacientes con TCGT estadio I tratados con orquiectomía y vigilancia activa, de los cuales 1366 eran TCGNS, recayeron el 31% de los TCGNS (n=424). De estos pacientes que recayeron, el 29.2% (n=400) ocurrió en los dos primeros años del seguimiento, mientras que sólo en 24 pacientes (1.8%) la recaída tuvo lugar tras el segundo año (de estos, el 1% más allá del quinto año) (157).

Esta excelente supervivencia causa específica la avala otro estudio con 935 pacientes de bajo riesgo, de los que 132 recayeron (14%) y de los que sólo cinco pacientes murieron por el tumor (0.5%), siendo la supervivencia causa específica superior al 99%. Además, este estudio concuerda con el tiempo de recaída del resto de estudios, ocurriendo el 89% en los dos primeros años, con una mediana de recaída de ocho meses. Sólo el 1% (n=8) de las recaídas ocurrió más allá del tercer año (150).

En la misma línea, disponemos de los resultados del estudio de Tandstad et al. (2014) en el que se trató a 258 pacientes con TCGNS estadio I con infiltración linfovascular con un ciclo BEP y a 255 pacientes sin infiltración linfovascular con vigilancia activa tras orquiectomía. Las tasas de recaída en este estudio fue del 3.2% entre los casos de alto riesgo tratados con BEP y del 1.6% entre los pacientes de bajo riesgo seguidos con vigilancia estrecha tras orquiectomía (158).

Además es bastante fácil detectar las recaídas, ya que la primera evidencia de recaída en los TCGNS suele ocurrir con la elevación de los marcadores tumorales, a diferencia de los pacientes con TCGS en los que típicamente se observa una progresión ganglionar retroperitoneal (159,160). Por lo que en aquellos casos con sospecha de progresión tumoral de un TCGNS estadio I sin elevación de marcadores tumorales en sangre, se ha de valorar la realización de una biopsia confirmatoria, fundamentalmente cuando se presentan de forma atípica (sin afectación ganglionar retroperitoneal). Por otro lado, la mayoría de las recaídas se presentan en estadios iniciales, con la afectación de los ganglios retroperitoneales en el 60% de los casos. En el caso de los pacientes sometidos a linfadenectomía retroperitoneal, el 25% recaen en los pulmones y el 10% presentan sólo elevación de marcadores tumorales (161–163).

También se ha de mencionar la importancia de la frecuencia de las tomografías computerizadas (TCs) en el seguimiento, teniendo en cuenta el adecuado balance entre la detección precoz de las recaídas, los lugares más frecuentemente afectados en las recaídas, la mediana de tiempo de recaída y el teórico riesgo carcinogénico de un número alto de TCs. Respecto al PET (Positron Emission Tomography), aunque puede detectar algunas recaídas no detectadas en el TC, la tasa de recaída entre los pacientes con PET-TC



negativo es alta, por lo que no tiene papel en el seguimiento normal de los pacientes con TCGT (164).

ii. Opción 2: Quimioterapia adyuvante

La quimioterapia adyuvante sería una opción en aquellos pacientes que desean reducir aún más el riesgo de recaída. En un estudio de SWENOTECA (Swedish and Norwegian Testicular Cancer Project), se propuso vigilancia activa a los pacientes sin infiltración linfovascular (n=254 de 745 pacientes incluidos). Con una mediana de seguimiento de 4.7 años, la tasa de recaída como era de esperar fue mayor entre los pacientes sometidos a vigilancia activa respecto a los que recibieron quimioterapia adyuvante con BEP (12% vs 1.3% vs 0% en los pacientes sometidos a vigilancia activa vs tratados con un ciclo de BEP adyuvante vs tratados con dos ciclos de BEP adyuvante, respectivamente). Pero a pesar de esta tasa de recaída menor con el tratamiento quimioterápico adyuvante, la tasa de mortalidad fue solo del 1% y no hubo ninguna muerte debida al tumor, debido a la alta probabilidad de rescate de los pacientes con recaída (155).

El estudio alemán de Albers et al. (2006) comparó la tasa de recaída entre la linfadenectomía retroperitoneal y BEP un ciclo en 382 pacientes con TCGNS estadio I tratados con orquiectomía, sin discernir entre grupos de riesgo. Trece pacientes (8%) de los pacientes tratados con LDRP recayeron, mientras que sólo dos (1%) de los tratados con BEP un ciclo recayó (165).

Entre la toxicidad aguda del tratamiento con BEP destaca la toxicidad hematológica, vómitos y pérdida de peso. Como posibles toxicidades a largo plazo se encuentran la nefrotoxicidad por cisplatino (CDDP), toxicidad pulmonar por bleomicina y las segundas neoplasias fundamentalmente por etopósido. Respecto a la fertilidad, distintos estudios han demostrado que existe una disminución en la concentración del esperma en los pacientes con un solo testículo, independientemente de la etiología. En el estudio de Ferreira et al. (1991) el 50% de los pacientes con un único testículo presentaban una concentración espermática inferior a $20 \times 10^6/\text{ml}$ (166,167). Pero sin embargo, no se han observado cambios significativos en la fertilidad

y función sexual entre los varones que reciben BEP dos ciclos adyuvantes y los que se someten a vigilancia activa (168).

iii. Opción 3: Linfadenectomía retroperitoneal

El 20 - 25% de los TCGNS estadio I realmente presentan micrometástasis ocultas en ganglios retroperitoneales (siendo realmente un estadio II), los cuales si se someten a vigilancia post-orquiectomía posteriormente presentarán afectación ganglionar retroperitoneal (169,170). Esta actitud tiene las ventajas de un mejor estadiaje de los pacientes, el potencial de poder curar aquellos pacientes con únicamente enfermedad micrometastásica en dichos ganglios, oportunidad de ofrecer la quimioterapia adyuvante a aquellos TCGNS con amplia afectación nodal y disminuir la tasa de recaída posterior en el retroperitoneo (al 1% aproximadamente), por lo que en el seguimiento se podría reducir/modificar la frecuencia de los TCs y de las regiones más estrechamente vigiladas.

Sin embargo, el 70% de los pacientes con TCGNS estadio I que se someten a dicha intervención tras orquiectomía tienen ganglios retroperitoneales negativos, por lo que la mayoría de estos pacientes no se beneficiarían de esta intervención.

Esta sería una opción en aquellos pacientes en los que decidimos, cualfuese el motivo, un tratamiento activo postorquiectomía y en los que el componente predominante del tumor primario es teratoma, donde el papel de la quimioterapia no tendría cabida por la alta tasa de quimioresistencia. Por supuesto, en el caso de inclinarnos a esta opción es necesario disponer de un equipo urológico con experiencia.

El 10 - 12.5% aproximadamente de las linfadenectomías retroperitoneales presentan alguna complicación, destacando las infecciones de la herida quirúrgica (5%), íleo paralítico (2 - 3%) y complicaciones pulmonares (1 - 2%). La tasa de mortalidad, sin embargo, es muy baja (0.3%) (171). Una de las principales secuelas es la infertilidad por eyaculación retrógrada secundario al daño de las fibras simpáticas que convergen en el plexo hipogástrico.

b. TCGT en estadios iniciales de ALTO riesgo. Opciones tras orquiectomía

Al igual que con los pacientes con TCGNS estadio I de bajo riesgo, existen las tres mismas opciones a seguir tras la orquiectomía (vigilancia activa vs quimioterapia adyuvante vs linfadenectomía retroperitoneal), sin datos disponibles sobre qué opción es mejor. E igualmente en este grupo la tasa de supervivencia causa específica con cualquiera de las tres opciones es superior al 99%.

i. Opción 1: Vigilancia activa

La vigilancia activa es una opción en aquellos pacientes conscientemente informados de que el riesgo de recaída tumoral es de aproximadamente un 50% en los primeros dos – tres años desde la orquiectomía, estando capacitados para someterse a un riguroso seguimiento estrecho. Como se ha mencionado previamente, a pesar de esta alta tasa de recaída la supervivencia global es excelente (>99%).

Un estudio de Kollmannsberger et al. (2010) valoró a 223 varones con TCGNS estadio I con seguimiento exclusivo tras orquiectomía. La tasa de recaída fue del 26% (n=59), siendo la mediana de tiempo a la recaída cuatro meses, aumentando dicha tasa al 50% entre los pacientes con infiltración linfovascular (n=30), al 55% entre los pacientes con infiltración linfovascular y componente de carcinoma embrionario en el tumor primario (n=40) e inferior al 20% entre los que únicamente presentaban como factor de riesgo el componente carcinoma embrionario (n=109). El 85% del total de las recaídas tuvieron lugar en el primer año de seguimiento y el 88% en los dos primeros años. De las 59 recaídas, 58 fueron clasificadas como de buen pronóstico según la clasificación IGCCCG y el 98% de las recaídas se trató exclusivamente con quimioterapia de primera línea alcanzando respuesta completa en el 78% de los casos. Sólo cuatro de las 59 recaídas precisaron un tratamiento adicional tras esta quimioterapia de primera línea, suficiente con la LDRP (en todos estos casos la pieza quirúrgica estaba constituida por

teratoma). Ningún paciente requirió tratamiento sistémico de segunda línea, de hecho la supervivencia causa específica en este estudio fue del 100% tras cuatro años de mediana de seguimiento (146).

Similares resultados se obtuvieron en un estudio del Hospital Princess Margaret de Toronto, con 371 pacientes con TCGNS estadio I manejados con seguimiento exclusivo tras orquiectomía. En este estudio tanto la infiltración linfovascular ($p < 0.0001$) como el carcinoma embrionario puro ($p=0.02$) fueron predictores independientes de recurrencia. Con una mediana de seguimiento de 6.3 años, la tasa de recaída en los que presentaban infiltración linfovascular fue del 54% ($n=92$) y del 45% en los que presentaban carcinoma embrionario sin infiltración linfovascular ($n=33$) (147).

ii. Opción 2: Quimioterapia adyuvante

La quimioterapia adyuvante es la opción de elección en aquellos pacientes de alto riesgo que desean disminuir el riesgo de recaída por el estrés psicológico que les pueda ocasionar este alto riesgo de recurrencia y, en aquellos que no puedan adherirse a un seguimiento estrecho.

A favor del tratamiento quimioterápico adyuvante respecto a la linfadenectomía, existen múltiples estudios publicados de pacientes con TCGNS de alto riesgo tratados con BEP adyuvante dos ciclos (172–177). El estudio con mediana de seguimiento más largo (113 meses), de Chevreau et al. (2004), incluyó 40 pacientes con TCGNS estadio I con infiltración linfovascular asociado o no a la presencia de carcinoma embrionario. Este estudio trató a estos pacientes con dos ciclos de BEP adyuvante, logrando que ningún paciente recayese con una toxicidad aguda mínima y en ausencia de toxicidad a largo plazo (178). Por otro lado, el estudio publicado con mayor número de pacientes con TCGNS de alto riesgo tratados con BEP dos ciclos adyuvantes es de Cullen et al. (1996), en el cual solo hubo dos recaídas de 114 pacientes incluidos (174).

Un poco más antiguo es un artículo publicado en 1993 ($n=43$), donde se consideró como TCGNS de alto riesgo aquellos pacientes con alguno de los

siguientes factores de riesgo: invasión vascular, crecimiento más allá de la cápsula testicular ($pT > 1$) y presencia de carcinoma embrionario. En este estudio la tasa libre de recaída fue del 97.5% en los pacientes tratados con quimioterapia adyuvante, BEP dos ciclos. Los dos pacientes que rechazaron el tratamiento adyuvante, recayeron (173). Los mismos factores de riesgo se consideró en el trabajo de Böhlen et al. (1999), el cual incluyó 60 pacientes de alto riesgo tratados con dos ciclos adyuvantes de BEP, o bien, cisplatino/vinblastina/bleomicina. En este último estudio sólo hubo una recaída de teratoma y un seminoma en el testículo contralateral. La toxicidad grado 4 se observó en 9 de los 116 ciclos de quimioterapia administrados, consistiendo en neutropenias y trombocitopenias transitorias (177). Resultados similares se observaron en otro estudio con pacientes con TCGNS, con una tasa de recaída del 5% en los pacientes de alto riesgo tratados con BEP dos ciclos adyuvantes y del 16% en los pacientes de bajo riesgo con seguimiento postorquiectomía (172). La toxicidad de BEP dos ciclos fue desdeñable, con mínima toxicidad aguda y a largo plazo (cardiovascular, pulmonar, fertilidad y segundas neoplasias) (172,173,175).

En el estudio del grupo alemán (AUO Trial AH 01/94), se aleatorizó a 382 pacientes con TCGNS estadio I a recibir BEP un ciclo vs LDRP. En este estudio la tasa de recaída a los 4.7 años de seguimiento fue del 2% vs 15% a favor del tratamiento quimioterápico, y la tasa de supervivencia libre de recaída a los 2 años fue del 99.46% vs 91.87% a favor de BEP un ciclo (hazard ratio (HR) de recaída con cirugía respecto a quimioterapia 7.937 (95% CI: 1.808 – 34.48)). También se ha de recalcar que todos los pacientes que recayeron tras LDRP, se curaron con posterior quimioterapia (algunos con una cirugía adicional añadida). No hubo ningún caso de muerte específica por el tumor (179).

Del estudio SWENOTECA previamente mencionado, la tasa de recaída fue mayor entre los pacientes con TCGNS estadio I con infiltración linfovascular sometidos a vigilancia activa respecto a los que recibieron 1 ó 2 ciclos de quimioterapia adyuvante con BEP (42% vs 3% vs 0%, respectivamente), sin haber ninguna recaída entre los 70 pacientes tratados con dos ciclos de BEP adyuvante tras una mediana de seguimiento de 4.7

años. Por tanto, tanto en la población de bajo como de alto riesgo, un ciclo de BEP adyuvante reduce el riesgo de recaída a por debajo del 10% en los pacientes con TCGNS (155).

Apoyan estos datos, los resultados del estudio de Huddart et al. (2017) en el que tras un ciclo de BEP adyuvante la tasa de recaída fue del 2.8%, con una mediana de seguimiento de 39 meses (180). En otro estudio, esta tasa de recaída fue del 6.5% y 2.9% con uno y dos ciclos de BEP adyuvante, respectivamente (181). Por tanto, a pesar de la mayor reducción del riesgo de recaída con dos ciclos de BEP adyuvante respecto a uno, se desconoce hasta qué punto esto puede justificar los dos ciclos, debido a la excelente supervivencia causa específica a largo plazo independientemente del número de ciclos recibidos y al probable aumento de las toxicidades tardías a mayor número de ciclos.

A pesar de que actualmente la mayoría de las guías recomiendan un solo ciclo de BEP en el caso de optar por el tratamiento adyuvante, no existen ensayos aleatorizados que comparen dos vs un ciclo de BEP adyuvante. La limitación de la adyuvancia a uno o dos ciclos de BEP ha reducido las posibles complicaciones agudas y tardías, incluyendo la toxicidad pulmonar de la bleomicina (que suele presentarse cuando se administran cuatro o más ciclos). A día de hoy se podría plantear razonablemente la opción de dos ciclos de BEP adyuvante en aquellos pacientes de más riesgo, como lo son aquellos con infiltración linfovascular y predominancia de componente embrionario.

La quimioterapia adyuvante de corta duración parece no afectar a los niveles de andrógenos, fertilidad, nivel neurológico ni cognitivo (182–185), pero se ha descrito principalmente toxicidad tardía cardiovascular, renal y metabólica (fundamentalmente con un mayor número de ciclos de quimioterapia) (186–189). El riesgo de síndrome metabólico en estos pacientes está incrementado en 1.9 veces, fundamentalmente los que reciben poliquimioterapia (190). La espermatogénesis tras el tratamiento depende ampliamente de la edad al diagnóstico, función gonadal pre-tratamiento y tipo de tratamiento recibido (191). Se cree que estas

complicaciones tardías están relacionadas con el número de ciclos, de ahí que se crea que dos ciclos de BEP adyuvante son más tóxicos a largo plazo que uno, aunque no existen datos que lo confirmen. Entre los largos supervivientes del carcinoma testicular, también destacan las segundas neoplasias (principalmente leucemia y carcinoma de vejiga) relacionadas con la quimioterapia previamente recibida. Se ha observado que el riesgo de aparición de una leucemia secundaria es mayor entre los pacientes que reciben una dosis superior a 1.2 g/m^2 de etopósido (un ciclo de BEP presenta una dosis de 0.5 g/m^2 de etopósido) (190,192).

iii. Opción 3: Linfadenectomía retroperitoneal

La linfadenectomía retroperitoneal en los pacientes con TCGNS estadio I de alto riesgo, sería una opción en aquellos pacientes que quieren reducir el riesgo de recaída pero rechazan la quimioterapia adyuvante, o bien, quieren reducir dicho riesgo y el tumor es predominantemente teratoma. A diferencia de lo que ocurre con otros tumores sólidos, los teratomas testiculares se asocian con un comportamiento clínico poco agresivo, pero sin embargo no responden al tratamiento quimioterápico. Como se mencionó previamente, esta cirugía ha de llevarse a cabo únicamente por cirujanos expertos en la misma.

Tras esta intervención se sobreestadian aproximadamente un 20% de pacientes, por lo que posteriormente suelen precisar quimioterapia adyuvante. Los pacientes en los que se recomienda quimioterapia tras LDRP son aquellos en los que existe afectación metastásica en múltiples ganglios (≥ 6), las lesiones metastásicas han alcanzado los 2 cm de diámetro o existe afectación extranodal (193,194).

En un estudio con 292 pacientes, ninguno de los pacientes con estadio II tratados con quimioterapia adyuvante progresó, mientras que el 22.6% (7 de 31 estadios II) con estadios II sin quimioterapia adyuvante progresó (195).

7. TCG EN ESTADIOS AVANZADOS

Respecto a los pacientes con TCG con estadios avanzados, la actitud terapéutica se basa en la clasificación pronóstica IGCCCG, mediante la cual se clasifican a los pacientes en buen, intermedio o mal pronóstico (en función del subtipo histológico (seminoma vs no seminoma), localización del tumor primario (gonadal o mediastínico), niveles de marcadores tumorales (β HCG, AFP y LDH) y afectación extrapulmonar). De forma global, se recomienda que los pacientes de buen pronóstico reciban tres ciclos de BEP preferentemente, o bien, 4 ciclos de EP (etopósido, platino), y los pacientes de intermedio y mal pronóstico 4 ciclos de BEP (196).

La tasa de curación del carcinoma testicular diseminado tras una primera línea basada en cisplatino es del 70 - 75%, mientras que a la recaída la segunda línea de quimioterapia ("first salvage treatment") con dosis convencionales puede obtener una remisión completa en el 40 - 50% de los pacientes (197-199) y una tasa de curación de hasta el 60% con quimioterapia a altas dosis junto al autotrasplante de células madres (HDCT-ASCT) (200,201). En la actualidad está en marcha un ensayo clínico aleatorizado para tratar de aclarar cuál de los dos tipos de tratamiento de rescate es la mejor opción (202).

Los pacientes que recaen tras esta segunda línea de tratamiento tienen unos resultados muy pobres, sin opción curativa cuando no es posible la resección quirúrgica (203). A pesar de las altas tasas de respuesta a la primera y segunda línea, un 15 - 20% del global de pacientes metastásicos no disponen de opciones terapéuticas curativas, de ahí la importancia del desarrollo de terapias diana en esta cohorte de pacientes. Hasta la fecha, la mejor opción terapéutica en esta circunstancia, es la combinación del triplete gemcitabina, oxaliplatino y paclitaxel (GOP), que obtiene una tasa de respuesta objetiva del 51% y, que en combinación con la subsiguiente resección de las masas residuales puede conseguir en torno al 11% de supervivencia libre de progresión (SLP) a 2 años. La tasa de respuesta a otras líneas de tratamiento se sitúa entre el 20 y 40%, con una mediana de supervivencia global (SG) de 6 - 8 meses (1).

La tasa de curación en la población de TCGNS avanzados de buen pronóstico es superior al 90%, del 70 al 75% en la población de riesgo intermedio y del 40 al 45% en la población de peor riesgo (133). Sin embargo, aún desconocemos qué pacientes no responderán a dicho tratamiento y en los que habría que valorar un régimen más intensivo de segunda línea.

Por otro lado, el tratamiento con terapias diana ha cambiado el paradigma del manejo de múltiples tumores sólidos, seleccionándose aquella población que puede beneficiarse de estos agentes. En el caso de los TCGT este objetivo es más difícil conseguir, debido al bajo número de pacientes que recaen y la heterogeneidad de subtipos histológicos. Los datos disponibles hasta la fecha ponen de manifiesto la posible actividad de algunas terapias diana en pacientes con TCG refractarios muy seleccionados, pero sin efectividad clara de forma global (6). En el **anexo 1** se observan las principales vías y dianas en los pacientes con TCGT sobre las que se han desarrollado fármacos diana, los cuales se encuentran en fase de investigación.

8. FACTORES BIOMOLECULARES PRONÓSTICOS / PREDICTIVOS DE RESPUESTA

Subyacente al desarrollo de nuevos tratamientos más efectivos en los pacientes con TCGNS de mayor riesgo o de peor pronóstico, es de vital importancia encontrar factores pronósticos de alto riesgo, más fidedignos a los anatomopatológicos usados hoy día, así como predictivos de respuesta.

Las técnicas de microarrays de ARN permiten el análisis simultáneo de la expresión de un gran número de genes en una muestra determinada, por lo que han contribuido al conocimiento de nuevos subtipos de tumores no reconocidos con los métodos convencionales, con una evolución clínica y pronóstica diferente. El desarrollo biotecnológico en los últimos años, ha

permitido identificar sets o firmas génicas predictivas de respuesta en distintos tipos de tumores, como cáncer de mama (204), próstata (205) y pulmón (206). Sin embargo, debido a la rareza de los tumores de células germinales aún no se han desarrollado estudios a gran escala para identificar conjuntos de genes pronósticos en esta población, aunque sí comenzamos a disponer de los resultados de algunos estudios de expresión génica predictivos de respuesta en TCG.

Muchos de los factores comentados previamente relacionados con el desarrollo de los TCGT y fundamentalmente con la resistencia al cisplatino, se han sugerido como posibles nuevos factores moleculares pronósticos y predictivos, aunque no se ha confirmado dicho impacto de forma independiente en ninguno de ellos. Estos incluyen la mutación en TP53, mutación en MSI y BRAF, sobreexpresión de ciclina D1, infraexpresión de OCT4, expresión de marcadores de células B y T (como CXCL12), regulación al alza de marcadores de diferenciación neuronal y más recientemente firmas específicas de expresión génica, que se han relacionado con la resistencia a la quimioterapia, mayor riesgo de recaída o peor pronóstico (96,114,207–209).

Korkola et al. (2015) identificó un modelo predictivo de respuesta de nueve genes en los pacientes con TCGT avanzados tratados con quimioterapia basada en platino (ACTN1, ALDH6A1, CPEB2, DLST, FBXL5, PGF, MED6, SGPP1 y SYNPO2), con diferencias significativas en supervivencia en el subgrupo de intermedio y mal pronóstico (210). En otro estudio con 74 pacientes con TCGNS de entrenamiento en estadios avanzados y 34 TCGNS de validación, se obtuvo un modelo de expresión génica de diez genes (STX6, CFLAR, FNBP1, ITSN2, SYNE1, MAP3K5, PTGDS, PXMP2, IRAK4, RABGAP1L) relacionados con la supervivencia con una exactitud predictiva de 0.66 (207).

Al revisar la literatura publicada, el único marcador de riesgo de recaída desde el punto de vista biomolecular, que parece relacionarse con el riesgo de recaída en los pacientes con TCGT en estadios iniciales o con la existencia de células tumorales activas residuales en estadios avanzados, es

el microARN 371 en plasma, pero sin embargo, los datos provienen de análisis de subgrupos a partir de estudios de pacientes con tumores de células germinales incluyendo todos los estadios y subtipos histológicos (211).

Como observamos, se han publicado resultados sobre la utilidad de firmas génicas en la predicción de los pacientes de peor pronóstico una vez recibido tratamiento quimioterápico, permitiendo seleccionar aquellos que apenas responderán, en los que se necesitarían terapias más agresivas. Sin embargo, hasta el momento no existe en la literatura un estudio exhaustivo en poblaciones con TCGNS testiculares estadio I que diferencien las alteraciones biomoleculares que puedan existir entre aquellos pacientes que recaen y los que no, permitiendo identificar aquellos pacientes en los que el seguimiento activo sería la mejor opción tras la orquiectomía.

En nuestro estudio realizamos el análisis de expresión génica diferencial de 54 pacientes con TCGNS estadio I sin quimioterapia adyuvante tras orquiectomía, incluyendo pacientes con y sin recaída, con el objetivo de encontrar un conjunto de genes que nos permita predecir el riesgo de recaída con mayor exactitud que los factores clinicopatológicos clásicos usados para decidir si recibir o no un tratamiento adyuvante. Debido a que los modelos estadísticos tradicionalmente usados, basados en datos demográficos y clínicos del historial del paciente, son muy limitados en cuanto a capacidad predictiva, una gran cantidad de estudios recientes apuntan a una mejora sustancial utilizando datos de expresión genética obtenidos a través de análisis de chips (microarrays) de ADN. La dificultad fundamental de este tipo de análisis en casos clínicos es la conocida maldición de la dimensión, “curse of dimensionality” (212), el problema en aprendizaje automático que resulta de tener un reducido número de observaciones (casos) y un alto número de variables predictoras (marcadores resultado del análisis de chips). Cuando esto sucede, los modelos tienden a generalizar mal, ofreciendo resultados muy buenos en el conjunto de datos del estudio pero con resultados poco extrapolables a la



población en general. Este fenómeno es conocido como sobreaprendizaje u “overfitting”. Concretamente en nuestro estudio realizamos el análisis de expresión diferencial del modelo PanCancer, que incluye 730 genes de las principales rutas canónicas del cáncer: MAPK, STAT, PI3K, RAS, Notch, Hedgehog, ciclo celular, apoptosis, Wnt, reparación de daños del ADN, regulación transcripcional, modificación de la cromatina y TGF- β (figura 12). En el **anexo 2** se recogen los 730 genes analizados con el modelo PanCancer. La solución típica del sobreaprendizaje es reducir el número de predictores seleccionando aquellos que son más relevantes (selección de características) o generar un número reducido de variables alternando los marcadores originales mediante ciertas transformaciones (extracción de características).

Aunque las técnicas de extracción ayudan a solucionar el problema de la dimensionalidad, no permiten aislar genes concretos y dificulta la interpretabilidad. Por esta razón, se empleó en este estudio un método de selección de características adaptado al conjunto reducido de observaciones con que contamos, para así identificar aquellos genes con más influencia en la posibilidad de recaída e incluso poder sugerir un posible orden de importancia para los mismos (213).

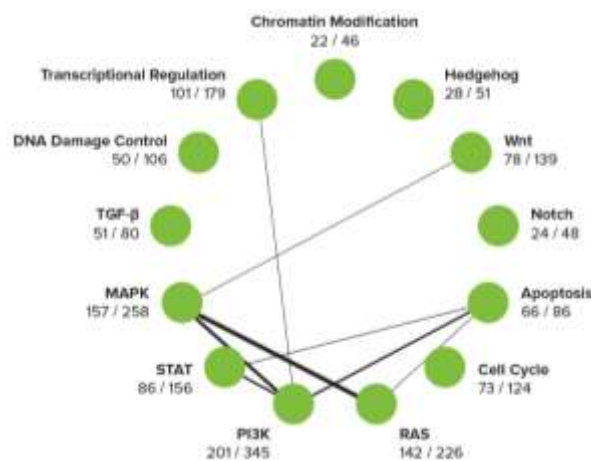


Figura 12. Vías de señalización incluidas en el panel PanCancer de nanostring. Cada uno de los círculos representa una de las trece rutas canónicas del cáncer, reflejando en cada uno de ellos el número de genes incluidos en este panel respecto al total de genes reconocidos para dicha vía según las fuentes de datos públicos disponibles (KEGG). Las líneas muestran, según su grosor, el número de genes que forman parte de distintas vías simultáneamente (7).

Actualmente se conoce que en cada tumor existen entre 2 y 8 mutaciones en genes dianas que regulan la actividad de las vías moleculares principales, por lo que es fundamental para conocer la biología subyacente de cada tumor conocer las alteraciones que ocurren en las vías de señalización canónicas del cáncer (214). Respecto al modelo de genes de PanCancer, para la identificación del conjunto principal de genes se usaron diferentes criterios de selección, que permitió incluir:

- 125 genes conocidos que participan en la tumorigénesis (215).
- 127 genes que participan en al menos tres de las vías tumorigénicas principales.
- 50 genes con expresión diferencial conocida entre los pacientes con tumor y pacientes controles sanos, obtenidos a través de TCGA (The Cancer Genome Atlas) (<http://cancergenome.nih.gov/>).
- 75 genes identificados como “key members” en la tumorigénesis.
- El resto de genes se identificó a través de un programa estadístico, seleccionando aquellos genes que permitían explicar la mayor variabilidad en la expresión génica de cada vía, de forma que no sólo fuesen genes con alta variabilidad en su expresión sino que también estuviesen implicados en la expresión génica de otros genes (7).

Las trece rutas canónicas del cáncer incluyen:

1. *Vía de señalización Notch*

Esta vía tiene un papel importante en múltiples etapas del desarrollo celular como son la proliferación, crecimiento, diferenciación, migración y apoptosis celular. Participa en el mantenimiento de las células precursoras indiferenciadas, siendo fundamental en el desarrollo embrionario, maduración de las células T en el timo y destino celular (216,217). En la epidermis, la vía Notch tiene un papel opuesto favoreciendo la diferenciación de los queratinocitos y reduciendo la proliferación celular (218,219).

La unión de la proteína Notch con su ligando provoca la liberación del dominio intracelular, permitiendo la translocación al núcleo y unión a la

proteína CSL de unión al ADN, desplazando así el complejo histona desacetilasa correpresor de CSL, provocando finalmente la activación transcripcional de los genes de la vía Notch.

2. Vía de señalización APC (Wnt)

La vía de señalización Wnt tiene un papel esencial en la remodelación ósea, ejerciendo un papel clave en la proliferación, diferenciación y apoptosis del osteoblasto. A partir de ahí, que tenga una gran importancia en el metabolismo óseo y patología ósea (220). Las proteínas secretadas por esta vía provocan la activación de tres vías intracelulares: vía de la β -catenina, vía del calcio y vía de polaridad celular planar.

El efecto principal de la unión del ligando Wnt a su receptor es la estabilización de la β -catenina citoplasmática inhibiendo su degradación, permitiendo su translocación al núcleo y la activación de genes regulados por Wnt.

La vía de señalización Wnt-calcio, mediada por proteínas G y fosfolipasas, provoca aumentos en el calcio libre citoplasmático activando la proteína quinasa C, CAMKII y la calcineurina fosfatasa.

La vía de la polaridad celular planar conduce la activación de GTPasas RHOA y RAC1, activando las quinasas de estrés JNK y ROCK que permiten la remodelación del citoesqueleto y cambios en la adhesión y motilidad celular.

3. Vía de señalización Hedgehog (Hh)

Los mamíferos presentan tres genes constituyentes de la vía Hedgehog: Sonic hedgehog (Shh), Indian hedgehog (Ihh) y Desert hedgehog (Dhh). La vía Hh constituye una de las vías más importantes durante el desarrollo embrionario, de hecho los dominios de expresión de uno de sus miembros, Shh, coinciden con la localización de algunos de los centros mejor

caracterizados en el desarrollo embrionario (notocorda y zona de actividad polarizadora de la extremidad) (221–223). Se cree que las proteínas Hh actúan como morfógenos en varios sistemas de desarrollo, como en el desarrollo del sistema nervioso central y en el desarrollo de las extremidades (224–226).

La unión a su ligando, Ptc (Patched), permite su internalización en la célula con el consecuente mantenimiento del gradiente celular, lo cual es importante ya que la diferenciación celular depende de su posición dentro del gradiente (227). Respecto a los testículos, la vía Dhh favorece la diferenciación de las células de Sertoli durante el desarrollo testicular y tiene un papel fundamental regulando el desarrollo celular de la línea germinal (228,229).

También se encuentra relacionada con el mantenimiento y regulación de algunas células madres en el organismo adulto y en el desarrollo de varios tumores (225,230,231). Se ha relacionado con el desarrollo de múltiples neoplasias malignas como tumores del tracto gastrointestinal, meduloblastomas, carcinomas de pulmón de células pequeñas y tumores basocelulares, así como, con la progresión de otros tumores como tumores del sistema nervioso central, piel y próstata (232).

4. *Vía de modificación de la cromatina*

La cromatina es la forma en la que se encuentra el ADN en el núcleo celular. Cada célula de nuestro cuerpo tiene la misma información genética y el mismo conjunto de genes, pero sólo un pequeño subgrupo de genes se transcriben en un momento concreto en una célula determinada. La vía de señalización de la cromatina está regulada por multitud de factores, incluyendo elementos del ADN, interacciones proteína-proteína, origen y estadio celular, así como modificaciones postraduccionales de factores de transcripción e histonas. Esta vía provoca alteraciones en la estructura de la cromatina y con ello en la expresión genética.

La información genética codificada en nuestro ADN se encuentra empaquetada en los nucleosomas que forman la cromatina. Un nucleosoma contiene unas 146 pares de bases de ADN envuelto alrededor de un octámero nucleosómico (ocho histonas nucleosómicas) compuesto por dos copias de histonas H3, H4, H2A y H2B. Este octámero forma un núcleo proteico alrededor del cual se enrolla la hélice de ADN, permitiendo el primer paso de compactación del ADN. Las modificaciones de las histonas desempeñan un papel indiscutiblemente importante en la transcripción del ADN. Las histonas contienen una cola aminoterminal flexible, que sobresalen del nucleosoma y que se modifican ampliamente postraduccionalmente (233,234). Las modificaciones en las histonas pueden tener múltiples funciones, como modificaciones en las interacciones proteínas-ADN, proteína-proteína y nucleosoma-nucleosoma y, pueden formar superficies de unión a ciertas proteínas pudiendo conllevar cambios epigenéticos en el ADN (235,236).

5. Regulación transcripcional

La regulación transcripcional es un proceso biológico crítico que permite a la célula o al organismo responder a una variedad de señales intra y extracelulares, definir la identidad celular durante el desarrollo y coordinar la actividad celular. Este mecanismo altamente dinámico requiere gran cantidad de factores moleculares que establecen grandes redes e interacciones específicas ADN-proteína, así como, la formación de complejos nucleoproteicos (237).

La alta complejidad de la regulación transcripcional también deriva de la participación de ARN no codificantes (ARNnc). De hecho, en las últimas dos décadas se ha descubierto nuevos tipos de ARNnc, como microARN (miARN), ARN pequeño nucleolar (ARNsno), ARN no codificante largo (ARNlnc), ARN circular (ARNcirc) y ARN potenciador (ARNe), cada uno con diferentes funciones reguladoras y que en conjunto pertenecen a la gran y compleja red de comunicación del ARN que controla en última instancia la producción proteica (238).

6. *Vía de control del daño del ADN*

Con el fin de asegurar una adecuada duplicación y herencia del material genético, las células tienen la capacidad de detectar los daños en el ADN, así como, activar esta vía, provocando respuestas celulares que incluyen la detección del ciclo celular, reparación del ADN, senescencia y apoptosis. La disregulación de los componentes implicados en estos pasos contribuye a la inestabilidad genómica, favoreciendo la tumorigénesis, de hecho las mutaciones en las proteínas que juegan un papel en la respuesta al daño del ADN predisponen al desarrollo del cáncer (239).

Las lesiones del ADN desencadenan la activación de varias quinasas, que constituyen los transductores primarios de esta cascada de señalización. Destacan los miembros de la familia PIKK (phosphoinositide - 3 – kinase – related protein kinase): ATM, ATR y DNA-PKcs. Mientras que ATR se activa generalmente ante daños en el ADN producidos en una sólo hebra y en horquillas de replicación, ATM (fundamentalmente) y DNA-PKcs suelen activarse por roturas de doble hebra del ADN (240).

Las distintas interacciones y modificaciones entre proteínas, incluyendo fosforilación, ubiquitinación, metilación, acetilación y sumoilación, permiten activar la vía de señalización de daño del ADN, permitiendo detener el ciclo celular y reparar el ADN, o bien, provocar apoptosis y senescencia (241). Un reciente estudio identificó más de 700 proteínas fosforiladas en respuesta al daño del ADN (242), lo que indica una gran red de interacciones proteicas secundaria a la modificación postraducciona.

Los sistemas proteolíticos intracelulares detectan y degradan las proteínas que se encuentran lesionadas o mal plegadas. La vía de la ubiquitina proteosoma está implicada en el recambio de las proteínas a nivel intracelular, jugando un papel clave en la degradación de proteínas reguladoras de vida corta, las cuales están implicadas en varios procesos celulares como son la regulación del ciclo celular, la modulación de los receptores de superficie y de canales iónicos, el procesamiento y presentación de antígenos, así como, la activación de factores de transcripción. Esta vía usa una cascada enzimática por la cual moléculas de ubiquitina pueden insertarse covalentemente a la proteína sustrato. El

reconocimiento del sustrato por una de las ubiquitina ligasas lleva a la poliubiquitinación o señal de degradación. Esta modificación mediante poliubiquitinación señala a la proteína para su destrucción y la conduce al complejo proteosoma para la degradación proteica. La sumoilación es un proceso similar a la ubiquitinación, pero en este caso la proteína se une covalentemente a otra pequeña proteína de unos 100 aminoácidos, estando implicado en diversos procesos celulares como la regulación transcripcional (generalmente inhibición), ciclo celular y apoptosis, estabilidad de las proteínas y tránsito intracelular e intranuclear.

7. Vía TGF- β

La vía de señalización TGF- β controla diversos procesos celulares como la proliferación, diferenciación, transición epitelio-mesénquima, apoptosis y migración celular. Interacciona con múltiples vías de señalización como Wnt, Hippo, EGFR/RAS y PI3K/AKT. Desde el punto de vista oncológico, tiene un papel dependiente del contexto de forma que en células premalignas actúa como supresor tumoral y en etapas más avanzadas del cáncer promueve la invasión y metástasis (promoviendo la transición epitelio-mesénquima al aumentar los marcadores mesenquimales, como N-cadherina y vimentina, y disminuir la expresión de marcadores epiteliales, como E-cadherina) (243–247).

La señalización de la vía TGF- β tiene lugar a través del complejo receptor transmembrana, constituido por el receptor tipo I y tipo II de serina/treonina (*figura 13*). La activación del receptor tipo I de TGF- β favorece la fosforilación de SMAD2/3 (R-SMAD), también conocidos como reguladores o asociados al receptor. SMAD2/3 fosforilado forma heterooligómeros con SMAD4, permitiendo en el núcleo regular la expresión de genes diana. SMAD6 y SMAD7, son conocidos como I-SMADs al jugar un papel en la inhibición de la vía TGF- β a través de múltiples mecanismos. SMAD6/7 pueden competir con R-SMAD en los receptores tipo I y evitar la fosforilación y activación de R-SMAD, además, SMAD7 puede favorecer la ubiquitinación y degradación del receptor tipo I a través del reclutamiento de las ligasas E3 SMURF1 y SMURF2 (248,249). FAF1 desestabiliza al

receptor tipo II de TGF- β en la superficie celular, limitando la respuesta excesiva de la vía TGF- β .

Los receptores TGF- β pueden activar también otras vías de señalización no SMAD, a través de la fosforilación o interacción directa con intermediarios de señalización, como la vía PI3K/AKT/TOR, Erk, p38 y MAPK e infraexpresión de intermediarios de señalización GTPasa tipo Rho (250,251).

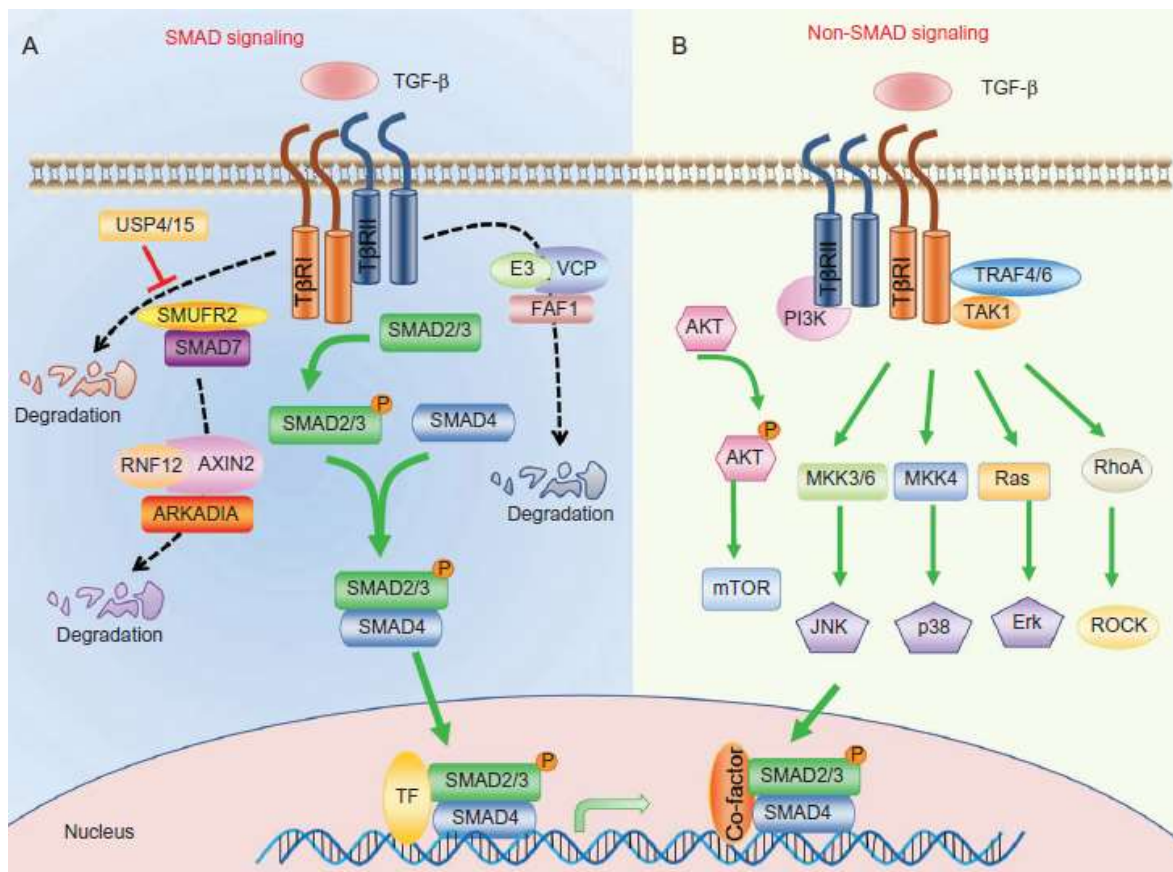


Figura 13. Representación la vía de señalización TGF- β , mediada por las proteínas SMAD (izquierda) y no SMAD (derecha) (252).

8. Vía MAPK/ERK

La vía MAPK/ERK (mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated) está estrechamente regulada por las fosfatasa y por la interacción con otras vías como AKT/mTOR. Puede actuar tanto como supresor tumoral como protooncogénico, según la intensidad de la señal y el

contexto en el que se activa. Constituye una vía clave en la supervivencia y diseminación de las células tumorales, así como en la resistencia a fármacos diana (253). En la regulación de esta vía influyen numerosos estímulos, como son el estrés metabólico, la vía de señalización de daño del ADN, las alteraciones en las concentraciones de proteínas, la señalización de factores de crecimiento, las interacciones célula-matriz extracelular y la comunicación intercelular (254).

Existen cuatro vías independientes MAPK: familia MAPK/ERK o vía clásica, BMK-1 (Big Map Kinase-1), JNK (c-Jun Nterminal kinase) y vía p38 (255). Generalmente estas quinasas se denominan según su cercanía al núcleo, de mayor o menor: MAPKKK (MAPK kinase-kinase), MAPKK (MAPK kinase) y MAPK.

La vía de señalización canónica MAPK/ERK está compuesta por tres tipos de MAPKKK: quinasas A-RAF, B-RAF y RAF-1 o C-RAF. BRAF es el gen más comúnmente mutado en la vía MAPK en las neoplasias en humanos. A continuación encontramos, las quinasas MAPKK, compuestas por MEK1 y MEK2, y finalmente encontramos ERK1 y ERK2, efectores finales de la vía MAPK (256) (*figura 14*). La fosforilación de ERK resulta en la activación de múltiples sustratos responsables de la estimulación del ciclo celular.

1. Vía STAT

Esta vía de señalización tiene distintos papeles, algunos de ellos no superpuestos a otras vías. Las proteínas STAT son claves en la vía del interferón (IFN), de forma que la disrupción o deficiencia de estas proteínas lleva a la incapacidad de responder a IFN con la subsiguiente susceptibilidad a infecciones.

Las proteínas STAT participan en la transformación celular y oncogénesis. Durante los múltiples pasos de la tumorigénesis, las células pierden su habilidad normal para detectar y reparar el ADN dañado, así como, para regular la progresión del ciclo celular y apoptosis. Paralelamente adquieren

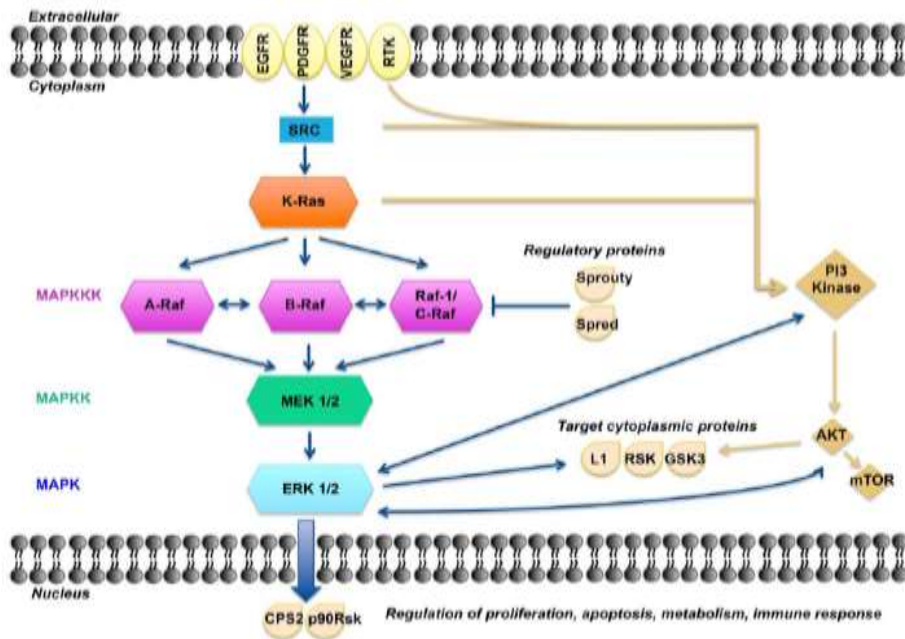


Figura 14. Vía de activación de la vía MAPK/ERK. La activación del receptor transmembrana recluta proteínas RAS que conducen finalmente a la activación de ERK. Las fosfatasas reguladoras (Sprouty y Spred) modulan la intensidad de la señal. La vía PI3K/AKT interacciona con la vía MAPK/ERK en condiciones normales y en células cancerosas, así como con proteínas citoplásmicas diana como RSKs (ribosomal S6 kinases), GSK3 (glycogen synthasekinase 3) y L1 (adhesión molecule L1). Finalmente en el núcleo se activan proteínas reguladoras de la proliferación, apoptosis, metabolismo y respuestas inmune como CPS2 (copalyl diphosphate synthase 2) y p90Rsk (90-kDa ribosomal protein S6 kinase) (257).

patrones alterados en la señalización de los factores de crecimiento, angiogénesis e invasión. A pesar de que no se conoce que las proteínas STAT participen en la regulación directa del ciclo celular o reparación del ADN dañado, pueden contribuir a la tumorigénesis a través de su íntimo contacto con la vía de factores de crecimiento, apoptosis, angiogénesis y sistema inmune, comprometiendo la supervivencia inmune y favoreciendo el desarrollo tumoral (258).

2. Vía PI3K

PI3K (Phosphoinositide 3-kinases) es una familia de proteínas que participa en la regulación del ciclo celular, metabolismo, proliferación, homeostasis de la glucosa y tráfico de vesículas (259).

El gen supresor tumoral PTEN es un regulador negativo de la vía PI3K, principal regulador del crecimiento, metabolismo y supervivencia celular. La vía PI3K tiene una gran cantidad de reguladores, cuyas alteraciones pueden dar lugar a diferentes patologías, incluyendo síndromes familiares, disfunciones metabólicas y cáncer. La vía PI3K no está limitada a la activación de la vía AKT/mTOR, sino que también participa en la regulación de otras vías (*figura 15*), como la vía RAS-MAPK.

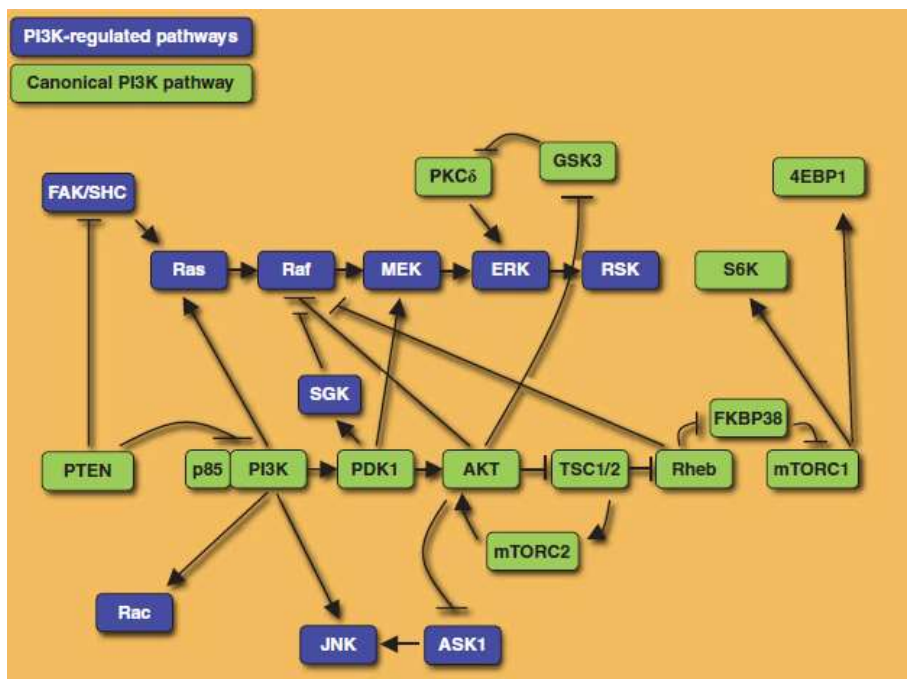


Figura 15. Vías reguladas por PI3K. En verde se representa la cascada de activación de la vía de señalización PI3K. En azul se representan las vías que se encuentran bajo el control de la vía PI3K (260).

La vía PI3K se puede regular tanto por factores transcripcionales como post-transcripcionales. El factor de transcripción PTEN está regulado en las células neoplásicas por RAS y JNK, llevando a la progresión tumoral (261–263). La sobreexpresión anómala de RAS promueve la inhibición de PTEN dependiente de MAPK (263). La infraexpresión de PTEN vía MAPK permite el escape de la apoptosis a través de la sobreexpresión celular de RAS.

También la infraexpresión de PTEN se ha relacionado con la sobreexpresión de MKK4, regulador JNK (figura 16).

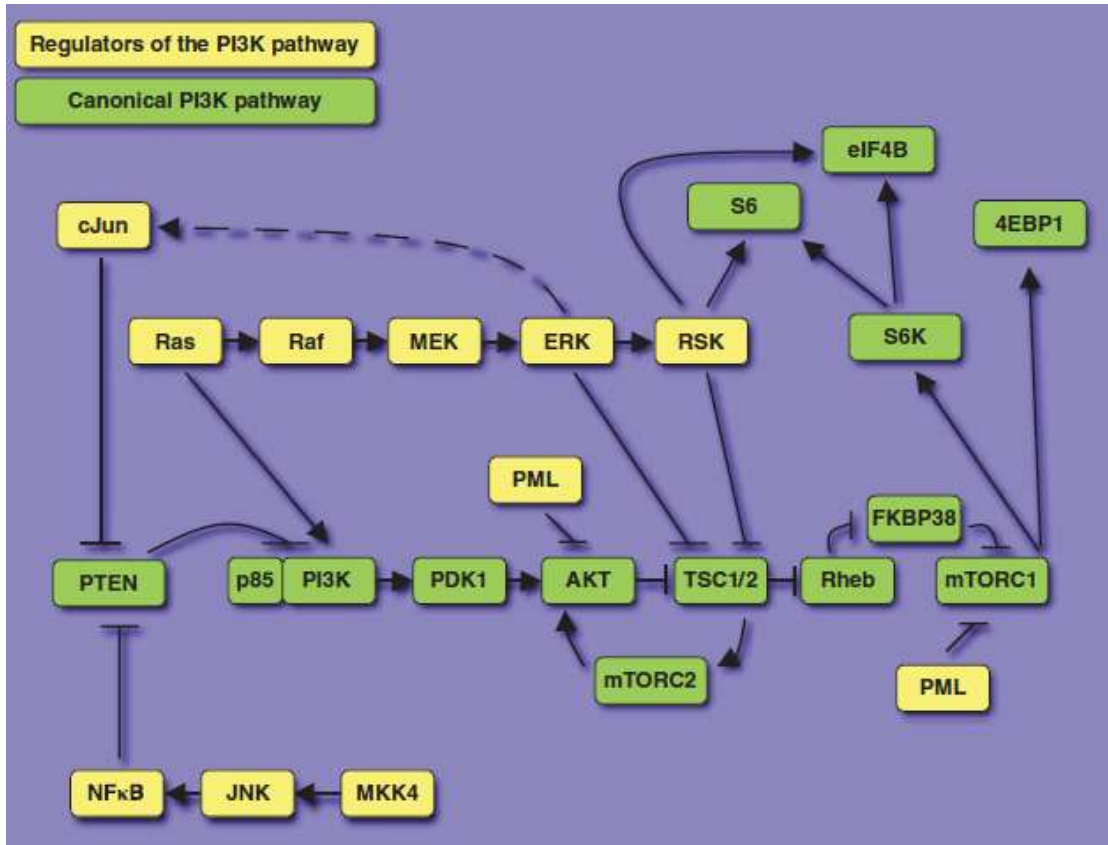


Figura 16. Vías que regulan la señalización PI3K. La vía PI3K se encuentra representada en verde y las vías que la regulan en amarillo (260).

3. Vía RAS

Los genes RAS constituyen una familia de oncogenes, constituida por tres genes: H, K y N-ras, expresados en todos los tipos celulares en distintas proporciones. Estos genes codifican cuatro proteínas (H-Ras, K-Ras4A, K-Ras4B y N-Ras) que se pueden encontrar unidas a GDP, inactivas, o bien unidas a GTP, activas. En condiciones normales este ciclo de activación - desactivación está regulado por dos proteínas: factores de intercambio y proteínas GAPs (proteínas activadoras de la actividad GTPasa de Ras). Las proteínas Ras oncogénicas, pierden la sensibilidad a GAPs y por tanto se mantienen siempre unidas a GTP y, por ende, constitutivamente activadas.

Las proteínas Ras se encargan de regular gran cantidad de funciones celulares como la supervivencia, proliferación y diferenciación celular, y permiten activar varias vías de señalización intracelular, como Raf, PI3K y factores de intercambio de nucleótidos (264). La ruta RAS-ERK es la ruta de trasducción de señales probablemente mejor estudiada y conocida (*figura 17*).

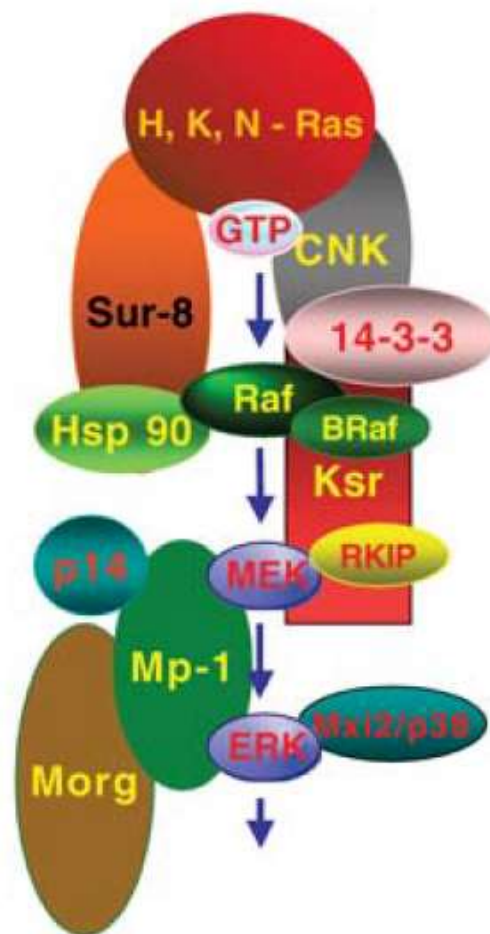


Figura 17. Vía de transducción de señales RAS-ERK. También se representan las proteínas principales que participan en la regulación de esta vía (265).

4. Ciclo celular

El ciclo celular es un conjunto ordenado de procesos, por el que la célula crece y se divide en dos células hijas. En las células eucariotas, el ciclo celular se divide en dos fases importantes: durante la interfase la célula crece y realiza una copia de su ADN y en la fase mitótica la célula separa las dos copias de su ADN y el citoplasma para formar las dos células hijas. En la

interfase existen a su vez varias fases: fase G1, donde la célula crece, fase S donde se duplica el ADN y el centrosoma, y fase G2 donde la célula se organiza para la mitosis (*figura 18*). Algunas células se dividen lentamente o directamente no se dividen, pudiendo salir de la fase G1 y entrar en un estado de reposo, denominado fase G0.

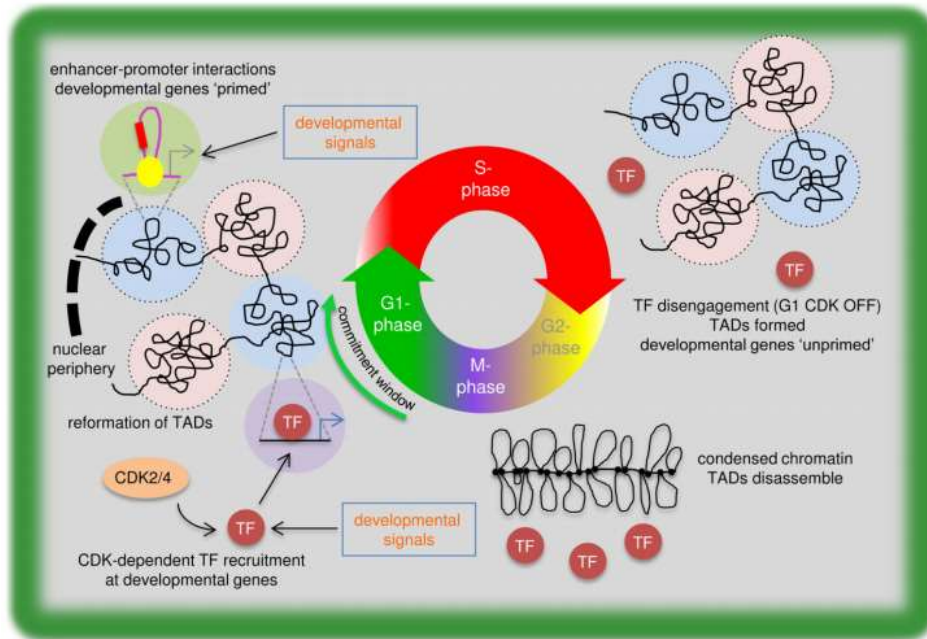


Figura 18. Representación del ciclo celular. CDK2/4: cyclin-dependent kinase activities; TF: transcription factors; TADs: topologically associating domains (266).

5. Apoptosis

La apoptosis es la muerte celular programada, con el fin de controlar el desarrollo y crecimiento celular. Tiene un papel importante eliminando aquellas células dañadas y la proliferación celular indiscriminada en prevención de situaciones patológicas, como el cáncer.



II.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS





HIPÓTESIS

La hipótesis de este trabajo es que existe una expresión diferencial de genes relacionados con la recaída que permite seleccionar, con mayor sensibilidad y especificidad que los parámetros histopatológicos usados hoy día, a aquellos pacientes con TCGNS estadio I tratados exclusivamente con orquiectomía con alto riesgo de recaída y, por tanto, candidatos a un tratamiento quimioterápico adyuvante, permitiendo evitar la toxicidad aguda y a largo plazo de un tratamiento adyuvante en el subgrupo de menor riesgo.

OBJETIVOS

1. OBJETIVOS PRINCIPALES

- Determinar la expresión diferencial de los genes implicados en las trece rutas canónicas del cáncer en los pacientes con TCGNS estadio I sometidos a orquiectomía sin quimioterapia adyuvante, con y sin recaída.
- Encontrar un perfil o firma de expresión génica que permita identificar aquellos pacientes con TCGNS estadio I con mayor riesgo de recaída, los cuales se beneficiarían de un tratamiento adyuvante, permitiendo así evitar el sobret ratamiento en una proporción significativa de pacientes.

1. OBJETIVO SECUNDARIO

- Revisión bibliográfica sobre la utilidad de terapias dianas en pacientes con tumores de células germinales.



III. MATERIAL Y MÉTODOS





REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA “TERAPIAS DIANA EN PACIENTES CON TUMORES GERMINALES”

Inicialmente se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica sobre terapias diana en pacientes con tumores de células germinales. Se usó para ello la base de datos pubmed. Se seleccionó todo tipo de publicación en español e inglés, sin límite de fecha de publicación. Se llevó a cabo una búsqueda avanzada con los siguientes buscadores: “germ cell tumors” or “testicular tumors” and “targeted therapy”, obteniendo ochenta y ocho publicaciones de las que se seleccionaron setenta y una publicaciones.

A raíz de la minuciosa revisión de estas publicaciones, se concluye que hasta la fecha ninguna terapia diana ha demostrado en pacientes con tumores de células germinales una razonable efectividad, poniendo de manifiesto la importancia de centrarnos en los pacientes en estadios iniciales para disminuir el riesgo de recaída y la probabilidad de que formen parte del pequeño grupo de pacientes metastásicos sin opciones curativas. Esta revisión está publicada recientemente en la revista *Critical Reviews in Oncology/Hematology* con el título “*Targeted treatment approaches in refractory germ cell tumors*” con un índice de impacto de 5.012 (6). A partir de aquí comenzó el estudio en pacientes con TCGNS estadio I sin tratamiento adyuvante para detectar aquellos con mayor riesgo de recaída basado en la expresión génica de los genes implicados en las principales rutas canónicas del cáncer.

ESTUDIO DE EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL EN PACIENTES CON TCGNS ESTADIO I

1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Para la realización de este estudio retrospectivo, se seleccionaron 54 pacientes con diagnóstico de tumor de células germinales de testículo, no seminoma, en estadio I que no habían recibido quimioterapia adyuvante tras la orquiectomía, desde el 01/04/1994 al 27/02/2017. El estudio fue coordinado por la Unidad de Gestión Clínica Intercentros de Oncología Médica de Málaga, de los Hospitales Universitarios Virgen de la Victoria y Regional Carlos Haya, con la participación de centros asociados al Grupo Español de Tumores Germinales.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Pacientes con tumor de células germinales no seminoma de testículo, sometido a orquiectomía.
- No quimioterapia adyuvante.
- Estadio I (sin evidencia de enfermedad en el estudio de extensión radiológico con normalización de los marcadores tumorales tras la orquiectomía).
- Descripción histológica del subtipo histológico de tumor germinal testicular no seminoma.
- Disponibilidad de los datos clínicopatológicos de los pacientes.
- Seguimiento durante al menos dos años en el caso de los pacientes sin recaída.
- Disponibilidad de muestras de biopsia sólida embebidas en parafina del tumor primario.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Haber recibido quimioterapia adyuvante tras orquiectomía.
- Seguimiento inferior a dos años tras orquiectomía, en el caso de los pacientes sin recaída. En los pacientes con recaída se permitía cualquier número de meses de seguimiento tras la fecha de la recaída.

- No disponibilidad de material anatomopatológico suficiente para el estudio genético.
- Pacientes que rechazasen participar en el estudio tras explicarle detalladamente en qué consistía el estudio, objetivo del mismo y resuelto las dudas oportunas.

De los 54 pacientes incluidos:

- Veintiséis (48%) eran pacientes con recaída, es decir, pacientes que habían recaído con la aparición de enfermedad a distancia (fuera del testículo contralateral) y sin incluirse el diagnóstico de segundos tumores testiculares.
- Veintiocho (52%) eran pacientes sin recaída, es decir, pacientes que no habían recaído tras al menos dos años de seguimiento.

Los pacientes fueron reclutados fundamentalmente de hospitales de la provincia de Málaga, así como de diversos centros a nivel nacional. De los pacientes con recaída, cinco (5/26) procedían del Hospital La Fe de Valencia, dos (2/26) del ICO-L'Hospitalet de Barcelona, seis (6/26) del Hospital Universitario Regional Carlos Haya de Málaga, cinco (5/26) del Hospital Universitario Son Espases de las Islas Baleares, tres (3/26) del Hospital Santa Lucía Cartagena de Murcia, uno (1/26) del Hospital Morales Meseguer de Murcia, uno (1/26) del Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga y tres (3/26) del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba. De los pacientes sin recaída, dieciocho pacientes (18/28) procedían del Hospital Universitario Virgen de la Victoria, cinco (5/28) del Hospital Universitario Regional Carlos Haya, uno (1/28) del Hospital Costa del Sol de Málaga, dos (2/28) del Hospital Morales Meseguer y dos (2/28) del Hospital Comarcal la Axarquía de Málaga.

a. Consentimiento informado

El tratamiento de los datos de carácter personal se realizó de acuerdo a la normativa vigente del RD 223/2004 del 6 de Febrero y la Ley Orgánica 15/1999 del 13 de Diciembre sobre protección de datos de carácter personal.

Tras la adecuada información sobre el estudio por parte del oncólogo, todos los pacientes vivos diagnosticados en 2007 o fecha posterior dieron su consentimiento informado para poder usar sus datos de forma anónima, así como, para poder realizar el análisis de expresión en el bloque tumoral representativo de la lesión. Debido al carácter retrospectivo del estudio, no se obtuvo el consentimiento de aquellos pacientes que habían fallecido. El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Coordinador de Ética de la Investigación Biomédica de Andalucía (que se adjunta en el anexo 3). La información clínica fue recogida del historial médico del paciente por personal con entrenamiento y dedicación específica. El análisis genético se realizó por personal independiente, sin acceso a la información clínica de los pacientes.

En el **anexo 3** se adjunta el documento que acredita la aprobación del estudio por el Comité Coordinador de Ética de la Investigación Biomédica de Andalucía.

En el **anexo 4** se adjunta el modelo de consentimiento informado para este proyecto.

2. MÉTODOS

a. Obtención y procesamiento de las muestras

Durante el primer año de trabajo fueron identificados todos los pacientes incluidos en el estudio y seleccionados los bloques de tumor de TCGNS estadio I representativos de la lesión, fijados en formol e incluidos en parafina (FFPE). Todos los bloques tumorales procedían de la pieza quirúrgica de la orquiectomía. Los casos de pacientes intervenidos en la

provincia de Málaga, fueron solicitados y cedidos por la Unidad de Biobanco de IBIMA (Instituto de Investigación Biomédica de Málaga). En el caso de los distintos hospitales que participaron en este proyecto, el material solicitado fue el estrictamente necesario, de modo que no hubo ningún excedente y no fue necesario ningún plan de contingencia.

Una vez identificadas las muestras, en cada uno de los hospitales colaboradores, se realizó una tinción de hematoxilina-eosina a partir de la cual el patólogo delimitó la zona correspondiente al tumor. Esta zona se microdisseccionó manualmente, obteniendo 6 cortes de 10µm de grosor. Estos cortes se enviaron por mensajería al Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer ubicado en el Centro de Investigaciones Médico Sanitarias (CIMES) de la Universidad de Málaga (UMA)), donde se llevó a cabo la extracción, purificación y cuantificación del ARN total de las muestras (*figura 19*). La extracción del ARN de las muestras se llevó a cabo a partir de estos cortes con el kit RNeasy FFPE (Qiagen). Posteriormente se determinó la concentración y calidad del ARN purificado con el espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific). El ARN se cuantificó y se almacenó a -80°C en alícuotas de un solo uso.

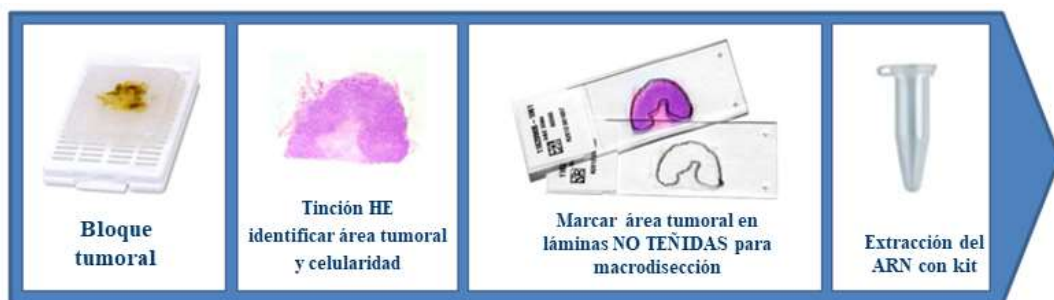


Figura 19. Representación de los pasos del procesamiento de las muestras: obtención del bloque tumoral, tinción hematoxilina-eosina para identificar el área tumoral, marcaje del área tumoral en áreas no teñidas para la macrodissección y extracción del ARN.

Previo al procesamiento del ARN, se seleccionó las muestras de ARN que pasaban el criterio de calidad de Nanostring (concentración ≥ 12.5 ng/µL

y ratio A260/280 de 1.7-2.3, medido con Nanodrop). El ARN se procesó siguiendo las recomendaciones y pautas del fabricante.

b. Estudio de expresión génica

Para el estudio de expresión génica se ha utilizado el sistema nCounter™ de Nanostring, basado en el contaje digital de moléculas de ARN, de manera automática y con capacidad para estudiar en una misma reacción hasta 800 dianas de interés.

Es una metodología fundamentada en la hibridación, sin amplificación previa, donde cada molécula diana se va a identificar por un código o combinación de seis fluorocromos de cuatro colores diferentes. La secuencia génica problema hibridará con dos sondas: una sonda de captura que está unida a biotina y una sonda reporter unida a la combinación de los seis fluorocromos.

Concretamente en este trabajo se ha empleado el panel nCounter™ PanCancer Pathways (Nanostring). Este panel incluye 730 genes esenciales directamente relacionados con las 13 rutas canónicas principales que gobiernan el proceso de transformación en cáncer, incluyendo genes claves relacionados con los procesos de proliferación celular, apoptosis, inestabilidad genómica y transición epitelio-mesénquima.

El proceso ha consistido en la hibridación de ARN, tras lo cual se prepararon las muestras para poder realizar el contaje digital de los genes objeto de estudio.

Las muestras se hibridaron con las sondas reporter y de captura incubándose a 65°C toda la noche en una placa térmica, concretamente un termociclador, tiempo tras el cual las muestras se transfirieron a la estación de preparación o PrepStation. En esta, se eliminaron los excesos de sonda sin hibridar, se purificaron las muestras y se produjo la unión de las sondas

hibridadas al cartucho. Las moléculas inmovilizadas fueran sometidas a un campo eléctrico para su posterior alineamiento.

Finalmente, en el módulo Digital Analyzer o estación de análisis digital, se colocaron los cartuchos para realizar el conteo directo de los códigos de barras asociados a los ARN mensajeros (*figura 20*).

El sistema dispone de un software libre para el análisis de los datos resultantes, el nSolver Analysis Software (versión 5). El panel PanCancer Pathways incorpora 40 genes de normalización (“housekeeping genes”), que fueron seleccionados de los estudios de expresión génica del TCGA (The Cancer Genome Atlas), tras demostrar su representatividad en diferentes tipos de cáncer. El método de ajuste de p-value fue por el método de Bonferroni. Se usó este software para la normalización de los datos y para realizar los controles de calidad necesarios para asegurar que no había habido ningún problema durante el análisis y que los resultados obtenidos se ajustaban a la realidad de estos tumores.



Figura 20. Visión general del análisis de expresión génica con nCounter™.

1) Esquema de la sonda portadora del objetivo específico (target-specific reporter probe) y la sonda de captura (target-specific capture probe). Proceso de hibridación a 65°C durante 12-21 horas en placa térmica.

2) Estación de preparación de muestras donde se eliminan los excesos de sondas y se alinean en el cartucho los híbridos (sonda + ARN diana).

3) Estación de análisis digital, donde se procede al conteo digital de moléculas (267).

c. Análisis de los datos

i. Estudio descriptivo

Se recogieron las siguientes variables clinicopatológicas de cada uno de los pacientes:

- Número de identificación del paciente.
- Hospital de referencia. Variable categórica.
 - o Hospital Universitario Virgen de la Victoria, de Málaga.
 - o Hospital Universitario Regional Carlos Haya, de Málaga.
 - o Hospital Costa del Sol, de Málaga.
 - o Hospital Comarcal la Axarquía, de Málaga.
 - o Hospital La Fe, de Valencia.
 - o ICO-L`Hospitalet, de Barcelona.
 - o Hospital Universitario Reina Sofía, de Córdoba.
 - o Hospital Universitario Son Espases, de las Islas Baleares.
 - o Hospital Santa Lucía Cartagena, de Murcia.
 - o Hospital Morales Meseguer, de Murcia.
- Oncólogo responsable.
- Fecha de nacimiento.
- Fecha del diagnóstico.
- Fecha de la orquitectomía (coincidente con la fecha del diagnóstico en todos los casos).
- Subtipo histológico. Según las siguientes variables categóricas.
 - o Tumor de células germinales testicular puro. Variable categórica: Sí/No.
 - Carcinoma embrionario. Variable categórica: Sí/No.
 - Teratoma. Variable categórica: Sí/No.
 - Teratocarcinoma. Variable categórica: Sí/No.
 - Tumor yolk sac. Variable categórica: Sí/No.
 - Coriocarcinoma. Variable categórica: Sí/No.
 - o Tumor de células germinales testicular mixto. Variable categórica: Sí/No.
 - Seminoma. Variable categórica: Sí/No.
 - Carcinoma embrionario. Variable categórica: Sí/No.
 - Teratoma. Variable categórica: Sí/No.
 - Teratocarcinoma. Variable categórica: Sí/No.
 - Tumor yolk sac. Variable categórica: Sí/No.

- Coriocarcinoma. Variable categórica: Sí/No.
- Marcadores tumorales: Variable categórica: “elevado / normal”. La categoría “elevado” se refería a la elevación de β HCG, AFP o de ambos marcadores antes de la orquiectomía.
- β HCG antes de la orquiectomía: Variable categórica: “elevado / normal”.
- AFP antes de la orquiectomía: Variable categórica: “elevado / normal”.
- Tamaño tumoral: Variable categórica: “superior o igual/inferior a 4 cm”.
- Infiltración linfovascular: Variable categórica: Sí/No.
- Recaída: Variable categórica: Sí/No.
- Fecha de recaída.
- Localización recaída: Opción de elegir una o varias opciones:
 - 0: sólo elevación de marcadores tumorales.
 - 1: afectación ganglionar retroperitoneal.
 - 2: afectación pulmonar.
 - 3: afectación hepática.
 - 4: afectación ganglionar mediastínica.
- Tipo de tratamiento recibido a la recaída (primera línea).
 - Bleomicina, etopósido, cisplatino (BEP).
 - Etoposido, cisplatino (EP).
 - Bleomicina, gemcitabina, platino (BGP).
 - Bleomicina, vincristina, metotrexato, cisplatino – etopósido, ifosfamida, cisplatino (BOMP-EPI).
- Número de líneas de tratamiento recibido en total (tras la recaída).
- Éxitus: Variable categórica: Sí/No.
- Fecha de éxitus.
- Causa de éxitus: Variable categórica: progresión tumoral / toxicidad / otras.
 - Dentro de la opción “otras” se especificó cuál.
- Comorbilidades: Variable categórica: Sí/No.
- Tipo de comorbilidades del paciente. Variable de texto libre.
- Fecha del último seguimiento.
- Estado del último seguimiento: Variable categórica.
 - Vivo sin enfermedad (VSE).
 - Vivo con enfermedad (VCE).

- Muerto sin enfermedad (MSE).
- Muerto con enfermedad (MCE).

A partir de las variables continuas se analizó la media, mediana, desviación típica y rango. Y a partir de las variables categóricas se analizó la frecuencia y el porcentaje.

Se calculó la edad del paciente al diagnóstico a través de la fecha del diagnóstico menos la fecha de nacimiento.

ii. Estudio de supervivencia

Se crearon las siguientes variables en cada uno de los pacientes.

- Supervivencia libre de progresión (SLP): Definido como el tiempo en meses desde la orquiectomía hasta la recaída tumoral, muerte por cualquier causa o fecha del último control.
- Supervivencia global (SG): definido como el tiempo en meses desde la orquiectomía hasta la muerte por cualquier causa o fecha del último control.
- Supervivencia global causa específica: definido como el tiempo en meses desde la orquiectomía hasta la fecha de muerte por el tumor o fecha del último control.

Para las curvas de supervivencia se utilizó el método de Kaplan-Meier, usando el sistema estadístico SPSS (IBM SPSS Statistics 23) con log rank como estadístico de contraste para comparar los grupos de pacientes con recaída y sin recaída. Se analizó la supervivencia libre de progresión, global y causa específica tanto en la población global, en el grupo con recaída como en el grupo sin recaída.

iii. Redes de coexpresión

Dado que las redes de expresión génica son útiles para describir las relaciones existentes entre genes, posteriormente se llevó a cabo el análisis de redes de coexpresión para determinar cambios en los patrones de los módulos según la condición recaída vs no recaída. En biología molecular, usamos cada vez más las redes para analizar conjuntos de datos de alta dimensión donde los genes corresponden a variables. Dado que las redes de coexpresión aprovechan la asociación estadística, es decir la correlación entre los perfiles de expresión génica, a veces se les denomina redes de dependencia estadística o redes de asociación.

En nuestro análisis de redes de coexpresión, describimos las relaciones entre genes en los pacientes con recaída y sin recaída. Si A representa una matriz dimensional, i un gen y j otro gen distinto, A_{ij} representa la cuantificación de la fuerza de conexión entre el gen i y el gen j . Para una red de coexpresión donde los constituyentes están representados por valores numéricos (como en nuestro estudio con la cuantificación de la cantidad de ARNm (ácido ribonucleico mensajero) de cada gen), A_{ij} es la correlación entre los perfiles de expresión de los genes i y j . De este modo, A_{ij} adquiere un número real entre 0 y 1, dependiendo de la fuerza de conexión entre los genes i y j . Así $A_{ii} = 1$, ya que la relación entre el gen i con sí mismo es máxima.

$$\begin{aligned} 0 &\leq A_{ij} \leq 1, \\ A_{ij} &= A_{ji}, \\ A_{ii} &= 1 \end{aligned}$$

Se definió una medida de significación de cada gen, representado como GS.recurrence, como un vector correlacionado con los genes de la red de forma global. Por ejemplo, para el gen i , GS.recurrence representa la fuerza de correlación del perfil de expresión de dicho gen con el evento (en nuestro caso con la recaída) de forma independiente al resto de genes. Si GS.recurrence es igual a 0, dicho gen no tiene ninguna relación con la recaída. Este grado de significación de cada gen es independiente a la significación estadística de dicha relación, representada como p .GS.recurrence.



El análisis de redes de coexpresión génica puede considerarse una técnica de reducción de datos, la cual consta de las siguientes etapas (*figura 21*) (268,269):

- Determinación de los perfiles de expresión génica de los 730 genes del panel PanCancer en cada uno de los pacientes incluidos.
- Identificación de módulos biológicamente interesantes. La construcción de los módulos se realiza a partir de los datos de expresión, utilizando un procedimiento de agrupamiento jerárquico. Para la determinación de los módulos/clusters de la agrupación jerárquica de los genes, disponemos del método *dynamicTreeCut* y la biblioteca R.
- Representación de los módulos con la significación de los genes constituyentes (GS.recurrence).
- Cuantificación de la conectividad/importancia intramodular de cada gen (representado como MM), como medidas cuantitativas de los miembros del módulo, con la determinación de la significación de dicho valor (representado como p.MM).
- Combinación de la significación de cada gen independiente con la recaída (GS.recurrence) y la medida de la conectividad/importancia intramodular de cada gen (MM), para identificar genes centrales significativos.

El análisis de expresión génica centrado en los módulos/redes de coexpresión de genes ayuda al análisis estadístico de los datos en este estudio, caracterizado por una gran cantidad de variables (genes) en una muestra de pacientes pequeña ($n=54$), centrándose en la relación de una serie de módulos con la recaída.

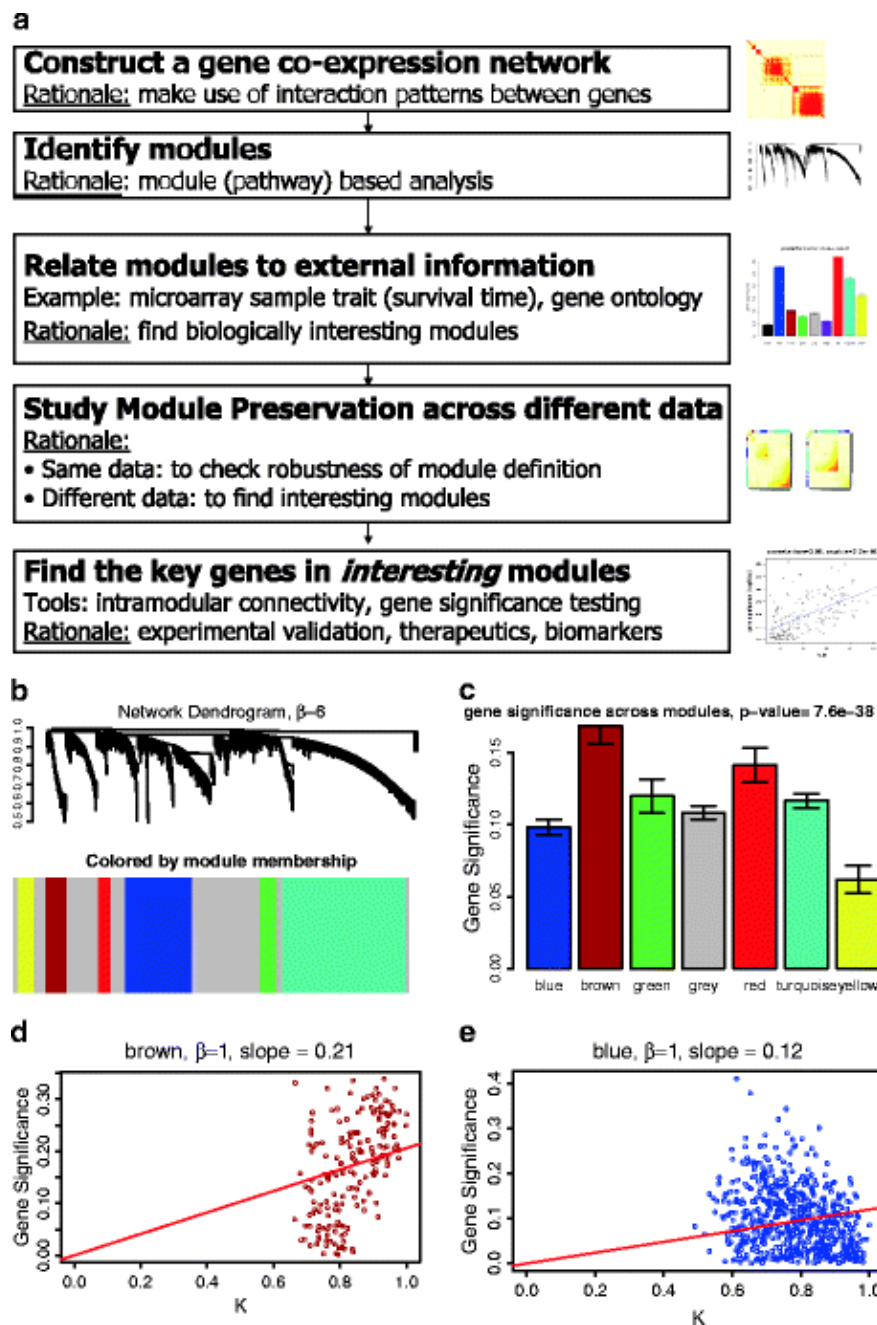


Figura 21. Descripción general del análisis de redes de coexpresión génica, con un ejemplo de tumores del SNC y las redes de coexpresión relacionadas con la supervivencia (270).

a) Diagrama de flujo típico del análisis. El análisis de redes de coexpresión génica tiene como objetivo identificar las redes de coexpresión (módulos) y sus constituyentes (genes).

b) Representa el árbol jerárquico de genes en la redes de coexpresión (figura superior). Aquí los módulos corresponden a ramas del árbol. A cada módulo se le asigna un color (figura inferior).

c) Significación promedio de cada uno de los módulos respecto a la significación pronóstica para el tiempo de supervivencia.

d y e) La imagen d representa el gráfico de dispersión de la significación de los genes (GS.recurrence) que constituyen el módulo marrón (eje Y) respecto a la conectividad / importancia de cada gen dentro del módulo en cuestión (eje X). Lo mismo en la imagen e para el módulo azul. La importancia de cada modelo se basa en la pendiente de la línea roja (en la imagen d) o línea azul (en la imagen e), resultante de un modelo de regresión.

IV. Análisis bioinformático

- Identificación de genes relevantes

La metodología usada se basa en la selección de características de tipo embebido. Se empleó nueve modelos de clasificación diferentes disponibles en Scikit-learn. Estos modelos comparten la existencia de métricas internas de selección de características, clave a la hora de seleccionar los marcadores con mayor capacidad predictiva. La lista de modelos es:

Lasso, Ridge, Gradient Boosting, Random Forest, ExtraTrees, LogisticRegression, SGDC, Passive Aggressive Classifier y SVR.

El conjunto de datos es balanceado con respecto al evento recaída (26 pacientes con recaída frente a 28 pacientes sin recaída), de modo que no hizo falta emplear procedimientos especiales para corregir este sesgo. Como preprocesamiento de la información, se procedió a un escalado y normalizado estándar de la expresión de los marcadores.

Para cada modelo se efectuaron simulaciones con una partición del 70% de datos del conjunto de entrenamiento y un 30% del conjunto de validación. En cada modelo, se entrenó con todos los marcadores (730 genes) y se identificó en cada simulación, mediante métricas propias de cada modelo, los 20 genes de más relevancia. Estos genes eran los seleccionados como importantes en cada modelo y simulación.

Para consolidar los resultados, se efectuó mil simulaciones por cada modelo. A partir de ello se generó un vector de relevancia que asignaba a cada gen un valor de relevancia correspondiente a la proporción de veces que dicho marcador se identificó como importante. Adicionalmente se definió el rendimiento de cada modelo como la mediana del área bajo la curva (AUC), en las mil simulaciones realizadas en cada modelo. Esta métrica es adecuada para evaluar problemas de clasificación equilibrados.

Distintos modelos asignan relevancias diferentes a distintos genes. Ciertas discrepancias entre ellos son esperables, pero es importante definir un método objetivo que permita juzgar cuáles son los genes más relevantes de forma global, independientemente del modelo seleccionado. En este

trabajo, se utilizó dos criterios: uno de unanimidad (el gen es relevante en todos los modelos) y otro de voto mayoritario (al menos la mitad de los modelos lo han considerado relevante).

Para establecer un orden de importancia entre los diferentes marcadores seleccionados se recurrió al método de elevación de umbral progresivo; es decir, se fue considerando los conjuntos de n genes más relevantes de cada modelo y se fue incrementando n . Para cada valor de n se determina qué genes están presentes en todos los conjuntos (criterio de unanimidad) o en la mayoría de ellos (criterio de voto mayoritario).

- Mejoras en predicción

Una vez identificados los genes clave, se comprobó finalmente que la capacidad de predicción de los modelos mejoraba, restringidos a los marcadores más relevantes. Para ello se comparó los valores de AUC en estimación de recaídas para el conjunto de todos los genes y para secuencias de número creciente de los genes marcados como relevantes.

3. *LIMITACIONES DEL ESTUDIO*

Las limitaciones principales del estudio son el pequeño tamaño muestral ($n = 54$) y el amplio número de variables utilizadas (730 genes), así como el carácter retrospectivo del mismo.



IV.RESULTADOS





Como resultado de la minuciosa revisión bibliográfica “terapias diana en pacientes con TCG” se concluye que hasta la fecha ninguna terapia diana ha demostrado en pacientes con TCG una razonable efectividad. A partir de aquí la importancia de centrarnos en los estadios iniciales con el objeto de disminuir el riesgo de recaída y la probabilidad de que formen parte del 15-20% de pacientes con TCG sin opciones curativas (271). A raíz de lo cual surge nuestro estudio de expresión génica diferencial en pacientes con TCGNS estadio I tratados exclusivamente con orquitectomía, entre aquel grupo con recaída vs no recaída.

RESULTADOS DEL ESTUDIO DE EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL EN PACIENTES CON TCGNS ESTADIO I

1. CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS

Se incluyó un total de 54 pacientes, de los que 26 eran pacientes con recaídas y 28 pacientes sin recaída. En la *tabla 1* se recogen las características clinicopatológicas de los pacientes. La mediana de edad fue 30 años en ambos grupos.

El 78% (n=42) de la población global tenían tumores germinales mixtos, destacando el subtipo histológico carcinoma embrionario (91%, n=38 de los 42 pacientes con tumores mixtos), seguido por orden de frecuencia del teratoma (69%, n=29 de los 42 pacientes con tumores mixtos), seminoma (41%, n=17 de los 42 pacientes con tumores mixtos), tumor del seno endodérmico o tumor de yolk sac (33%, n=14 de los 42 pacientes con tumores mixtos), coriocarcinoma (12%, n=5 de los 42 pacientes con tumores mixtos) y teratocarcinoma (5%, n=2 de los 42 pacientes con tumores mixtos). Este orden de subtipos histológicos, respecto a la frecuencia de presentación en los tumores germinales mixtos, se mantenía independientemente del subgrupo analizado (recaída vs no recaída), pero sin embargo en el subgrupo con recaída el subtipo histológico carcinoma embrionario estaba presente en el 100% de los pacientes con tumores mixtos. En la *figura 22* se representan los subtipos histológicos

constituyentes dentro de los tumores germinales no seminoma mixtos, tanto en el grupo de pacientes con recaída como en aquellos sin recaída.

Por otro lado, respecto a los tumores germinales puros o no mixtos, el subtipo predominante fue el carcinoma embrionario. Seis pacientes con recaída (23%) tenían un tumor germinal puro (los seis carcinoma embrionario). Respecto al grupo de pacientes sin recaída, igualmente seis pacientes tenían un tumor germinal puro (21%), de los que cuatro eran carcinoma embrionario, uno teratoma y otro teratocarcinoma. En las *figuras 23 y 24* se representan los subtipos constituyentes de los tumores germinales no seminoma puros en el grupo de pacientes con recaída y en el grupo sin recaída, respectivamente.

En cuanto a los marcadores tumorales, el 67% de los pacientes incluidos presentaban elevación de algún marcador tumoral al diagnóstico, predominando la elevación de α -fetoproteína (61% elevación de AFP vs 48% elevación de β HCG), con posterior normalización tras orquiectomía.

La infiltración linfovascular sólo estaba presente en cuatro pacientes, de los que tres no progresaron y uno sí. Esta escasa frecuencia de pacientes con infiltración linfovascular está en consonancia con el hecho de que la mayoría de los pacientes valorados en los centros reclutadores con dicho hallazgo histológico recibieron quimioterapia adyuvante y, por tanto, no eran incluibles en nuestro estudio.

El tamaño tumoral se recogió como tumor superior a 4 cm o \leq 4 cm. En el caso de los pacientes con recaída, seis pacientes presentaban un tumor $>$ 4 cm (23%) mientras que en el caso de los pacientes sin recaída el 50% (n=14) tenían un tumor mayor a 4 cm.

Respecto a las comorbilidades, estaban bastante balanceadas entre subgrupos (15% en los pacientes con recaída (n=4) y 14% en los pacientes sin recaída (n=4)). Entre los pacientes sin recaída, había un paciente con síndrome de Noonan, otro con una esclerosis lateral amiotrófica (que le provocó la muerte, sin evidencia de enfermedad tumoral en el momento del éxitus), otro presentaba virus hepatitis C y había tenido previamente un

traumatismo craneoencefálico que requirió trepanación y, otro paciente presentó poco antes del diagnóstico un neumotórax espontáneo; el resto de pacientes sin recaída no tenían antecedentes médicos relevantes. Entre los pacientes con recaída, uno de ellos era excocainómano, otro presentaba una esclerosis lateral amiotrófica (que le provocó la muerte sin evidencia de enfermedad tumoral en el momento del éxitus), otro presentaba enfermedad de Graves Basedow y otro paciente tenía epilepsia; el resto de pacientes con recaída no tenían antecedentes médicos relevantes.

Tabla 1: Características clinicopatológicas de los pacientes. Comparativa entre ambos grupos con estadístico Chi cuadrado.			
	Grupo recaída (n=26)	Grupo no recaída (n=28)	Global (n=54)
Mediana de edad	30 (15 – 51)	30 (17 – 52)	30 (15 – 52)
Subtipo histológico (p = 0.571)			
Mixto	20 (77%)	22 (79%)	42 (78%)
No mixto	6 (23%)	6 (21%)	12 (22%)
Elevación de βHCG y/o AFP al diagnóstico (p = 0.185)			
Sí	16 (62%)	20 (71%)	36 (67%)
No	10 (38%)	8 (29%)	18 (33%)
Elevación de AFP al diagnóstico (p = 0.135)			
Sí	14 (54%)	19 (68%)	33 (61%)
No	12 (46%)	9 (32%)	21 (39%)
Elevación de βHCG al diagnóstico (p = 0.210)			
Sí	14 (54%)	12 (43%)	26 (48%)
No	12 (46%)	16 (57%)	28 (52%)
Infiltración linfovascular (p = 0.377)			
Sí	1 (4%)	3 (11%)	4 (7%)
No	25 (96%)	25 (89%)	50 (93%)
Tamaño tumoral (> 4cm) p = 0.119			
Sí	6 (23%)	14 (50%)	20 (37%)
No	20 (77%)	14 (50%)	34 (63%)
Comorbilidades			
Sí	4 (15%)	4 (14%)	8 (15%)
No	22 (85%)	24 (86%)	46 (85%)
Nº líneas a la recaída:			
0	1 (4%)	No procede	No procede
1	23 (88%)		
3	1 (4%)		
6	1 (4%)		
Estado del paciente en la visita de la última visita:			
VSE	22 (84%)	27 (96%)	49 (90%)
VCE	1 (4%)	0 (0%)	1 (2%)
MSE	1 (4%)	1 (4%)	2 (4%)
MCE	2 (8%)	0 (0%)	2 (4%)

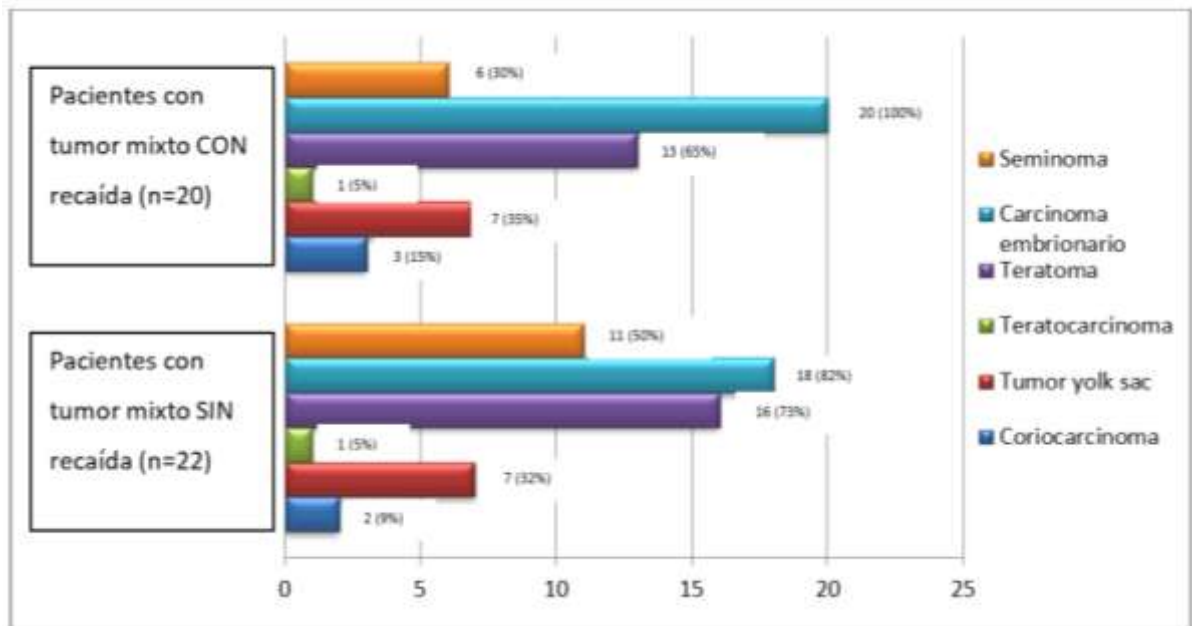


Figura 22. Subtipos histológicos constituyentes de los tumores germinales mixtos. En el gráfico superior en pacientes con recaída y en el gráfico inferior en pacientes sin recaída. Cada subtipo representado con el valor absoluto de dicho subtipo histológico entre el conjunto de pacientes con tumores germinales mixtos en pacientes con recaída (n=20) en el gráfico superior, y entre aquellos tumores germinales mixtos de pacientes sin recaída (n=22) en el gráfico inferior, y entre paréntesis el porcentaje respecto al total de pacientes con tumores germinales mixtos en ambos grupos (porcentaje respecto a los 22 pacientes con tumores mixtos entre los pacientes sin recaída y porcentaje respecto a los 20 pacientes con tumores mixtos en aquellos con recaída).

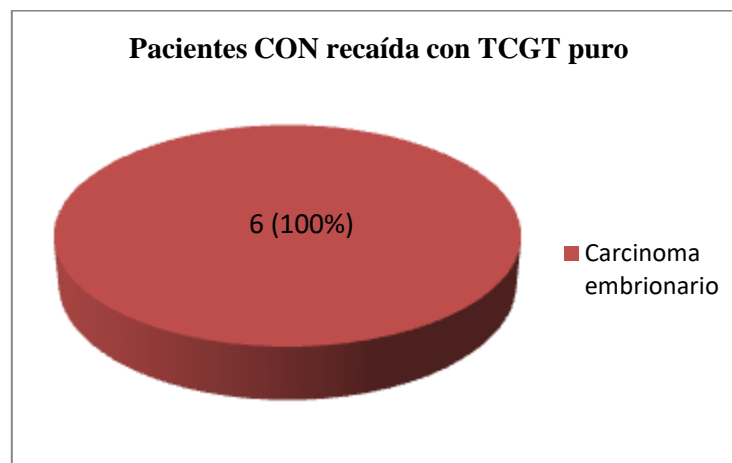


Figura 23. Subtipos histológicos constituyentes de los pacientes con TCGT puro con recaída. En este caso, los seis tumores germinales puros estaban constituidos por carcinoma embrionario.

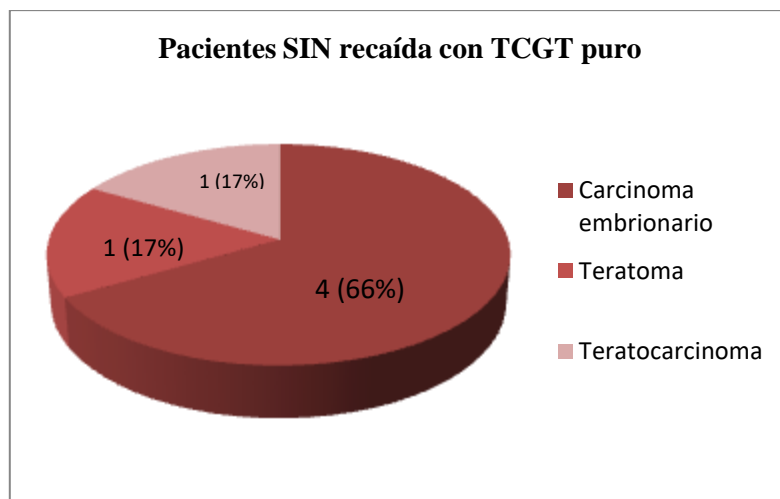


Figura 24. Subtipos histológicos constituyentes de los pacientes con TCGT puro sin recaída. En este caso, un TCGT puro de los seis lo conformaba teratoma, otro teratocarcinoma y cuatro de los seis estaban formados por carcinoma embrionario.

Con una mediana de seguimiento de casi 5 años (59 meses), el estado en la última visita de los pacientes con recaída fue del 84% (n=22) vivos sin enfermedad (VSE), el 4% (n=1) vivo con enfermedad (VCE), un paciente (4%) muerto sin enfermedad (MSE) y dos pacientes (8%) muertos con enfermedad (MCE). Respecto al estado en la última visita de los pacientes sin recaída, el 96% estaban VSE (n=27) y un paciente MSE (4%).

Como podemos observar, hubo un total de dos muertes sin enfermedad. Una de ellas tuvo lugar en un paciente sin recaída (paciente número 27), debido a una esclerosis lateral amiotrófica. El segundo éxitus sin evidencia de tumor tuvo lugar en un paciente con recaída e igualmente debido a una esclerosis lateral amiotrófica (paciente número 6). Este paciente presentó una recaída ganglionar retroperitoneal, a tres meses y diez días de la orquiectomía, tratándose con BEP tres ciclos y quedando libre de enfermedad. El éxitus tuvo lugar en Agosto 2018, diez meses después de la recaída retroperitoneal.

En la *tabla 2* se recogen los tratamientos que recibieron los pacientes en las recaídas, así como el lugar de recaída, tiempo a la recaída y estado en la última visita del paciente. La mediana del tiempo a la recaída fue de 6.6 meses (rango: 1 – 41 meses). El lugar más frecuentemente afectado a la

recaída fue la afectación ganglionar retroperitoneal, estando presente en el 81% de los casos (21 de 26 pacientes con recaída). Le seguían por orden de frecuencia la afectación pulmonar (presente en el 31% de los pacientes (8 de 26 pacientes con recaída)), afectación ganglionar mediastínica (presente en el 8% de los pacientes (2 de 26 pacientes con recaída)), afectación hepática (presente en el 4% de los pacientes (1 de 26 pacientes con recaída)) y, en última instancia, la elevación aislada de marcadores tumorales (presente en el 4% de los pacientes (1 de 26 pacientes con recaída)).

El régimen quimioterápico más frecuentemente usado fue BEP (en 18 pacientes de los 26 con recaída, a los que a dos se les realizó además una linfadenectomía retroperitoneal por masas residuales postquimioterapia). El paciente número 7 a 12 meses de la orquiectomía recayó a nivel ganglionar retroperitoneal, pulmonar y hepática, provocándole el éxitus a sus 37 años sin llegar a recibir ningún régimen de tratamiento oncológico de rescate. Cinco pacientes recibieron a la recaída un esquema basado en bleomicina/gemcitabina/platino, un paciente recibió BOMP-EPI (bleomicina/vincristina/metotrexato/cisplatino - etopósido/ifosfamida/cisplatino) y un paciente etopósido/cisplatino.

Respecto al estadio de los pacientes con recaída en la última visita, con una mediana de seguimiento de 59 meses, el 88% de los pacientes se mantuvieron vivos sin enfermedad con una sola línea de tratamiento quimioterápico tras la recaída, lo cual dado el tiempo habitual de las recaídas de los TCGNS hace que podamos considerar a este 88% de los pacientes curados con una sola línea de tratamiento. El paciente número 7, mencionado previamente, no tuvo oportunidad de recibir ningún tratamiento de rescate a la recaída (MCE). En el momento de recopilación de los datos, el paciente número 14 continuaba en curso de tratamiento oncológico, concretamente con la sexta línea (VCE) y el paciente número 1 recibió varias líneas de tratamiento (BEPx4 seguido de linfadenectomía retroperitoneal, seguido de TIP (paclitaxel / ifosfamida / cisplatino) y trasplante de células madres), muriendo finalmente a causa de una hemorragia pulmonar complicación del trasplante de células madres recibido.



Tabla 2. Pacientes con recaída. Descripción del tiempo a la recaída, lugar y tratamiento a la recaída, tratamientos posteriores y estado en la última visita.

Casos	Tiempo a la recaída (SLP) (meses)	Lugar recaída *	Tratamiento a la recaída	Tratamientos posteriores	Estado en la última visita
1	16	1, 2	BEP x4 => LDRP	TIP, TCM	MCE
2	5	1	BEP x4 => LDRP	0	VSE
3	9	1	BEP x 4	0	VSE
4	20	1	BEP x 4	0	VSE
5	22	1	BEP x 4	0	VSE
6	3	1	BEP x 3	0	MSE
7	12	1, 2, 3	No	0	MCE
8	10	1	BGP x 3	0	VSE
9	8	1	BGP x 2 + GP x1	0	VSE
10	3	1	BGP x3	0	VSE
11	7	0	BGP x 1 + EP x 3	0	VSE
12	14	1	BGP x 3	0	VSE
13	8	2, 4	BEP x 4	0	VSE
14	10	1	BEP x 4	5**	VCE
15	6	2	BEP x 3	0	VSE
16	5	1	BEP x 3	0	VSE
17	6	1, 2	BOMP-EPI ***	0	VSE
18	3	2, 4	BEP***	0	VSE
19	41	1	BEP***	0	VSE
20	4	1	BEP***	0	VSE
21	1	1, 2	BEP x 4	0	VSE
22	3	1, 2	EP x 4	0	VSE
23	10	1	BEP x 3	0	VSE
24	8	1	BEP x 3	0	VSE
25	2	1	BEP x 3	0	VSE
26	4	2	BEP x 3	0	VSE

BEP: bleomicina, etopósido, cisplatino; LDRP: linfadenectomía retroperitoneal; TIP: paclitaxel, ifosfamida, cisplatino; TCM: trasplante de células madres; BGP: Bleomicina, gemcitabina, platino; EP: etopósido, cisplatino; BOMP-EPI: bleomicina, vincristina, metotrexato, cisplatino – etopósido, ifosfamida, cisplatino.

*Lugar recaída: 0: sólo elevación de marcadores tumorales; 1: ganglionar retroperitoneal; 2: pulmonar; 3: hepática; 4: ganglionar mediastínica.

**El paciente número 14 recibió seis líneas en total a la recaída, desconociendo el tipo de tratamientos posteriores a la primera línea con BEP.

*** Desconociendo el número de ciclos recibidos.

2. ESTUDIO DE SUPERVIVENCIA

En cuanto a los resultados de supervivencia, se obtuvieron como era de esperar diferencias estadísticamente significativas en SLP entre ambos grupos ($p=0.000$), con una mediana de supervivencia libre de progresión de

6.6 meses (95% CI, 3.977 – 9.223) en el grupo con recaída, no alcanzada en el grupo sin recaída y de 41.3 meses en la población global (figura 25).

La mediana del tiempo a la recaída fue de 7 meses desde la fecha de la orquiectomía (fecha del diagnóstico) (rango: 1 – 41 meses). Además el 81% de las recaídas ocurrieron en el primer año. La tasa de SLP en la población con recaída a los 12, 24, 36 y 48 meses fue del 19%, 4%, 4% y 0% respectivamente.

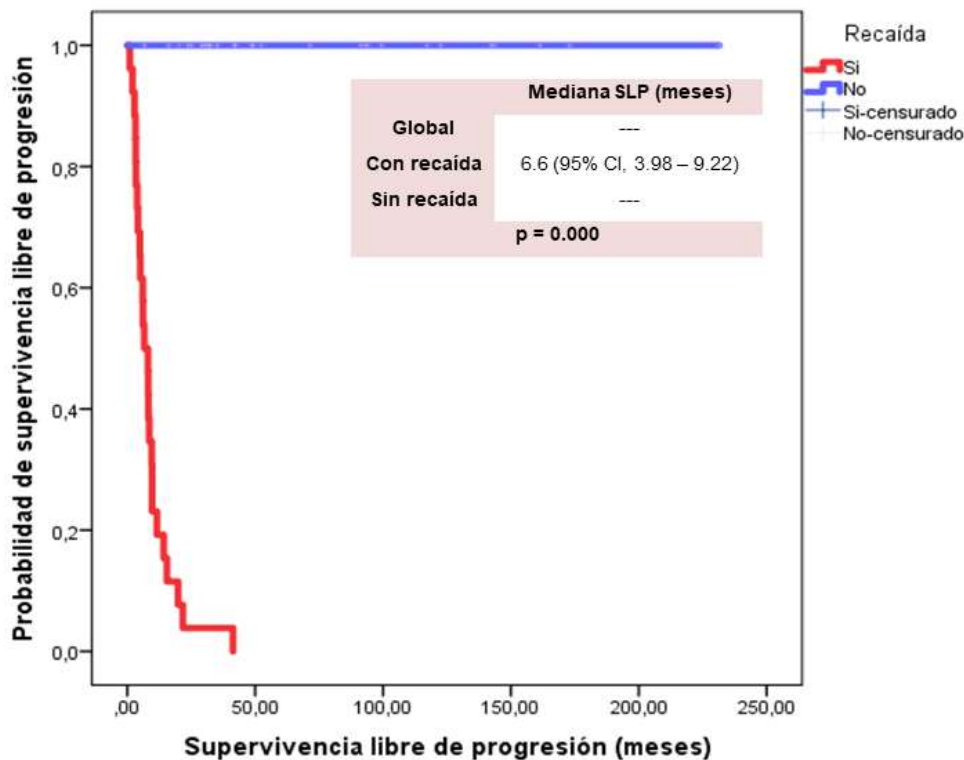


Figura 25. Curva de Kaplan Meier para SLP en pacientes con recaída y sin recaída.

De las cuatro muertes de la población global, dos fueron sin evidencia de tumor (una entre los pacientes con recaída y otra entre los pacientes sin recaída) y dos debida al tumor (entre las recaídas). Por lo que la supervivencia causa específica a los 60 meses fue del 95%.

No se obtuvo la mediana de supervivencia global en ningún grupo, dado el buen pronóstico de estos pacientes independientemente de que recayesen o no, y no se obtuvieron diferencias significativas entre ambos

grupos ($p=0.328$) (figura 26). Sin embargo, sí se observó una tendencia a peores resultados en supervivencia en la población con recaída (aunque no significativos probablemente por el pequeño tamaño muestral), con unas tasas de SG a 12, 24 y 60 meses del 96%, 96% y 91% en la población con recaída, y del 100%, 100% y 95% en el grupo sin recaída. Diferencias en supervivencia global que quedan más remarcadas si aumentamos el seguimiento de los pacientes, con una SG a 200 meses del 77% en los pacientes con recaída vs 95% en pacientes sin recaída (poco valorable dado la mediana de seguimiento de nuestro estudio de 59 meses).

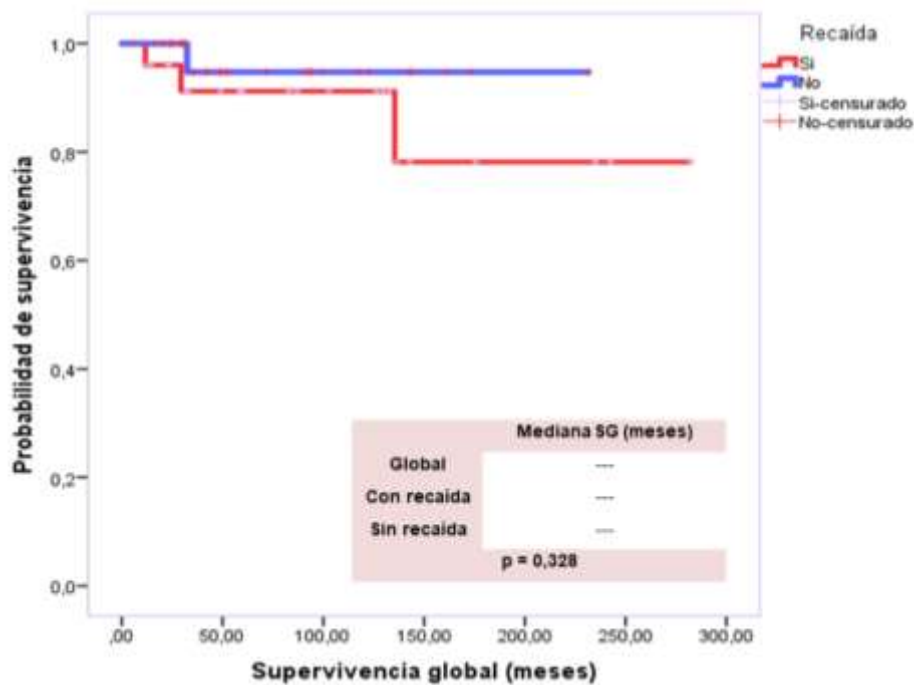


Figura 26. Curva de Kaplan Meier de SG en pacientes con recaída y sin recaída.

3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL DE LOS 730 GENES

Inicialmente se llevó a cabo un análisis de expresión diferencial usando los 730 genes en los 54 pacientes incluidos, usando la herramienta nSolver versión 5.

Con los resultados obtenidos con el análisis de expresión génica de las 54 muestras tumorales mediante el panel PanCancer (28 muestras de pacientes sin recaída y 26 muestras de pacientes con recaída tumoral) se realizó el análisis de expresión diferencial obteniendo, como vemos en la imagen tipo volcán de la *figura 27*, una probable expresión diferencial pero sin diferencias significativas de expresión en ninguno de los genes analizados, probablemente por el fold change no suficientemente amplio. Prácticamente todos los genes se encontraban en el rango entre doble infraexpresión y doble sobreexpresión al comparar la expresión de dichos genes entre ambos grupos (recaída y no recaída).

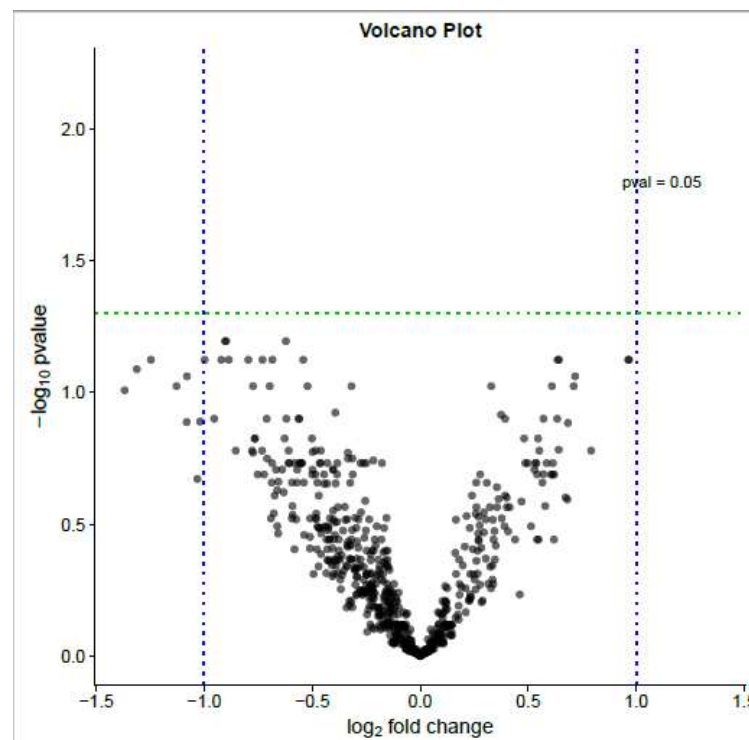


Figura 27. Gráfico tipo volcán. Representa la expresión diferencial de los genes tras el análisis de las 54 muestras tumorales de pacientes con TCGNS, incluyendo tanto a pacientes con recaída como sin recaída. El eje Y representa la pvalue ajustado al total de genes estudiados, considerándose < 0.05 significativo. El eje X representa el log₂ fold change, expresando el número de veces que cada gen es sobreexpresado o infraexpresado en el grupo con recaída respecto a los pacientes sin recaída. Se han delimitado los límites -1 y 1 (doble infraexpresado o doble sobreexpresado). No se observa ningún gen con expresión diferencial estadísticamente significativa y la gran mayoría de los genes tenían una expresión tan sólo entre 1 y -1 fold change.

En la *tabla 3* se representan los genes con expresión diferencial más próximo a la significación estadística ($p < 0.05$).

Tabla 3. Significación estadística de los genes más representativos.

Gen	Fold change	p adj
AKT3	-0.62	0.064
BAIAP3	-0.90	0.064
ZBTB16	-0.90	0.064
RASGRP1	-0.92	0.075
KIT	-1.25	0.075
IL13RA2	0.96	0.075
ITGA3	-0.73	0.075
ACVR1B	-0.54	0.075
TGFB3	-0.89	0.075
HHEX	-0.80	0.075
CCNA1	0.97	0.075
NR4A1	-0.68	0.075
PLA2G10	0.64	0.075
FGF7	-1	0.075
GADD45A	0.64	0.075
MMP9	-1.31	0.082
TGFB2	-1.10	0.087
RRAS2	0.72	0.087
CDC7	0.33	0.095
CCNB1	0.61	0.095

Significación estadística de los genes con expresión diferencial más próxima a la significación ($p < 0.05$) (p adj) y fold change de cada uno de esos genes indicando el número de veces que cada gen está sobre/infraexpresado en el grupo con recaída respecto al grupo sin recaída (como vemos todos ellos entre -1 y +1).

4. ANÁLISIS DE REDES DE COEXPRESIÓN

Para analizar si existían genes con expresión diferencial homogénea entre ellos en ambos grupos (recaída y no recaída), sugiriendo participar en redes de interacción, se llevó a cabo el análisis de redes de coexpresión.

Se obtuvieron distintos modelos de genes relacionados, concretamente nueve, es decir, nueve posibles redes de coexpresión génica (*figura 28*) o, lo que es lo mismo, nueve grupos de genes con expresión diferencial

homogénea entre ellos en ambos grupos de pacientes estudiados (TCGNS con y sin recaída). De estos modelos, sólo uno (MEpurple) fue estadísticamente significativo con una correlación de 0.39 con la recaída (pvalue 0.003), lo cual es importante teniendo en cuenta el gran número de genes analizados, el pequeño tamaño muestral, que sólo fue analizada una variable (recaída sí vs no) y el carácter multifactorial de las recaídas (interviniendo multitud de factores, no sólo la coexpresión de estos genes).

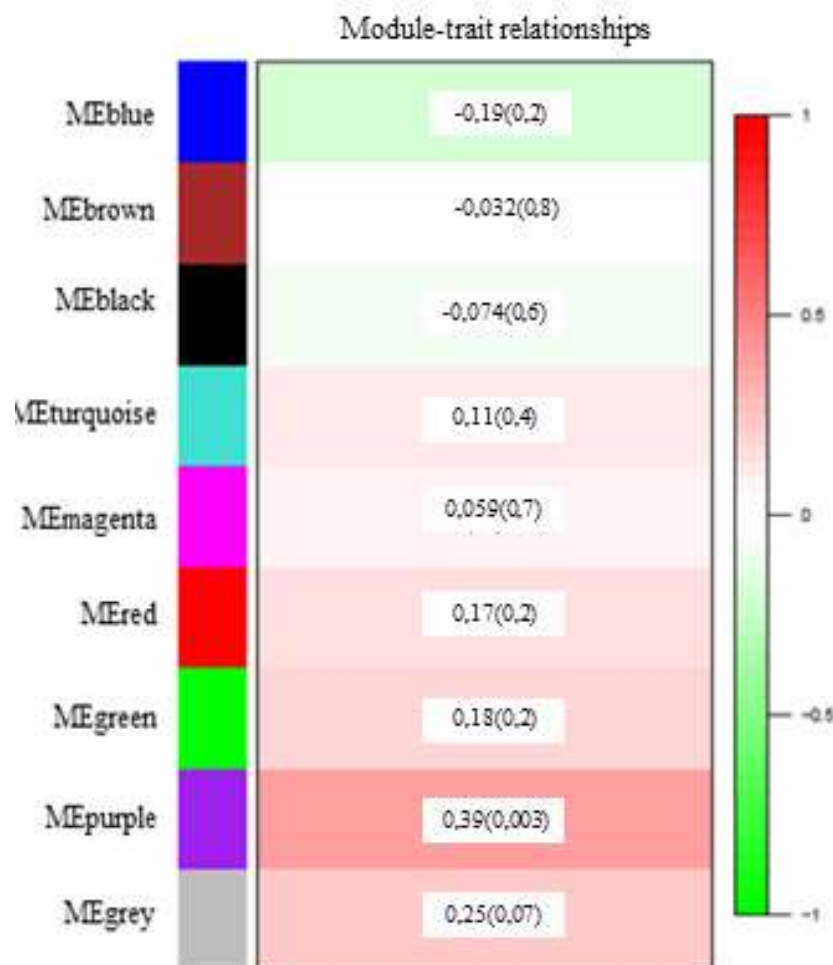


Figura 28. Escala de correlación y significación de los distintas redes de coexpresión génica encontrados en los 730 genes analizados en ambos grupos (recaída y no recaída). A la izquierda se observan los nueve modelos encontrados de redes de coexpresión. A la derecha se observa la escala de expresión diferencial, siendo 1 la máxima correlación positiva con la recaída, 0 la nula relación con la recaída y -1 la máxima correlación negativa con la recaída. En la columna de en medio se observa la correlación que tiene cada modelo con la recaída y entre paréntesis la significación estadística. Como vemos sólo el modelo MEpurple está relacionado estadísticamente con la recaída ($p = 0.003$), con una correlación de 0.39.

En la *tabla 4* se representan los distintos genes incluidos en dicha red de coexpresión obtenida de forma significativa (MEpurple), compuesto por 31 genes. Se representa la correlación individual de cada gen con la recaída, de forma independiente al resto de genes (GS.Recurrence), destacando FOSL1, PLA2G10, CCNA1, PIK3CB, RRAS2, IL13RA2 cuyas correlaciones individuales con la recaída son iguales o superior a 0.39 (con pvalue, representado como “p.GS.Recurrence”, ≤ 0.0032), que corresponde con el valor de correlación del modelo en global con la recaída. Para el resto de genes, la correlación con la recaída fue inferior a dicho valor de 0.39.

También se representa el nivel de asemejaación de la expresión de cada uno de los 31 genes con la media de expresión del modelo ME.purple (MM.purple). Prácticamente todos estos 31 genes se asemejan bastante a la media de expresión del modelo (representado como MM.purple) de forma estadísticamente significativo en todos los casos (como observamos en la columna p.MM.purple).

Tabla 4. Características de los genes que conforman el modelo de coexpresión ME.purple.

Genes	GS.Recurrence	p.GS.Recurrence	MM.purple	p.MM.purple
FOSL1	0,43	0.001	0,77	9,65 E-12
PLA2G10	0,42	0.002	0,77	1,28 E-11
CCNA1	0,42	0.002	0,81	2,32 E-13
PIK3CB	0,42	0.002	0,82	3,29 E-14
RRAS2	0,41	0.002	0,86	5,61 E-19
IL13RA2	0,39	0,003	0,59	2,78 E-06
GADD45A	0,38	0.005	0,69	6,40 E-09
IL23A	0,38	0.005	0,77	8,58 E-12
FGF4	0,36	0.008	0,90	4,80 E-20
BDNF	0,34	0.012	0,71	1,27 E-09
PRKAR2A	0,32	0.019	0,81	1,16 E-13
MAD2L2	0,31	0.022	0,84	9,77 E-16
FGF19	0,31	0.024	0,79	7,23 E-13
NODAL	0,30	0.027	0,81	7,50 E-14
NRAS	0,30	0.028	0,80	6,60 E-13

Continuación Tabla 4. Características de los genes que conforman el modelo de coexpresión ME.purple.				
CARD11	0,28	0.038	0,77	1,09 E-11
HDAC1	0,28	0.038	0,83	4,80 E-15
PDGFA	0,28	0.044	0,85	9,36 E-16
PTPRR	0,27	0.049	0,70	5,28 E-09
DUSP5	0,27	0.049	0,83	9,05 E-15
PTPN11	0,22	0.115	0,70	5,04 E-09
PBX3	0,21	0.128	0,58	5,02 E-06
FGFR4	0,20	0.155	0,80	2,75 E-13
SHC3	0,19	0.171	0,51	7,51 E-05
TFDP1	0,17	0.216	0,58	3,79 E-06
SPRY2	0,14	0.305	0,61	7,98 E-07
PTCH1	0,13	0.337	0,41	0.002
SPRY4	0,13	0.354	0,73	2,71 E-10
LEFTY1	0,11	0.440	0,70	2,87 E-09
RPS6KA5	-0.19	0.160	-0.57	6,07 E-06
ID4	-0.25	0.063	-0,67	3,45 E-08
<p>GS.Recurrence: Correlación individual de cada gen con la recaída vs no recaída. p.GS.Recurrence: significación para la correlación GS.Recurrence. MM.purple: Nivel de asemejación de la expresión de cada gen con la expresión media del modelo, es decir conectividad/importancia de cada gen dentro del modelo. Mientras más alto es el número absoluto, mayor es la contribución de dicho gen en la red de coexpresión. p.MM.purple: significación de MM.purple.</p>				

En la *figura 29* podemos observar como la mayoría de los genes del modelo MM.purple tienen una alta correlación individual con la recaída y contribución al modelo.

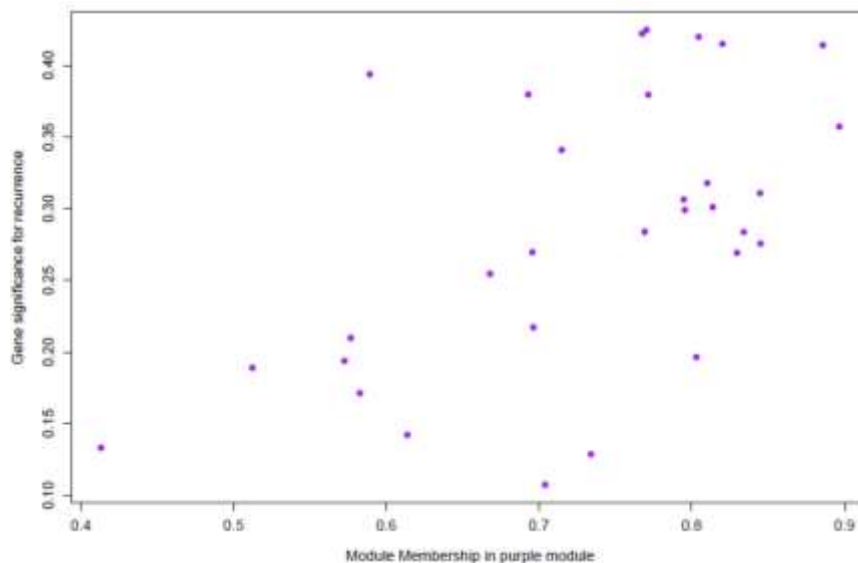


Figura 29. Representación de la correlación individual de cada gen con la recaída, así como con el grado de asemejaación y contribución de cada gen con el modelo. El eje Y representa la correlación individual de cada gen con la recaída y el eje X el grado de asemejaación y contribución de cada gen con el modelo. Vemos como la mayoría de los genes se agrupan en el cuadrante supero-derecho (alta correlación a la recaída y contribución al modelo).

5. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Finalmente se llevó a cabo un análisis bioinformático usando distintas herramientas con el objetivo de disminuir el ruido ocasionado por el alto número de variables analizadas (730 genes). Se usó nueve modelos de clasificación (representados en la *tabla 5*), los cuales comparten métricas internas de selección de características, fundamental para seleccionar los genes con mayor capacidad predictiva.

Se realizaron simulaciones con cada modelo con una participación del 70% de datos del conjunto de entrenamiento y un 30% del conjunto de validación. En cada modelo se entrenó con los 730 genes y, se seleccionó en cada una de las mil simulaciones realizadas con cada modelo, los 20 genes con más relevancia de cada simulación. La mediana del rendimiento de cada modelo en las mil simulaciones realizadas con cada uno de ellos se representó como el área bajo la curva (AUC) (valor mediano de la AUC sobre las 1000 iteraciones), estando la mayoría en torno a 0.6 (valorando

cada modelo individualmente). Los datos de entrada han sido meramente normalizados. Ninguna selección de marcadores ni procesamiento previo adicional ha tenido lugar. Los modelos han sido ejecutados con los valores defecto de los hiperparámetros de la librería scikit-learn.

Una guía adecuada para clasificar la precisión indicada por la AUC sería similar al sistema académico de puntuación:

- 0.90-1.00: clasificador excelente (A)
- 0.80-0.90: clasificador bueno (B)
- 0.70-0.80: clasificador aceptable (C)
- 0.60-0.70: clasificador mediocre (D)
- 0.50-0.60: clasificador deficiente (E)

En la *tabla 5* se representan los entrenamientos iniciales con los resultados para cada modelo empleado (730 marcadores empleados).

Tabla 5. Resultados de AUC con los entrenamientos iniciales en cada modelo.	
MODELO	AUC
Lasso	0.667
Ridge	0.639
Gradient Boosting	0.530
Random Forest	0.586
ExtraTrees	0.598
LogisticRegression	0.607
SGDC	0.607
PassiveAgressiveClassifier	0.614
SVR	0.653
Resultado referencia (mediana AUC)	0.607

En la *figura 30* vemos el número de genes seleccionados, con cada uno de los criterios, en función del tamaño umbral empleado. Es decir, según el criterio de unanimidad (genes relevantes en todos los modelos, representado en rojo) el número de genes seleccionados variaba según el número de genes empleados en la simulación (a mayor número de genes empleados (tamaño muestral) más genes seleccionados). Igual ocurre cuando

empleamos el criterio de voto mayoritario (genes relevantes al menos en la mitad de los modelos usados, representado en azul), donde a más genes empleados/estudiados más genes seleccionados/más genes se repiten como destacados en al menos la mitad de los modelos usados.

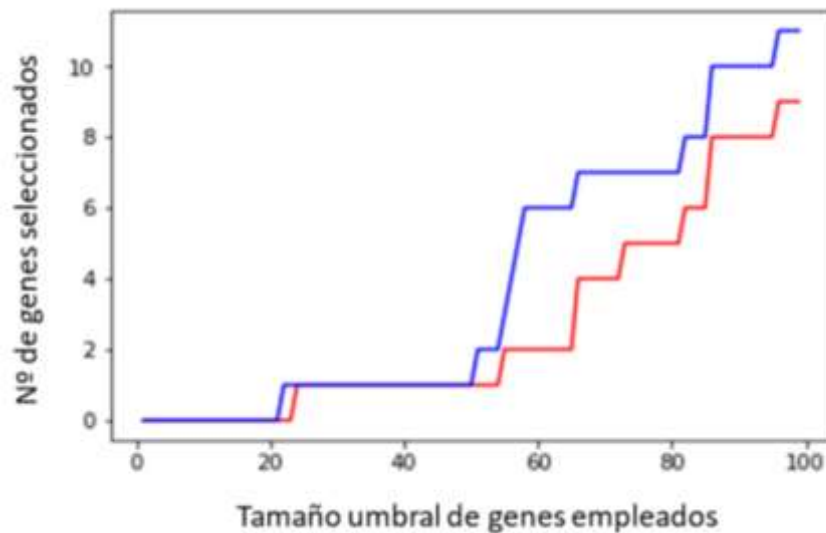


Figura 30. Representación del número de genes seleccionados con cada uno de los criterios en función del tamaño umbral empleado. Azul: genes seleccionados según el criterio de voto mayoritario, en función del tamaño umbral empleado. Rojo: genes seleccionados según el criterio de unanimidad, en función del tamaño umbral empleado.

La secuencia de genes en orden de importancia (voto mayoritario) resulta ser: MPL, COL24A1, NR4A1, FOSL1, CREB5, FANCB, LAMB4, ZBTB16, CALML3.

A continuación se realizó las mismas simulaciones con un conjunto creciente de genes seleccionados, y se comparó los resultados con los mismos modelos utilizados sobre el conjunto total de genes (*tabla 6*).

Tabla 6. Simulaciones con un número creciente de genes seleccionados y resultados de AUC.		
GENES SELECCIONADOS	MEDIANA AUC (AUC referencia 0.607)	MEJORA (%)
MPL	0.519	-14%
MPL, Col24a1	0.639	5%
MPL, Col24a1, NR4A1	0.735	21%
MPL, Col24a1, NR4A1, FOSL1	0.708	17%
MPL, Col24a1, NR4A1, FOSL1, CREB5	0.708	17%
MPL, Col24a1, NR4A1, FOSL1, CREB5, FANCB	0.736	21%
MPL, Col24a1, NR4A1, FOSL1, CREB5, FANCB, LAMB4	0.757	25%
MPL, Col24a1, NR4A1, FOSL1, CREB5, FANCB, LAMB4, ZBTB16	0.763	26%
MPL, COL24A1, NR4A1, FOSL1, CREB5, FANCB, LAMB4, ZBTB16, CALML3	0.790	30%
Mayor cantidad de genes	< 0.790	< 30%

Pensando en identificar una dependencia entre la expresión de los genes referencia y la recaída, habría que insistir en que no es una cuestión fácilmente abordable. Muchos de los modelos empleados son no-lineales y los comportamientos que predicen son bastante más complejos que una relación lineal basada en marcadores independientes. Además el análisis es bastante dependiente del split. Sin embargo, y dado que el modelo Ridge (lineal) presenta un buen comportamiento dentro de los modelos usados sobre el conjunto limitado de genes de referencia (mediana AUC > 0.80) parece relevante notar la dependencia que apunta sobre los genes y su relación con la recaída. Según sus coeficientes, tendríamos que la recaída es más probable cuando se da la siguiente relación para cada gen.

- MPL: sobreexpresión
- Col24a1: infraexpresión
- NR4A1: sobreexpresión
- FOSL1: sobreexpresión
- CREB5: sobreexpresión

- FANCB: sobreexpresión
- LAMB4: infraexpresión
- ZBTB16: infraexpresado
- CALML3: sobreexpresión

A la vista de los resultados concluimos que la expresión de los genes de la lista ofrece una cierta capacidad predictiva en términos de recaída, con una mejora de hasta un 30% de la mediana de la métrica AUC en el caso de la utilización de nueve marcadores referencia (MPL, COL24A1, NR4A1, FOSL1, CREB5, FANCB, LAMB4, ZBTB16, CALML3), aumentando el AUC de 0.5 a 0.8. Interpretamos que la razón por la que los modelos funcionan mejor seleccionando estos genes frente a los 730 totales se debe a la eliminación del ruido que suponen los restantes. Es interesante observar que, si aumentamos el número de marcadores referencia, los resultados comienzan a empeorar; posiblemente debido a la utilización de otros marcadores que suponen la introducción de más ruido que capacidad predictiva.

6. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL DEL MODELO DE NUEVE GENES

En las *tablas 7 y 8* se muestran los valores absolutos del conteo de expresión de ARNm (normalizados con los genes de referencia) de cada uno de los nueve genes del modelo obtenido con el análisis bioinformático, en el subgrupo sin recaída y con recaída, respectivamente.

En la *tabla 9* se recogen las medias de expresión absoluta de estos nueve genes del modelo obtenido con el análisis bioinformático en la población global (con su rango de expresión), así como, las medias de dichos genes en el grupo de pacientes con recaída y sin recaída.

En la *tabla 10* se representa los resultados del análisis estadístico t student comparando las medias de los nueve genes del modelo obtenido

con el análisis bioinformático entre el grupo de pacientes que recaen y los que no. La prueba de Levene para la igualdad de varianzas nos indica si podemos o no suponer varianzas iguales. Si la probabilidad (sig) asociada al estadístico Levene es > 0.05 suponemos varianzas iguales. Si la probabilidad (sig) asociada al estadístico Levene es < 0.05 suponemos varianzas distintas. Con estos resultados, obtenemos que los genes FOSL1 y ZBTB16 presentan medias de expresión diferentes entre los pacientes con recaída y los que no, pero valorando cada gen independientemente. Para FOSL1: $p=0.001$ (95% CI, 55.04 – 207.93), para ZBTB16: $p = 0.005$ (95% CI, (-117.20) - (-22.84)).

Tabla 7. Expresión génica en los pacientes SIN recaída.

Pacientes	CALML3	Col24a1	CREB5	FANCB	FOSL1	LAMB4	MPL	NR4A1	ZBTB16
27 **	20	36	72	55	24	4	5	130	20
28	40	8	55	40	54	7	17	114	8
29	22	41	197	92	75	11	14	440	131
30	44	60	568	573	294	20	32	656	53
31	17	104	375	444	66	11	29	940	315
32	25	262	275	90	146	11	23	251	68
33	13	28	121	197	72	7	15	287	151
34	28	50	360	140	117	16	69	555	329
35	21	86	149	119	43	10	16	790	11
36	8	62	201	338	178	15	12	638	51
37	11	6	73	81	125	3	10	68	11
38	30	60	209	149	197	10	64	287	160
39	27	44	187	133	51	10	25	316	58
40	28	160	508	255	212	14	21	399	36
41	9	180	259	243	56	6	12	172	106
42	11	93	447	313	163	16	12	334	159
43	23	21	52	129	22	6	8	112	45
44	34	96	257	262	180	14	26	590	329
45	35	48	255	269	117	8	18	148	127
46	8	43	324	472	119	16	10	602	183
47	20	31	154	184	127	15	24	353	342
48	17	102	103	628	45	8	24	299	131
49	19	118	317	242	112	30	18	260	188
50	6	241	508	183	47	22	18	542	86
51	7	55	169	196	124	10	13	244	200
52	5	47	230	132	59	8	20	169	296
53	15	82	256	66	295	13	30	368	40
54	13	133	755	188	65	37	31	497	307

Se representan los valores absolutos del conteo de expresión de ARNm (normalizados con los genes de referencia) de cada uno de los genes del modelo obtenido con el análisis bioinformático en la población de pacientes sin recaída.

** Paciente MSE por esclerosis lateral amiotrófica.

Tabla 8. Expresión génica en los pacientes CON recaída.

Muestras	CALML3	Col24a1	CREB5	FANCB	FOSL1	LAMB4	MPL	NR4A1	ZBTB16
1	10	19	136	316	239	4	11	166	26
2	38	40	302	213	105	5	29	122	25
3	23	29	327	359	152	7	19	113	43
4	21	14	59	89	31	3	16	124	18
5	26	73	326	365	393	4	23	522	36
6 **	14	135	517	244	106	20	36	173	66
7	18	43	330	240	446	8	35	909	175
8	29	90	449	335	226	10	38	116	67
9	62	65	544	438	231	18	74	285	111
10	55	9	331	202	180	7	91	166	36
11	29	271	545	272	65	18	33	714	162
12	57	14	222	465	132	13	36	211	52
13	33	30	399	242	331	8	13	222	40
14 ***	54	98	175	348	101	12	40	233	64
15	41	22	255	303	458	7	53	187	49
16	15	3	28	11	18	1	10	28	6
17	44	43	141	42	110	5	24	1220	77
18	9	26	371	265	167	2	7	187	53
19	4	21	201	287	240	9	2	231	36
20	20	26	288	460	176	11	25	188	55
21	5	71	478	533	667	16	17	607	206
22	20	44	344	539	406	15	24	611	148
23	34	17	306	148	123	5	57	406	28
24	19	42	351	476	522	11	32	244	40
25	13	33	785	235	150	15	41	165	130
26	16	40	672	330	601	10	23	317	90

Se representan los valores absolutos del contaje de expresión de ARNm (normalizados con los genes de referencia) de cada uno de los nueve genes del modelo obtenido con el análisis bioinformático en la población de pacientes con recaída.

** Paciente MSE por esclerosis lateral amiotrófica.

*** Paciente VCE a fecha del último seguimiento que había recibido seis líneas de tratamiento.

Tabla 9. Media y rango de expresión absoluta de cada uno de los nueve genes del modelo obtenido con el análisis bioinformático.

Genes	Media (rango)	Media en grupo recaída vs no recaída
CALML3	23.43 (4 – 62)	27.27 / 19.86
Col24a1	66.94 (3 – 271)	50.69 / 82.04
CREB5	302.19 (28 – 785)	341.62 / 265.57
FANCB	258.7 (11 – 628)	298.35 / 221.89
FOSL1	177.06 (18 – 667)	245.23 / 113.75
LAMB4	11.15 (1 – 37)	9.38 / 12.79
MPL	26.39 (2 – 91)	31.12 / 22
NR4A1	352.37 (28 – 1220)	325.65 / 377.18
ZBTB16	107.04 (6 – 342)	70.73 / 140.75

Tabla 10. Análisis comparativo de los nueve genes del modelo bioinformático entre los dos grupos de pacientes usando la prueba estadística t student.

Genes	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	Gl	Sig (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
								Inferior	Superior
CALML3 Se asumen varianzas iguales No se asumen varianzas iguales	5.73	0.02	1.97	52	0.05	7.41	3.76	-0.13	14.95
			1.94	41.87	0.59	7.41	3.82	-0.30	15.12
Col24a1 Se asumen varianzas iguales No se asumen varianzas iguales	1.44	0.24	-1.93	52	0.06	-31.34	16.26	-63.96	1.27
			-1.94	51.59	0.58	-31.34	16.16	-63.77	1.08
CREB5 Se asumen varianzas iguales No se asumen varianzas iguales	0.01	0.96	1.61	52	0.11	76.04	47.25	-18.78	170.86
			1.61	51.23	0.11	76.04	47.34	-18.98	171.07
FANCB Se asumen varianzas iguales No se asumen varianzas iguales	0.09	0.77	1.93	52	0.59	76.45	39.57	-2.95	155.85
			1.94	51.99	0.58	76.45	39.43	-2.67	155.58
FOSL1 Se asumen varianzas iguales No se asumen varianzas iguales	16.58	0.00	3.60	52	0.00	131.48	36.58	58.08	204.88
			3.50	32.84	0.00	131.48	37.57	55.04	207.93
LAMB4 Se asumen varianzas iguales No se asumen varianzas iguales	0.75	0.39	-1.92	52	0.06	-3.40	1.77	-6.96	0.15
			-1.94	48.66	0.06	-3.40	1.75	-6.92	0.12
MPL Se asumen varianzas iguales No se asumen varianzas iguales	2.44	0.12	1.91	52	0.62	9.12	4.78	-0.47	18.70
			1.88	44.94	0.66	9.12	4.84	-0.63	18.86
NR4A1 Se asumen varianzas iguales No se asumen varianzas iguales	0.50	0.49	-0.75	52	0.46	-51.53	68.41	-188.79	85.74
			-0.75	47.51	0.46	-51.53	69.01	-19.03	87.27
ZBTB16 Se asumen varianzas iguales No se asumen varianzas iguales	13.79	0.00	-2.93	52	0.01	-70.02	23.89	-117.96	-22.08
			-2.93	-3.00	0.01	-70.02	23.33	-117.20	-22.84

Si observamos el mapa de calor con la expresión diferencial de los nueve genes del modelo resultante del análisis bioinformático en la población global de 54 pacientes con TCGNS, no observamos un patrón claramente distinto entre los pacientes con recaída y los que no recayeron (*figura 31*). Entre los mapas de calor en pacientes con recaída y sin recaída, observamos una mayor expresión absoluta de los genes ZBTB16 y NR4A1 en los pacientes sin recaída y de CREB5 en los pacientes con recaída (en comparación al grupo contrario) (*figura 32 y 33*).

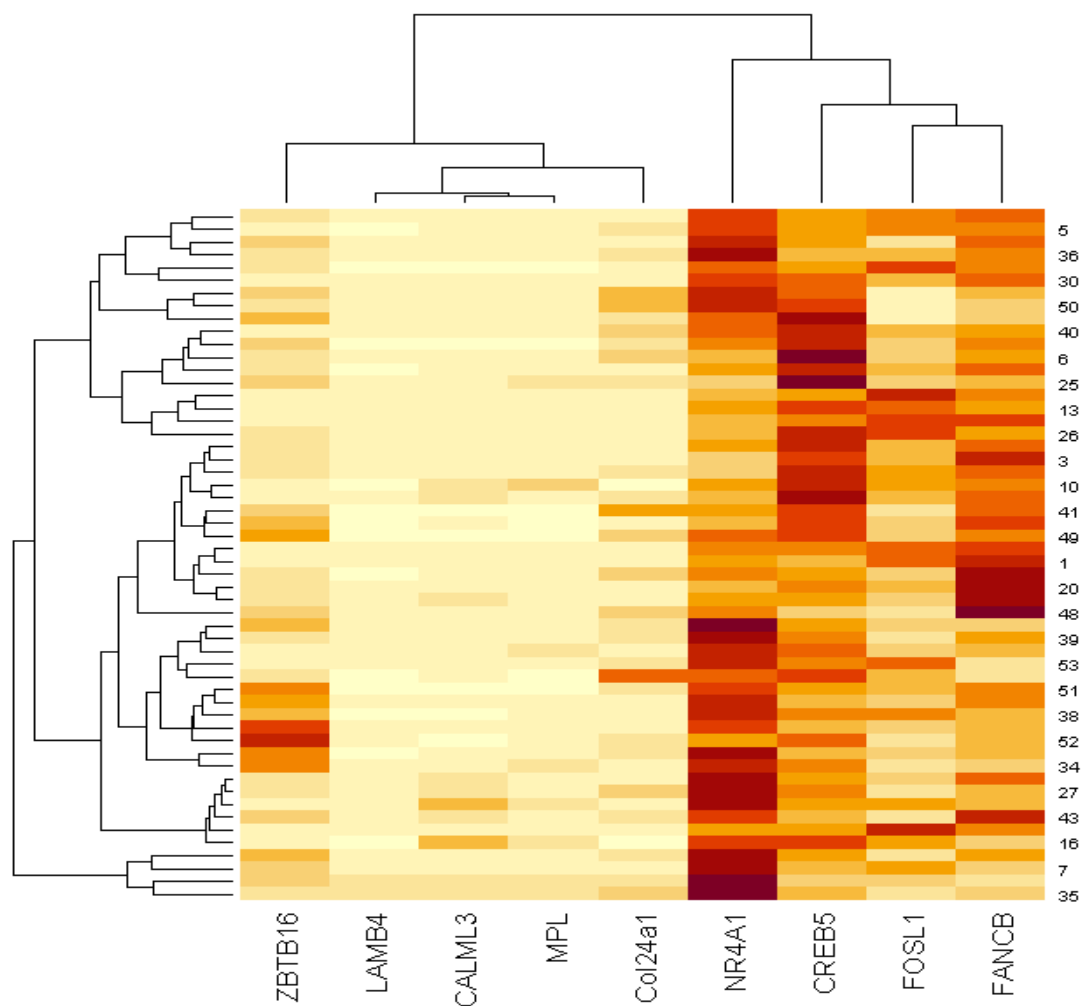


Figura 31. Mapa de calor de las 54 muestras de pacientes con TCGNS con los nueve genes del modelo obtenido con el análisis bioinformático. Los dos grupos, recaída y no recaída, no muestran ningún subconjunto claro de expresión génica diferencial.

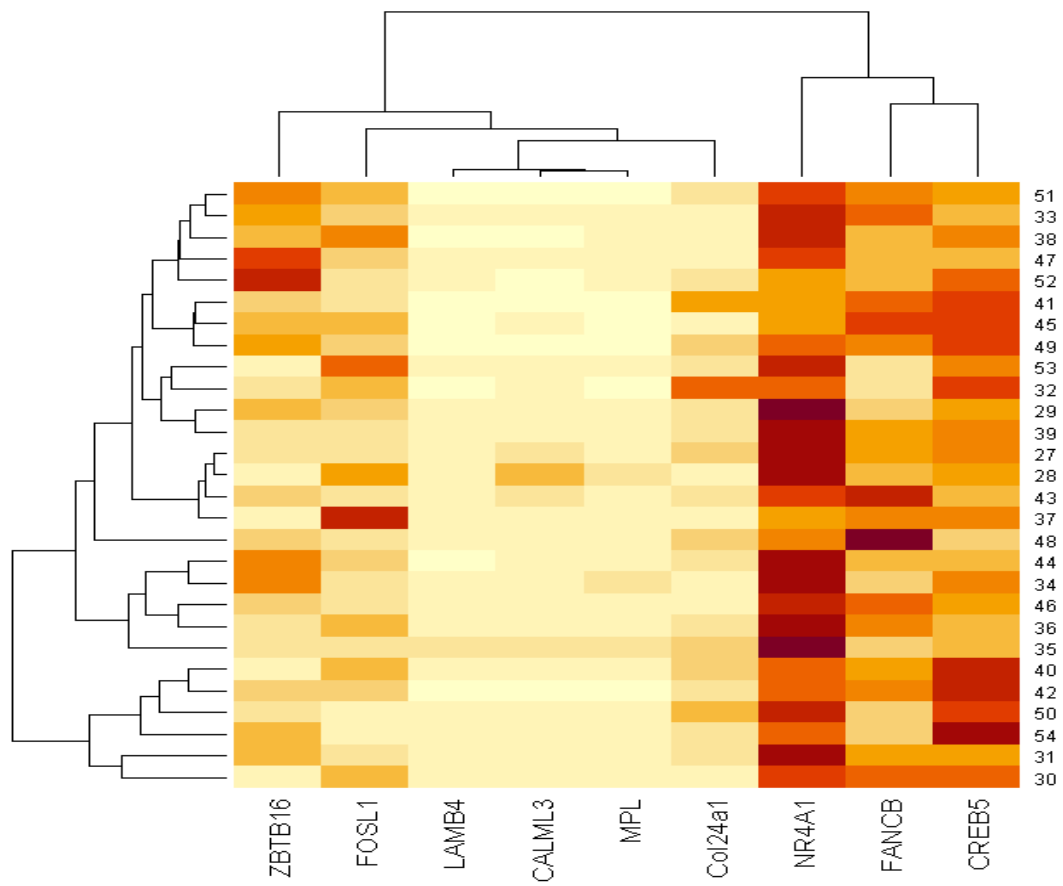


Figura 32. Mapa de calor de las 28 muestras de pacientes con TCGNS sin recaída con los nueve genes del modelo obtenido con el análisis bioinformático. En comparación con el mapa de calor del subgrupo con recaída, observamos una mayor expresión absoluta de los genes ZBTB16 y NR4A1.

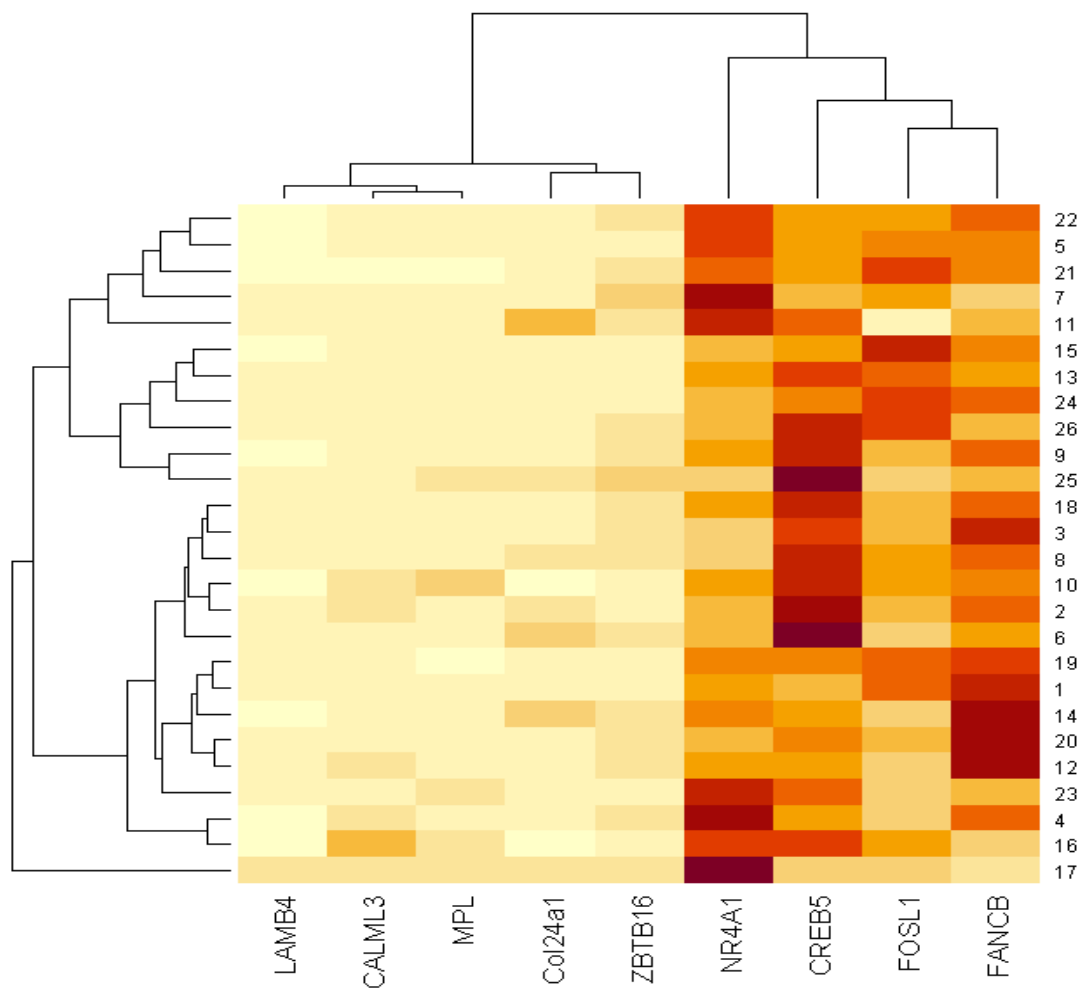


Figura 33. Mapa de calor de las 26 muestras con TCGNS con recaída con los nueve genes del modelo obtenido con el análisis bioinformático. En comparación con el mapa de calor del subgrupo sin recaída, observamos una mayor expresión absoluta de CREB5.

RESULTADOS DE LA REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA “TERAPIAS DIANAS EN PACIENTES CON TUMORES GERMINALES” (6)

1. *FAMILIA EGFR*

Se ha observado expresión de EGFR en el 71% de los teratomas, 100% en coriocarcinomas, 29% en carcinomas embrionarios y un 0% en seminomas y tumor de yolk sac (95). Además la expresión de EGFR no parece modificarse en los pacientes platino sensibles y refractarios, indicando que esta expresión probablemente no influya en la adquisición de resistencia (272).

En el estudio preclínico de Juliachs et al. (2013), se observó que la inhibición de EGFR con gefitinib (molécula pequeña anti-EGFR) o cetuximab (anticuerpo anti-EGFR) era inefectivo en la reducción del tamaño tumoral, mientras que con lapatinib (inhibidor dual de ErbB1 y ErbB2) sí que se redujo un 50% el crecimiento tumoral, bajó un 80% las células Ki67 positivas y se aumentó la apoptosis en 3.5 veces (273). Está en marcha y pendiente de resultados el ensayo clínico NCT01962896 que estudia la combinación de erlotinib + sirolimus (anti-EGFR + inhibidor m-TOR) (274).

Hay muy poca experiencia con fármacos antiHER2 en TCG refractarios. En un estudio preclínico con ratones con TCG sensibles y refractarios a platino, se observó que la combinación de pazopanib junto con lapatinib disminuía el volumen tumoral en mayor medida que cuando se administraban en monoterapia en ambas cohortes (platino sensible y platino refractario) (275). En cuanto al tratamiento con trastuzumab solo hay datos de casos clínicos aislados, con respuestas muy pobres (276).

2. *PI3K/AKT/mTOR*

En los testículos, el gen supresor tumoral PTEN está altamente expresado en las células germinales normales, mientras que está ausente en un porcentaje significativo de seminomas, carcinomas embrionarios y casi todos los teratomas. La neoplasia de células germinales in situ expresa altos niveles de PTEN, sugiriendo que la pérdida de la expresión PTEN está relacionada con la transición a TCGT invasivo así como con la progresión tumoral. La inactivación de PTEN está asociado con la desregulación de la vía PI3K/AKT y el aumento de mTOR (mammalian target of rapamycin). La familia de proteínas TOR está implicada en el control del inicio de la transcripción del ARNm, la organización del citoesqueleto celular, el tráfico de membrana, la formación de ribosomas y la regulación del crecimiento, proliferación y muerte celular. Everolimus es un inhibidor mTOR y, además sensibiliza las células tumorales p53 wild-type (presente en la mayoría de los TCGT) a la apoptosis inducida por cisplatino (91).

Mego et al. (2016) publicó los resultados de un ensayo clínico fase II, donde 15 pacientes con TCG refractarios (al menos dos líneas previas basadas en platino) se trataron con everolimus 10mg/día hasta progresión, toxicidad inaceptable o respuesta completa. Este estudio falló en su objetivo primario, que era la tasa de respuesta objetiva, no obteniéndose ninguna respuesta completa ni parcial; aunque un paciente mantuvo una estabilidad de la enfermedad durante 22.2 meses. La SLP a los tres meses fue del 40%, con una mediana de SLP de 1.7 meses (95%, CI: 1.1 – 4) y una mediana de SG de 3.6 meses (95%, CI: 2 – 11) (277).

En el ensayo clínico fase II RADIT se trató con everolimus 10mg/día a 22 pacientes con TCG refractarios (el 76% habían recibido cinco o más líneas de tratamiento previo). El objetivo primario fue la supervivencia libre de progresión a la semana doce, que no se alcanzó, siendo del 0%. Tampoco se obtuvo ninguna respuesta objetiva, únicamente un paciente presentó estabilidad de la enfermedad tras seis semanas de tratamiento. Las medianas de SLP y SG fueron 7.4 semanas (80%, CI: 4.9 – 7.6 semanas) y 8.3 semanas (80%, CI: 7.1 – 9.1 semanas), respectivamente (278).

3. *cKIT/STEM CELL FACTOR*

La vía cKIT/SCF es crucial para el desarrollo embrionario del testículo y la espermatogénesis (79). CKIT se expresa en una alta proporción en tumores germinales refractarios, presentándose en un estudio en un 48% de los casos (11 pacientes positivos de 23). Sin embargo, la expresión del protooncogén cKIT no se presenta de forma uniforme en todos los subtipos histológicos, siendo su expresión mayoritaria en los seminomas (80 – 100%), expresándose en un 7 – 48% en los no seminomas y, estando su expresión ausente o casi ausente en el caso del coriocarcinoma y teratocarcinoma (80–85).

Esta alta tasa de expresión de cKIT, abre la posibilidad de respuesta a imatinib en tumores germinales. En un ensayo clínico fase II se estudió la expresión de cKIT mediante inmunohistoquímica en 18 pacientes con tumores de células germinales refractarios, no subsidiarios de tratamiento curativo con quimioterapia ni cirugía. Seis de los dieciocho pacientes (33%) mostraron expresión positiva para cKIT y recibieron tratamiento con imatinib oral 600mg/día. No se obtuvo ninguna respuesta objetiva. Cinco de los seis pacientes presentaron progresión tumoral en las primeras ocho semanas de iniciar imatinib. El sexto paciente se trataba de una recaída tardía, a seis años de la única terapia previa con quimioterapia según el esquema BEP (bleomicina, etopósido y platino) con cirugía de rescate; este paciente presentó estabilidad tumoral con una disminución mayor al 50% de AFP durante tres meses antes de la progresión (279).

Otro estudio con imatinib incluyó siete pacientes (un TCGS y seis TCGNS) quimiorrefractarios cKIT positivos. El estudio se cerró prematuramente debido a la baja tasa de expresión cKIT (menor del 10% de los pacientes estudiados inicialmente) y la ausencia de actividad antitumoral (los siete pacientes presentaron una rápida progresión tumoral radiológica y bioquímica, con una mediana de progresión de 34 días) (280).

Una probable explicación a esta ausencia de eficacia en los dos estudios anteriores, es el hecho de que la mutación más frecuentemente encontrada en los seminomas es en el exón 17 (en los que no suele haber respuesta a imatinib) y no en el exón 11, el cual es un factor predictivo positivo de

respuesta (81,89). De ahí, que el estado mutacional del receptor cKIT debería analizarse antes de comenzar tratamiento con imatinib en los futuros ensayos clínicos con pacientes con TCG.

Por otra parte, existen varios casos clínicos de pacientes con tumores de células germinales refractarios cKIT positivo y respuesta a imatinib. Uno de los casos trata de un varón de 24 años con un seminoma puro metastásico al diagnóstico (retroperitoneo, pulmón e hígado) quimiorresistente que recibió una tercera línea con paclitaxel 150mg/m² + oxaliplatino 100mg/m² + gemcitabina 800mg/m² cada dos semanas junto a imatinib 400mg/día (debido a la intensa expresión positiva para cKIT). Tras el primer mes de tratamiento ya se observó una respuesta parcial en pulmón y completa bioquímica, la cual se mantuvo tras los seis ciclos de quimioterapia. El paciente se sometió a una cirugía de rescate, obteniendo únicamente necrosis en los hallazgos histopatológicos. Dicho paciente continuaba en curso de imatinib y libre de enfermedad a los treinta y dos meses de la cirugía (281). El otro caso clínico trataba de un paciente de 29 años con enfermedad retroperitoneal bulky al diagnóstico, que tras tres líneas de tratamiento basado en platino recibió imatinib 400mg/día tras constatar la positividad para cKIT. Tras tres meses con imatinib, se observó respuesta completa. A los veinticuatro meses del inicio del tratamiento con imatinib, el paciente permanecía libre de enfermedad (282).

4. AGENTES ANTIANGIOGÉNICOS

Existen dos casos clínicos publicados con respuesta a bevacizumab en pacientes con TCG refractarios. Uno de ellos recibió bevacizumab en combinación con ifosfamida a altas dosis, etopósido y carboplatino obteniendo una respuesta casi completa de las metástasis hepáticas, pero con una SLP de sólo cinco meses (283). En el otro caso clínico se obtuvo una estabilidad tumoral durante seis meses con bevacizumab y, tras suspender el mismo el tumor progresó (284).

Por otra parte, existen los datos del ensayo clínico fase II de oxaliplatino y bevacizumab en pacientes con TCG refractarios, donde se obtuvo una respuesta objetiva del 27.6% (ocho pacientes de veintinueve), incluyendo una respuesta completa en un paciente durante más de doce meses. Estos pacientes habían recibido una media de cuatro líneas de quimioterapia previas. La mediana de duración de la respuesta fue de cinco meses (rango: 4 a 22 meses), con una mediana de supervivencia de ocho meses para la población global y de 17.5 meses para la población respondedora. Sin embargo, el objetivo principal del estudio no se alcanzó, con solo un paciente libre de progresión a los doce meses. Esta combinación fue bien tolerada, con efectos adversos manejables. Al igual que sucede con el caso publicado por Voigt et al., la contribución de bevacizumab a la efectividad del tratamiento no se puede determinar (285). Además, esta tasa de respuesta no difiere de la que presenta oxaliplatino en monoterapia en pacientes TCG refractarios (19 – 25%) y es inferior a la presentada con la combinación de oxaliplatino con gemcitabina, con o sin paclitaxel (46%) (286,287).

En otro estudio se trataron 43 pacientes con TCG (14% de los cuales eran platino sensibles) con altas dosis de quimioterapia asociada a bevacizumab. Recibieron un primer ciclo de gemcitabina, docetaxel, carboplatino y bevacizumab seguido de un segundo ciclo con ifosfamida, carboplatino, etopósido y bevacizumab. Se obtuvo un 89% de respuesta objetiva (32% respuesta completa (RC), 35% respuesta parcial (RP) menor, 22% RP mayor). Hay que tener en cuenta en este estudio, además de la heterogeneidad de la población, la alta tasa de efectos adversos con cuatro muertes relacionadas con el tratamiento (288).

A parte del uso de bevacizumab en pacientes con TCG refractarios, también tenemos algunos datos del uso de talidomida en estos pacientes (fármaco con propiedades antiangiogénicas, al inhibir el receptor VEGF). Un ensayo clínico fase II trató quince pacientes con TCG refractarios con talidomida, obteniendo una disminución de los marcadores tumorales en cinco pacientes (33%), pero sin llegar a obtener ninguna respuesta objetiva. Esa respuesta bioquímica ocurrió en pacientes con baja carga tumoral, enfermedad lentamente progresiva y AFP elevada (289). En el otro estudio,

se trataron cuatro pacientes con TCG refractarios, con una media de siete líneas previas (cuatro previas a cisplatino), con lenalidomida 25mg/día los días 1-21 cada 28 días (fármaco que entre otras mecanismos antitumorales, inhibe la angiogénesis mediante el bloqueo de la migración y adhesión de células endoteliales así como inhibiendo la formación de microvasos). A pesar del perfil de toxicidad aceptable, todos los pacientes progresaron en el primer ciclo bioquímica y radiológicamente, presentando una mediana de supervivencia de ocho semanas (290).

5. INHIBIDORES MÚLTIPLES TIROSÍNQUINASA

En varios estudios se ha encontrado una expresión substancialmente más alta de VEGF y del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) en los pacientes con TCG comparado con los tejidos normales, sugiriendo que pueden jugar un papel importante en la angiogénesis, progresión y metástasis tumoral (119,291).

Sunitinib es una pequeña molécula oral y potente inhibidor multitirosín quinasa de los receptores VEGF, PDGF, receptor del factor de células madres (c-KIT) y receptor 1 del factor estimulador de colonia (SCF-1). En un estudio con ratones con TCG sensibles y resistentes a cisplatino, se agruparon los ratones en cuatro grupos (control sin tratamiento, con sunitinib, con CDDP y con la combinación de CDDP-sunitinib) y, se observó unos mejores resultados en los animales tratados con la combinación, con una mediana de supervivencia de 13, 33, 36 y 47 días en el grupo control, grupo CDDP, grupo sunitinib y grupo de la combinación respectivamente. Además en la población tratada se observó una disminución del Ki67 y CD31, indicando una disminución de la proliferación celular y de la vasculatura tumoral. En la cohorte de ratones CDDP resistentes, se observó únicamente respuesta en el grupo con sunitinib y con CDDP-sunitinib, aunque sin diferencias entre ambos grupos como era de esperar (292).

En un estudio de Oechsle et al. (2011), se trataron los pacientes con TCG refractarios con sunitinib 50mg/día durante 4 semanas en ciclos de 6 semanas. De treinta y dos pacientes evaluables, se obtuvo una respuesta parcial en tres (9%) y la supervivencia libre de progresión en estos tres pacientes fue de 5, 6.4 y 12.2 meses. La mediana de supervivencia libre de progresión fue de dos meses (95% CI: 1.4 – 2.6), con una tasa de SLP a los seis meses del 11%. La mediana de supervivencia global fue de 3.8 meses (95% CI: 3 – 6.6), con una tasa de SG a los seis meses del 36.4% (293).

En otro ensayo clínico fase II cinco pacientes con TCG seminomas y no seminomas, refractarios a la primera línea de tratamiento, se trataron con sunitinib 50mg/día durante 4 semanas en ciclos de 6 semanas. Sólo un paciente estaba libre de progresión a la semana doce (20%), manteniendo la respuesta durante diecisiete meses con sunitinib (294).

En otro estudio con diez pacientes con TCG refractarios, únicamente se consiguió con sunitinib una estabilización de los marcadores tumorales como mejor respuesta, ni siquiera el cambio de pauta de administración de intermitente (50mg/día durante 4 semanas en ciclos de 6 semanas) a continua (37.5mg/día continuo) consiguió mejorar los resultados. Todos los pacientes progresaron en los tres primeros ciclos (295).

Pazopanib es un inhibidor de múltiples receptores tirosín quinasa, incluyendo VEGFR, PDGFR y cKIT. Se emplea en múltiples tipos de carcinoma, fundamentalmente carcinoma renal y algunos tipos de sarcomas de partes blandas y, debido a su mecanismo de acción, podría tener efecto también en TCG. En un ensayo clínico fase II se estudió cuarenta y tres pacientes tratados con pazopanib con TCG refractarios. En este estudio el 51.2% había recibido tres líneas de tratamiento previo y el 37.2% más de tres. Se obtuvo una reducción de los marcadores en el 70.3% y una respuesta parcial en dos pacientes (4.7%). Sin embargo, no se alcanzó el objetivo primario que era la SLP a los tres meses, que fue del 12.8%. La tasa de SLP a los seis meses fue sólo del 2.6% (95% CI: 0.4 – 178), mientras que la tasa de SG a los veinticuatro meses fue del 14.2% (95% CI: 6 – 33.7) (296). Como se mencionó previamente, también tenemos los resultados del estudio publicado por Juliachs et al. (2013) en el que ratones con TCG

CDDP sensibles o refractarios, recibieron pazopanib en monoterapia o asociado a lapatinib. El efecto fue mayor en los animales tratados con la combinación (275).

Respecto a sorafenib (inhibidor de múltiples receptores tirosín quinasa usado fundamentalmente en carcinoma renal avanzado, hepatocarcinoma y carcinoma papilar de tiroides) tenemos los resultados de un estudio fase II donde se trataron dieciocho pacientes con TCGNS politratados (con una mediana de tres líneas previas) con sorafenib 400mg dos veces al día hasta progresión o toxicidad inaceptable. Se obtuvo una disminución de los marcadores tumorales en ocho pacientes, con estabilidad radiológica en tres de ellos durante más de 350 días, aunque no se obtuvo ninguna respuesta objetiva (297).

6. ANTI-PD1

El receptor de muerte programada 1 (PD-1, CD279) se expresa en la superficie de células T activadas, células B y macrófagos. Su ligando, PDL1 (B7-H1, CD274), se expresa en células tumorales, macrófagos, células T y otros ciertos tipos de tejidos (298). La interacción de estas dos moléculas regula la respuesta inmune de forma negativa, por lo que la expresión PDL1 es una vía importante por la que las células tumorales suprimen la actividad inmune antitumoral en el microambiente tumoral.

Existen dos estudios principales cuyos resultados nos sugiere que la inhibición de checkpoints inmunes puede tener un papel relevante en el tratamiento de los TCG. Uno de ellos es el estudio de Fankhauser et al. (2015), que reportó una mayor expresión de PDL1 en los TCG (fundamentalmente en teratomas) que en tejidos testiculares normales (73% en seminomas, 64% en no seminomas y, sin expresión en su precursor (NCGIS) ni en tejido testicular normal). Este estudio, además, añade un posible valor pronóstico a la expresión PDL1 en dichos pacientes, asociando una alta expresión PDL1 a peores características clínicas y resultados en

supervivencia (299). El otro estudio es el de Cierna et al. (2016), quien obtuvo un 76% de expresión PDL1 en seminomas y un 89% en no seminoma, asociando también características de peor pronóstico a la expresión PDL1 (incluyendo ≥ 3 sitios metastásicos, marcadores tumorales elevados y/o metástasis viscerales no pulmonares). En este último estudio, los pacientes con PDL1 bajo (score < 10 (basado en la extensión e intensidad de la tinción)) obtuvieron mejores resultados en SLP (HR 0.4, 95% CI: 0.16 – 1.01, $p = 0.0081$) y SG (HR 0.43, 95% CI: 0.15 – 1.23, $p=0.0397$) que aquellos con PDL1 más alto (score ≥ 10). En el análisis multivariante, la expresión PDL1 sólo se asoció de forma independiente con la SLP (independientemente de la clasificación IGCCCG). En este estudio, a diferencia del estudio de Fankhauser, la subpoblación con niveles más altos de PDL1 eran los coriocarcinomas (300).

Zschäbitz et al. (2017) revisó retrospectivamente los pacientes con TCG refractarios tratados con anti-PD1 (nivolumab o pembrolizumab). De siete pacientes, cuatro pacientes progresaron rápidamente tras el primer ciclo y tres pacientes recibieron al menos seis meses de tratamiento con anti-PD1. De estos tres pacientes respondedores, un paciente (tras cuatro ciclos de quimioterapia a altas dosis-autotrasplante de células madres, así como, GOP) presentó una pseudoprogresión tras dos ciclos de pembrolizumab por lo que continuó con nivolumab hasta un número de diez ciclos, que fue cuando se confirmó la progresión. En el momento de la publicación, este paciente aún seguía vivo (tras diecinueve meses de iniciar el tratamiento anti-PD1). No se puede concluir en este paciente si esa lenta evolución es fruto de la efectividad del tratamiento anti-PD1 recibido, o bien, de una lenta evolución tumoral basal. En los otros dos pacientes respondedores, sí que se observó una larga respuesta tumoral. Uno de ellos, con PDL1 60% y tras varias recaídas previas (inclusive HDCT-ASCT), recibió 7.6 meses de nivolumab y en el momento de la publicación continuaba con el mismo. El otro paciente, con PDL1 70% y no candidato a tratamiento con HDCT-ASCT, tras varios tratamientos previos (incluyendo GOP y sunitinib) recibió pembrolizumab junto con etopósido; tras tres meses se suspendió etopósido y se continuó con pembrolizumab en monoterapia. Este último paciente tras el ciclo número quince continuaba manteniendo una respuesta casi

completa. Al mes número dieciséis se decidió suspender el tratamiento y observar, y cuatro meses tras la interrupción el paciente progresó y se reinició nuevamente pembrolizumab (301).

También existen datos negativos con anti-PD1, como los resultados de un estudio en el que se incluyeron doce pacientes con TCGNS refractarios, de los que únicamente dos pacientes eran PDL1 positivos. Se trataron con pembrolizumab y ningún paciente consiguió una tasa de respuesta objetiva. Sólo dos pacientes obtuvieron estabilidad de la enfermedad, en la semana veintiocho y diecinueve (ambos PDL1 negativos), aunque con elevación progresiva de marcadores tumorales (302).

Estos datos nos llevan a considerar los inhibidores de checkpoints inmunes como potenciales tratamientos efectivos en pacientes con TCG seleccionados. Para aportar más evidencia a estos resultados, está en marcha el ensayo clínico fase II con pembrolizumab (NCT02499952) en pacientes con TCG refractarios y el ensayo clínico de la combinación de ipilimumab con nivolumab en pacientes con tumores raros (NCT02834013).

7. INHIBIDORES DE CICLINAS

Aunque los TCG indiferenciados (como los carcinomas embrionarios) apenas expresan pRB, los TCG más diferenciados como los teratomas han demostrado presentar altos niveles de expresión de pRB (72,73). Luego la inhibición selectiva de CDK 4/6 pudiese tener un papel en la inhibición de teratomas en crecimiento.

Tenemos disponibles los resultados de los ensayos clínicos fase I y II de Vaughn et al. (2009) con inhibidores de ciclinas. En el ensayo clínico fase I tres pacientes con teratomas en crecimiento irresecales recibieron palbociclib. El primer paciente recibió 150mg/día durante 21 días en ciclos de 28 días, consiguiendo estabilidad tumoral durante 18 meses. El segundo paciente, que recibió 200mg/día durante 14 días en ciclos de 21 días, obtuvo una respuesta parcial durante más de 22 meses. El tercer paciente, con 125mg/día durante 21 días en ciclos de 28 días, obtuvo estabilidad de la

enfermedad durante más de 24 meses (303). Es decir, estos datos ponen de manifiesto que probablemente la inhibición de las ciclinas 4/6 tenga su papel en aquellos tumores de células germinales con expresión de pRB.

En otro ensayo clínico fase II, se administró a veintinueve pacientes con TCG refractarios, incurables y con expresión de pRB por IHQ, palbociclib oral 125mg/día durante 21 días en ciclos de 28 días. El objetivo primario fue la SLP a las veinticuatro semanas, alcanzándose con una tasa del 28 % (90% CI: 15% - 44%). De los once pacientes con teratomas, cinco estaban libres de progresión a la semana veinticuatro (uno de ellos con afectación del sistema nervioso central y médula espinal) y, a la semana ochenta aún tres pacientes con teratomas estaban libres de progresión. De los diez pacientes con teratomas con transformación maligna, dos estaban libres de progresión a la semana veinticuatro y de los ocho pacientes con TCG no teratoma, sólo un paciente alcanzó la SLP a la semana veinticuatro. La mediana de SLP en el grupo de pacientes con teratomas, teratomas con transformación maligna y TCG no teratoma fue de 23, 18 y 5 semanas, respectivamente. A pesar de estos resultados prometedores en la población de teratomas con o sin transformación maligna, no se obtuvo ninguna tasa de respuesta objetiva según criterios RECIST en la población global. La toxicidad fue principalmente hematológica, fundamentalmente neutropenia (43% grado 3/4), aunque sólo un paciente presentó una neutropenia febril y fue no complicada (304).

8. INHIBIDORES PARP

Aún no tenemos resultados de ensayos clínicos con la inhibición de esta vía en TCG, únicamente los datos preclínicos del estudio de Guggenheim et al. (2008), donde una población celular con carcinoma testicular (NTera2) tuvo una alta sensibilidad a la inhibición de PARP-1 (305).

Está en marcha un ensayo clínico que trata con olaparib a pacientes con TCG refractarios (NCT02533765), cuyos resultados nos ayudará a conocer mejor el papel de esta vía en estos pacientes.

9. MET/HGF

La expresión de MET se ha detectado por IHQ en un 67% de los TCG. A partir de estos datos, surge la idea del posible efecto antitumoral de una diana anti-MET. Ya tenemos disponibles los datos del ensayo clínico fase II con tivantinib (anti-receptor tirosínquinasa MET), en el que se trató a veintisiete pacientes con TCG (93% no seminoma) refractarios con tivantinib 360mg dos veces al día. De veinticinco pacientes evaluables, no se obtuvo ninguna tasa de respuesta objetiva, la mejor respuesta fue estabilidad tumoral en cinco pacientes. La mediana de SLP fue de un mes, la tasa de SLP a la semana doce fue del 21% y la mediana de SG fue de seis meses. El fármaco fue bien tolerado, exceptuando una neumonía grado 3 y un síncope grado 3. En este estudio, sin embargo, sólo seis pacientes expresaban MET y además de forma muy débil (+1) (ninguno tenía una alta expresión MET (+3)) (306). Luego para próximos estudios habría que tener en cuenta la expresión MET como criterio de inclusión.

10. CD30

Los linfomas de Hodgkin, linfomas anaplásicos de células grandes y carcinomas embrionarios se caracterizan histopatológicamente por la expresión de CD30. Brentuximab es un anticuerpo conjugado formado por un anticuerpo monoclonal dirigido contra CD30 (inmunoglobulina G1 [IgG1] quimérica recombinante, producida mediante tecnología de ADN recombinante en células de ovario de hámster chino) que se une de forma covalente a MMAE (agente antimicrotúbulos monometil auristatina E). Este fármaco fue aprobado en 2011 para el tratamiento del linfoma de Hodgkin

recidivante. Actualmente se investiga dentro del ensayo clínico fase II (NCT01851200) de Necchi A et al. (2016), en el que se han publicado los datos de nueve pacientes con TCG refractarios CD30+ tratados con brentuximab 1.8mg/kg iv trisemanal. De estos pacientes, tres pacientes habían recibido dos líneas previas y el resto al menos tres líneas previas. Se obtuvo un 22.2% de tasa de respuesta objetiva (una respuesta completa y una respuesta parcial (superior al 80%)), una disminución del 44% de los marcadores tumorales tras el segundo ciclo, pero sin embargo la SLP a los tres meses fue solo del 11% (95% CI: 0.6 - 38.8) y la SG a los seis meses del 85.7% (95% CI: 33.4 - 97.9). No hubo discontinuaciones en el tratamiento por toxicidad. Además de la actividad antitumoral, se observó un efecto inmunomodulador con reducción de las células T activadas, granulocitos y células dendríticas maduras, así como un aumento de células dendríticas inmaduras (307).

Disponemos también de los resultados del ensayo clínico fase II de Albany et al. (2013) (NCT01461538), en el que se trató con brentuximab a tres pacientes con carcinoma embrionario CD30 positivos politratados (dos pacientes como tratamiento de cuarta línea y uno como tratamiento de tercera línea). Un paciente consiguió una respuesta parcial bioquímica (mediante β HCG) y radiológica tras dos ciclos, con posterior progresión; otro paciente obtuvo tras dos ciclos una respuesta parcial radiológica pulmonar y mediastínica (manteniendo los marcadores negativos desde el inicio) y el tercer paciente consiguió una respuesta bioquímica con estabilidad radiológica a los dos ciclos (308).

V.DISCUSIÓN





Los tumores de células germinales testiculares son el tumor sólido más frecuente en varones adolescentes y adultos jóvenes y, constituyen uno de los tumores malignos con más alta tasa de curación debido a su alta sensibilidad a la quimioterapia basada en platino, de forma que sólo un 3 - 5% de los pacientes con TCGT morirán directamente por el tumor (19–21). Sin embargo, los pacientes que recaen tras segunda línea de tratamiento tienen un pronóstico desfavorable, sin opción curativa cuando no es posible la resección quirúrgica (309). De forma que el 15-20% del global de pacientes metastásicos no dispondrán de opciones terapéuticas curativas, de ahí la importancia del desarrollo de terapias diana en este grupo de pacientes (6,271).

Las terapias con fármacos frente a dianas específicas están modificando el paradigma del tratamiento de múltiples tumores sólidos tras la selección de los pacientes que pueden beneficiarse. Tras una exhaustiva revisión bibliográfica, en el caso concreto de los TCG, dado el escaso número de pacientes que recaen y la heterogeneidad de la población, parece que ninguna terapia diana ha demostrado una razonable efectividad (6). La ausencia de información al respecto podría deberse, en primer lugar, a la diversidad de subtipos histológicos en los tumores de células germinales, en segundo lugar, a la dificultad para reclutar un número suficiente de pacientes en los ensayos clínicos debido al bajo porcentaje de pacientes con TCG refractarios y, en tercer lugar, a que son pacientes altamente pretratados y de mal pronóstico. Todo ello conduce a que los resultados con terapias diana que se han llegado a observar en modelos preclínicos raramente se han trasladado a un beneficio en la práctica clínica. El futuro de la investigación radica en una adecuada selección de los pacientes basado en un perfil molecular concreto que permita identificar factores pronósticos de recaída, predictivos de respuesta y de resistencia a fármacos diana.

Tras lo anteriormente expuesto, en este trabajo se planteó realizar un estudio focalizado en encontrar un modelo de expresión génica diferencial que permitiese seleccionar, de forma más fidedigna, pacientes con TCGT con una alta tasa de recaída, con mayor sensibilidad y especificidad que los datos anatomopatológicos pronósticos convencionales. Para homogenizar



la muestra, el estudio se ha centrado en tumores no seminoma sin tratamiento adyuvante tras orquiectomía. De esta forma, se podrían identificar a los pacientes con TCGNS con un alto riesgo de recaída, a los cuales administrar tratamiento quimioterápico adyuvante disminuyendo la probabilidad de recaída y, por tanto, el riesgo de pertenecer en un futuro al grupo de pacientes metastásicos que recaen más allá de la segunda línea, donde las opciones terapéuticas curativas son escasas y la terapia diana está en fases muy precoces de investigación con datos desfavorables en la mayoría de los casos.

Respecto a los TCGNS estadio I, el 70% se curan con sólo orquiectomía (2). Este hecho junto a la supervivencia causa específica a largo plazo superior al 99% (146,147), hace que la administración de un tratamiento adyuvante en toda esta población suponga el sobretratamiento de un subgrupo demasiado amplio. Por lo que hasta día de hoy, la actitud a seguir tras orquiectomía se basa en el riesgo de recaída basado en factores anatomopatológicos. El factor predictor de enfermedad micrometastásica más ampliamente validado es la infiltración linfovascular y, en segundo lugar, la predominancia del subtipo histológico carcinoma embrionario (2,146,147,150–152).

Los TCGNS estadio I sin ningún factor de riesgo (generalmente en función de la presencia o ausencia de infiltración linfovascular) se consideran de bajo riesgo, con una tasa de recaída del 10 - 14% tras orquiectomía. La mayoría de las guías recomiendan en estos casos vigilancia activa. En el caso de TCGNS estadio I con infiltración linfovascular (asociado o no a la predominancia de carcinoma embrionario), se consideran de alto riesgo, presentando en la mayoría de los estudios un riesgo de recaída del 50% aproximadamente (2,146,147,150–152). En este subgrupo, son opciones tras orquiectomía equiparables en tasas de supervivencia, el tratamiento quimioterápico adyuvante, la linfadenectomía retroperitoneal y la vigilancia activa. El tratamiento adyuvante quimioterápico supondría el sobretratamiento del restante 50% que no recaerán a pesar de ser TCGNS estadio I de alto riesgo. El tratamiento quimioterápico adyuvante más ampliamente aceptado es BEP un ciclo, el cual reduciría la tasa de recaída a

por debajo del 10% en la mayoría de los estudios, mientras que BEP dos ciclos lo reduciría a por debajo del 3% (181). No se ha llegado a comparar directamente BEP uno vs dos ciclos, por lo que desconocemos hasta qué punto es beneficioso disminuir más aún la tasa de recaída con BEP dos ciclos, teniendo en cuenta la excelente supervivencia causa específica en ambos casos y la posible mayor toxicidad a largo plazo con dos ciclos de BEP adyuvante. Teniendo en cuenta que la mayoría de las recaídas de los TCGNS estadio I se presentan con elevación de marcadores tumorales y tienen lugar mayoritariamente en los dos primeros años, con una mediana de tiempo a la recaída de 6.3 meses, hace bastante factible la opción de la vigilancia activa tanto en el subgrupo de bajo como de alto riesgo, siempre y cuando el paciente conozca el beneficio y riesgo de la vigilancia activa, las posibles complicaciones de un tratamiento adyuvante y que sea capaz de adherirse a un seguimiento estrecho.

1. *Revisión en la literatura de estudios de expresión génica en TCG*

En los últimos años, el desarrollo biotecnológico ha permitido desarrollar firmas de expresión génica pronósticas y predictivas de respuesta en distintos tipos de tumores malignos, sin embargo, en el caso de los TCG aún está en fases precoces de investigación debido a la baja incidencia de los TCG y la amplia variedad de subtipos histológicos, aún sin evidencia científica suficiente como para su aplicabilidad en la práctica clínica habitual.

Los modelos de expresión génica en TCG como factores de mal pronóstico y/o predictores de respuesta se han centrado en pacientes con estadios avanzados, sin existir hasta la fecha ningún modelo publicado con pacientes con TCGT con únicamente estadios iniciales. El estudio de Korkola et al. (2015) identificó un modelo de expresión génica predictivo de respuesta en los pacientes con TCG avanzados tratados con esquema de quimioterapia basada en platino. Se identificó 14 regiones genómicas relacionadas negativamente (excepto una) con la SLP a 2 años. Estas regiones incluían la ganancia del cromosoma 14 y pérdida en los cromosomas 1, 4 y 9, incluyendo los siguientes genes: ACTN1, ALDH6A1,

CPEB2, DLST, FBXL5, PGF, MED6, SGPP1 y SYNPO2. Este modelo clasificó correctamente al 64 – 79.6% de los pacientes en el grupo de validación (54 TCGNS), siendo uno de los factores pronósticos independientes en el análisis multivariante. Cuando se usó este modelo en los pacientes de alto riesgo (intermedio/mal pronóstico según IGCCCG) se encontraron diferencias significativas en supervivencia, de forma que esta firma génica podría tener utilidad en la estratificación de los pacientes con TCG de alto riesgo (210).

En otro estudio se identificaron 140 genes relacionados con la supervivencia global a 5 años en la muestra de entrenamiento (compuesta por 74 TCGNS), clasificando correctamente al 90% de los pacientes del set de validación (34 TCGNS). De estos genes, obtuvieron un modelo de 10 genes (STX6, CFLAR, FNBP1, ITSN2, SYNE1, MAP3K5, PTGDS, PXMP2, IRAK4, RABGAP1L) con una exactitud predictiva de 0.66 en la cohorte de entrenamiento y un índice de concordancia del 0.83 en la corte de validación. Aquellos pacientes en los que se predijo mejores resultados, tuvieron supervivencias más largas (<0.001). En este estudio se observó que los genes relacionados con la respuesta inmune se expresaban en mayor medida en los pacientes con buen pronóstico, incluyendo los genes relacionados con las células T (ITGB2, CXCL12, PTPRC, SYK), células B (BLNK, IGKC, IGJ, IGHM, IGHA1, IGL, IGKV1-5, IGLV23-25), activación del complemento (C1S, C1R, C7) y otras funciones inmunes (IL6R, IFI16, MNDA, TNFSF13B, HLA-DPA1). Por el contrario, los genes relacionados con la diferenciación celular se expresaban en mayor medida en los pacientes de peor pronóstico (BMP7, NRCAM, MDK, SOX11, OTX2, ZIC1, PCDHB14, PLXNA2) (207).

La aplicación de estos modelos génicos predictivos en la práctica clínica habitual para la evaluación clínica de los pacientes con TCGNS avanzados, podría mejorar la predicción de los resultados a los tratamientos así como identificar posibles terapias diana efectivas. Sin embargo, hasta día de hoy no disponemos de un modelo de expresión génica que nos permita identificar aquellos pacientes con TCGNS estadio I sometidos a orquiectomía y con alto riesgo de recaída, con mayor sensibilidad y

especificidad que el factor anatomopatológico más ampliamente aceptado hoy día, la infiltración linfovascular, la cual predice un 50% de recaída aproximadamente cuando está presente.

Respecto a la predicción de la recaída desde el punto biomolecular, solo disponemos de los datos del microARN 371. Por un lado, Dieckman et al. (2019) estudió el papel de la presencia del microARN 371 en plasma en 258 varones controles y 616 varones con TCG (257 TCGNS, 359 TCGS) estadio I (n=371), con enfermedad avanzada (n=201) o en recaída a un tratamiento previo (n=46). En el diagnóstico inicial del TCG, la expresión en sangre de microARN 371 presentaba una sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo del 90.1%, 94% y 97.2% en la predicción de la enfermedad tumoral, mientras que AFP, β HCG y LDH mostraron una sensibilidad solo ligeramente superior al 50% en TCGNS. En todos los subtipos histológicos, excepto en teratomas, los niveles de expresión de microARN 371 se relacionaban con el estadio, carga tumoral y respuesta al tratamiento (310).

Por otro lado, Nappi et al. (2019) estudió los niveles de expresión de microARN 371 en una cohorte de 111 pacientes con historia previa o con diagnóstico de novo de TCG. El 96% de los casos con enfermedad tumoral activa (44/46) expresaban microARN 371. Con una mediana de seguimiento de 15 meses, la especificidad, sensibilidad, valor predictivo positivo y negativo de la expresión de microARN 371 en plasma para la presencia de enfermedad tumoral activa fue del 100%, 96%, 100% y 98%, respectivamente (311). Esto posiciona a microARN 371 en los TCG como un marcador tumoral más fidedigno que los clásicos (LDH, AFP, β HCG).

Por tanto, la determinación de microARN 371 en los pacientes con TCGT sometidos a orquiectomía podría tener su utilidad en la detección de aquellos pacientes con un estadio superior a I y, en consecuencia, con enfermedad tumoral activa y por ello candidatos a un tratamiento quimioterápico adyuvante con un riesgo ínfimo de sobretratamiento en la población que nunca recaerán (valor predictivo positivo del 100% según el estudio de Nappi). También la determinación de microARN 371 podría tener su papel en la determinación de la viabilidad tumoral tras un tratamiento

quimioterápico en pacientes con TCGT en recaída, pudiendo evitar la cirugía de rescate de masas residuales.

Hasta día de hoy, sin embargo, no se ha realizado ningún estudio centrándose en la búsqueda de un modelo génico que prediga el riesgo de recaída de los TCGNS estadio I tras orquiectomía de forma más fidedigna que con los factores anatomopatológicos conocidos, permitiendo una mejor estratificación del riesgo de recaída secundario al mejor conocimiento de la biología molecular del tumor. De este modo se evitarían toxicidades a corto y largo plazo (cardiovascular, esterilidad, segundas neoplasias) asociadas a un tratamiento quimioterápico o quirúrgico complementario a la orquiectomía, junto a la disminución de los costes económicos y mejora de la calidad de vida de los pacientes.

2. *Discusión de los resultados obtenidos del estudio de expresión génica en TCGNS*

En este trabajo, se ha seleccionado una cohorte homogénea de pacientes (TCGNS estadio I sin quimioterapia adyuvante) estudiando una gran cantidad de genes (730) en cada paciente, teniendo en consideración las características anatomopatológicas como la infiltración vascular y presencia de carcinoma embrionario. La infiltración linfovascular sólo estaba presente en cuatro pacientes (tres de ellos sin recaída y uno con recaída), debido a que cuando estaba presente la práctica totalidad de los pacientes optaban por el tratamiento quimioterápico adyuvante para reducir el riesgo de recaída y con ello la no posibilidad de su inclusión en este estudio.

En la mayoría de los casos, la presencia de carcinoma embrionario reflejaba en los informes anatomopatológicos como presente/ausente, sin cuantificarse porcentajes dentro de los TCGNS mixtos. Coincidiendo con la literatura, en nuestro estudio se observa una mayor tendencia a la presencia de carcinoma embrionario en los pacientes con recaída, muestra de ello es que estaba presente en el 100% de los TCGNS mixtos con recaída y en el 82% de los TCGNS mixtos sin recaída y, además el 100% de los TCGNS

puros con recaída estaban formados por carcinoma embrionario versus el 67% de los casos sin recaída.

En cada uno de los 54 pacientes con TCGNS incluidos (28 sin recaída y 26 con recaída) analizamos, mediante el modelo PanCancer, la expresión génica de los 730 genes de las principales rutas canónicas del cáncer (MAPK, STAT, PI3K, RAS, Notch, HedgeHog, ciclo celular, apoptosis, Wnt, reparación de daños del ADN, regulación transcripcional, modificación de la cromatina y TGF- β). En el análisis de expresión diferencial no encontramos ningún gen con expresión diferencial entre el grupo recaída y no recaída, de forma estadísticamente significativa, pero sin embargo sí encontramos un conjunto de genes que se aproximaban a la significación estadística y parece ser que ejercen un papel clave en el desarrollo y diseminación de los TCGNS (AKT3, BAIAP3, ZBTB16, RASGRP1, KIT, IL13RA2, ITGA3, ACVR1B, TGFB3, HHEX, CCNA1, NR4A1, PLA2G10, FGF7, GADD45A, MMP9, TGFB2, RRAS2, CDC7, CCNB1).

3. Discusión de los resultados obtenidos del estudio de red de coexpresión

Por otro lado, obtuvimos un modelo constituido por 31 genes con expresión diferencial homogénea en los grupos recaída y no recaída, pudiendo por tanto formar dichos genes parte de una red de coexpresión relacionada con la recaída en los pacientes con TCGNS ($p=0.003$), con una correlación con la recaída de 0.39. Este 0.39 es un valor significativo e importante, teniendo en cuenta el gran número de genes analizados, el pequeño tamaño muestral, que sólo fue analizada una variable (recaída sí vs no) y el carácter multifactorial de las recaídas (interviniendo multitud de factores, no sólo la coexpresión de estos genes). De los 31 genes del modelo de red de coexpresión destacan aquellos con una correlación individual con la recaída igual o mayor a 0.39 (equivalente a la correlación del modelo global con la recaída) (FOSL1, PLA2G10, CCNA1, PIK3CB, RRAS2, IL13RA2). Además, cinco de los treinta y un genes del modelo de red de coexpresión presentan una expresión diferencial próxima a la recaída

(IL13RA2, CCNA1, PLA2G10, GADD45A y RRAS2). Como podemos observar, de los cinco genes del modelo de red de coexpresión con expresión diferencial próxima a la significación cuatro presentan una correlación individual con la recaída superior a 0.39.

Merece mayor detenimiento el estudio de FOSL1, gen de nuestra red de coexpresión con mayor correlación con la recaída (0.43, $p=0.001$) y cuarto gen en importancia dentro del modelo de nueve genes obtenido con el análisis bioinformático. FOSL1 es el gen codificante de la proteína Fra-1 (antígeno relacionado con FOS1), localizado en el cromosoma 11 (11q13.1) y miembro de la familia de factores de transcripción AP-1 (complejo activador de proteína 1), los cuales están implicados en la proliferación, diferenciación y apoptosis celular. Las proteínas FOS (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2) pueden solo heterodimerizar con miembros de la familia Jun, y tanto los homodímeros Jun como los heterodímeros Jun-FOS pueden regular la transcripción de genes a través de su interacción con el ADN, aunque los heterodímeros Jun-FOS son más estables que los homodímeros Jun y, por tanto, más eficientes en el control transcripcional. Las proteínas de Jun y FOSL1 pueden formar el complejo AP-1, donde FOSL1 es la proteína predominante que contribuye a la actividad de AP-1. Miembros de la proteína FOS tienen un papel fundamental en la proliferación y diferenciación celular de tejidos normales, así como, en la transformación y progresión tumoral. La función de AP-1 se ha relacionado principalmente con la proliferación y progresión tumoral, a través de la activación MAPK (312,313) pero hay evidencia creciente de que AP-1 puede tener también un importante papel en la muerte celular (314). AP-1 se une a regiones promotoras de genes específicos, convirtiendo señales extracelulares en cambios en la expresión génica (315).

FOSL1 es un protooncogén, que se encuentra normalmente ausente en las células epiteliales normales y cuya sobreexpresión puede tener un papel esencial en la carcinogénesis de múltiples carcinomas, incluyendo el adenocarcinoma de colon, ovario, mama, SNC, tiroides, cabeza y cuello, pulmón y esófago (316–320). La sobreexpresión de Fra-1 provoca una reducción de la apoptosis, a través del incremento del potencial de la



membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), la disminución de ROS (reactive oxygen species) y de las concentraciones de calcio iónico (321).

En el carcinoma de mama, FOSL1 afecta a la morfología y motilidad celular, así como al potencial invasivo de las células. En un estudio con 70 carcinomas de mama y 30 lesiones benignas de mama, se observó que Fra-1 se encontraba sobreexpresada en el núcleo en todas las muestras de carcinoma. En la mayoría de los fibroadenomas también se expresaba pero en este caso tanto en el núcleo como en el citoplasma y el número de células positivas fue menor que en el caso de los carcinomas, mientras que el tejido normal mamario no mostró ninguna expresión de Fra-1. Esto pone de manifiesto el importante papel de Fra-1 en el proceso de transformación celular, pudiendo ser considerado como un marcador útil de neoplasias mamarias e hiperplasias (322). La alta expresión de Fra-1 se ha asociado en el carcinoma de mama con un fenotipo más agresivo, como son los casos con receptores estrogénicos negativos y los casos más indiferenciados (323).

En tejidos con carcinoma gástrico, la sobreexpresión de Fra-1 se ha relacionado con la infraexpresión de PI3K/AKT y p53, así como con la sobreexpresión de MDM2 (murine double minute 2), activando mecanismos comunes de las células neoplásicas para la proliferación y evasión de la muerte celular programada (324). Como vemos, FOSL1 también se encuentra muy relacionado con las vías de expresión de otros genes encontrados en nuestro estudio con expresión diferencial próxima a la significación (AKT3, $p=0.06$) y constituyentes de la red de coexpresión relacionada con la recaída en nuestro trabajo (FOSL1 0.43, $p=0.001$; PIK3CB 0.42, $p=0.002$).

Otros estudios han demostrado una relación entre Fra-1 y el carcinoma de ovario, observando una sobreexpresión de hasta 100 veces en las células transformadas (325), sugiriendo que FOSL1 podría relacionarse con el carcinoma de ovario a través de su papel con la motilidad y adhesión celular (318,326).

Respecto al mesotelioma, cambios en la composición de AP-1 está relacionado con el desarrollo del mesotelioma inducido por asbesto, y únicamente Fra-1, de todos los miembros de la familia FOS, se ha relacionado con su aparición (concretamente su sobreexpresión) (327). La expresión de Fra-1 en las células de mesotelioma es complejo, estando regulada por las quinasas de señalización extracelular ERK1/2, Src y PI3K (328).

En el carcinoma de pulmón, la exposición a tóxicos ambientales (fundamentalmente el tabaco) provoca la sobreexpresión de Fra-1 en las células epiteliales bronquiales (requiriendo la vía EGFR-MAPK). Fra-1 participa también en la transformación de carcinoma microcítico de pulmón a no microcítico (329) y se encuentra sobreexpresada en las células neoplásicas de pulmón en 3.76 veces ($p < 0.01$) en comparación con las células normales adyacentes (330).

En el carcinoma colorrectal, la señalización desde RAS a Fra-1 tiene lugar a través de RAF, MEK y las quinasas de señalización extracelular ERK1/2. Estas quinasas son capaces de fosforilar Fra-1, protegiéndola de la degradación proteosómica (331). Fra-1 provoca en el carcinoma colorrectal incremento de la motilidad e invasión celular, cambios morfológicos e inactivación de la integrina $\beta 1$, sin afectar directamente a la proliferación celular. SIRT1 (silent mating type information regulation 2 homolog 1) está relacionado positivamente con la expresión de Fra-1, así como con las metástasis y supervivencia global en pacientes con carcinoma de colon, regulando la transición epitelio-mesénquima. De esta manera, la sobreexpresión de SIRT1 se asocia, entre otros, a peor pronóstico en el cáncer de colon (332,333,333).

Centrándonos en la piel: en la capa basal de la epidermis Fra-1 es el miembro principal de la familia FOS, en la capa espinosa Fra-1, FosB y c-Fos se encuentran expresados y en la capa granulosa c-Fos y Fra-2 son las proteínas principales encontradas de la familia FOS. Luego en etapas precoces de la carcinogénesis de tumores de piel, se requiere principalmente Fra-1 (334).

Fra-1 también se encuentra sobreexpresada en el carcinoma escamoso de cabeza y cuello, esófago, gliomas de alto grado, cáncer de páncreas altamente agresivo y carcinoma de próstata (315,335,336). Por el contrario, en el carcinoma de cérvix Fra-1 actúa como gen supresor tumoral, encontrándose infraexpresado en las células neoplásicas en relación a las células adyacentes normales (337,338).

Respecto a la fosfolipasa A2 (PLA2), aunque se ha asociado con diversos procesos biológicos, su papel en el desarrollo del cáncer permanece desconocido y existen mínimos datos publicados sobre su papel en procesos oncológicos. En un estudio con 142 pacientes con carcinoma de colon, se observó que la baja expresión de PLA2G3 y alta de PLA2G10 se asociaba a unas mayores tasas de supervivencia ($p=0.038$), luego PLA2G3 y PLA2G10 podrían jugar un papel opuesto en la carcinogénesis del carcinoma de colon (339).

Según nuestros resultados, destacamos también la familia de proteínas denominadas quinasas dependientes de ciclinas, las cuales juegan un papel central en la conducción de la célula a través del ciclo celular (340,341). La regulación del ciclo celular es importante para el normal crecimiento y diferenciación celular, por lo que su disregulación puede llevar al crecimiento descontrolado y aparición de tumores (342). Aunque algunas de estas ciclinas son supresores tumorales, la mayoría de ciclinas actúan como oncogenes cuando se altera su expresión (343).

La ciclina A1 (CCNA1) se expresa fundamentalmente en testículos y en células progenitoras hematopoyéticas, mientras que la expresión es muy baja en el resto de tejidos (344). En los ratones con pérdida de CCNA1, sólo se ha observado infertilidad. Disponemos de datos que nos sugieren el papel supresor tumoral de CCNA1, como son: CCNA1 se encuentra infraexpresada en varios cánceres, como carcinoma nasofaríngeo y escamoso de cabeza y cuello (345–347), juega un papel importante en la

reparación del ADN de doble hebra (348) y su promotor, al igual que varios genes supresores tumorales, se encuentra hipermetilado frecuentemente en el carcinoma de colon y de cabeza y cuello (345,349). La expresión de CCNA1 se ha relacionado con la activación de TP53, de hecho en tumores de cabeza y cuello se ha observado una relación inversa entre la hipermetilación del promotor CCNA1 y el estado mutacional en TP53 (345).

La hipermetilación de la ciclina A1 podría ser un potencial marcador de diagnóstico precoz del carcinoma de cérvix invasivo, a raíz de un estudio con 43 muestras de células sanguíneas, 25 células normales del cérvix, 24, 5 y 30 muestras con lesiones asociadas a papilomavirus en cérvix premalignas, microinvasivas e invasivas, respectivamente. En las células normales y lesiones con carcinoma intraepitelial de bajo grado, no se observó metilación de ciclina A1, mientras que en las muestras con lesiones intraepiteliales de alto grado, lesiones microinvasivas e invasivas, la metilación fue del 36.6%, 60% y 93.3%, respectivamente (350).

Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en los tumores previamente expuestos, en el cáncer de próstata se ha encontrado una mayor expresión de CCNA1 en comparación con el tejido adyacente normal, relacionándose con la invasión y metástasis, a través de una correlación significativa entre la expresión de CCNA1 y MMP2 (metaloproteinase 2), MMP9 (metaloproteinase 9) y VEGF en 482 pacientes con cáncer de próstata ($p < 0.001$) (351).

Por otro lado, la vía de señalización PI3K (phosphatidylinositol 3`-kinase) es esencial en muchos procesos celulares que pueden promover la transformación de células normales a células tumorales. Existen ocho genes PI3Ks en mamíferos divididos en tres clases (clase I, II y III) en función de su estructura, substrato de preferencia, distribución tisular y mecanismos de activación (352–354). Las proteínas PI3K clase I (p110 α (PI3KCA), p110 β (*PI3KCB*) y p110 δ (PI3KCD)) son críticas en el crecimiento, motilidad y supervivencia celular, donde p110 α es la isoforma implicada en la mayoría de los carcinomas. PI3KCA y PI3KCB se localizan en el brazo largo del



cromosoma 3 (3q25-27) (355). La alteración en esta vía es una de las vías más frecuentemente activadas en el cáncer, y ocurre frecuentemente por pérdida de la actividad supresora tumoral PTEN o por mutaciones somáticas activadoras de PI3K clase I, fundamentalmente PIK3CA (356–361). Estas mutaciones provocan la activación de AKT, mTOR y S6K (ribosomal protein S6 kinase), lo cual se observa comúnmente en las células cancerosas. PTEN inhibe la vía PI3K, por lo que PTEN en los tumores comúnmente se encuentra mutado, con deleciones o reprimido epigenéticamente (362,363). En presencia de pérdida de función PTEN parece que PIK3CA no tiene papel en la vía PI3K ni en el crecimiento ni supervivencia celular, mientras que PIK3CB es la quinasa crítica que conduce la activación de la vía PI3K, así como al crecimiento y supervivencia celular (364,365). PI3K interactúa con RAS y puede ser activada directamente tras la unión de RAS a p110 (366–368). Sólo con estos datos del papel de PIK3CB en la tumorigénesis y que es uno de los genes más altamente relacionados con la recaída en nuestro estudio, formando parte del modelo de red de coexpresión, aunque no disponemos de datos publicados sobre su papel en los TCGT probablemente sí que tenga un papel clave en su desarrollo y diseminación, sin disponer aún de dicha confirmación debido a la rareza de los TCGT y los pocos estudios al respecto.

Respecto a la familia de genes RAS, asociada a GTPasas, está relacionada con 36 genes y compuesta por tres miembros: RRAS, RRAS2 y RRAS3. Se clasifica en 21 subfamilias, de las que únicamente la subfamilia clásica RAS (HRAS, NRAS y KRAS), así como, RRAS2 presentan mutaciones relacionadas con los tumores malignos en humanos (369). De los tres miembros de esta familia, RRAS2 es la que se asemeja a RAS en mayor medida (55-60% de similitud proteica) (370), pero mientras que RAS ejerce su actividad proliferativa a través de la activación de las vías RAF-ERK de MAPK, RRAS2 parece apenas activar esta vía y ser un fuerte activador de la vía PI3K (371,372). He aquí la correlación existente, según los datos publicados, entre RRAS2 y PI3K, concordantes con los resultados



obtenidos en nuestro estudio, donde ambos forman parte del modelo de red de coexpresión.

Tanto RRAS como RRAS2 se expresan ubicuamente, mientras que RRAS3 sólo se expresa en el SNC. En un estudio con 90 muestras de tumores del SNC, RRAS2 se observó sobreexpresada en todas las muestras, incluyendo glioblastomas, astrocitomas y oligodendrogliomas, pero en mayor medida en tumores de bajo grado (G1-2) sugiriendo que RRAS2 se sobreexpresa en estadios tempranos de la carcinogénesis. Mientras que RRAS y RRAS3 no se expresan diferente entre células de menor grado o premalignas y las células tumorales de alto grado, de forma significativa (373). Mutaciones en RRAS2 se ha encontrado en leiomiomas, cáncer de mama y cáncer de ovario y sobreexpresada (wild type) en carcinoma de mama, piel, esófago, estómago y cavidad oral (374–381).

También es importante mencionar el papel del microambiente tumoral, puesto que en los tumores malignos la diseminación y aparición de metástasis depende de una amplia gama de interacciones en el microambiente tumoral (382,383) y parte de estas interacciones dependen de citoquinas y sus receptores, luego es fundamental determinar la expresión de estas citoquinas en las células metastásicas. Las citoquinas están producidas por múltiples células, incluyendo fibroblastos, células endoteliales y epiteliales, como células cancerosas, las cuales expresan su receptor asociado a proteína G. La activación de esta proteína G desencadena varias vías de señalización como PLC- β , PI3K y MAPK, que juegan un papel en la adhesión, migración y supervivencia de las células cancerosas (384).

La interleuquina 13 (IL13) es una citoquina inmunoreguladora y antiinflamatoria, producida por múltiples células del sistema inmune como células B, T, natural Killer y células dendríticas y, que se ha asociado a asma, enfermedades autoinmunes y condiciones inflamatorias (385,386). Diversos tumores sólidos sobreexpresan el receptor de IL13 (IL13R), el cual

está constituido por tres subunidades: IL13RA1, IL13RA2 e IL4R2. IL13 se une a IL13RA2 con 50 veces mayor afinidad que con IL13RA1, activando la vía ERK/AP-1, asociada a mayor expresión de metaloproteasas de la matriz extracelular (MMP), induciendo TGF β e incrementando las metástasis (387,388). IL13RA2 se ha encontrado sobreexpresado en tumores del SNC, tumores de cabeza y cuello, carcinoma de células renales, hepatocarcinoma, sarcoma de Kaposi asociado al síndrome de inmunodeficiencia, y se ha relacionado con la invasión, metástasis y peor pronóstico en carcinoma colorrectal, ovario, mama y gástrico (389–391).

En un estudio con 68 muestras de carcinoma de ovario y 13 de tejidos ováricos normales, se observó que IL13RA2 se encontraba sobreexpresada en el 83% de los carcinomas de ovario y en la mayoría de los carcinomas de células claras de peor pronóstico, a diferencia de las células normales del ovario que presentan una nula o muy baja inmunotinción para IL13RA2. Esta interleuquina además disminuía sus niveles detectados en plasma de ratones con carcinoma de ovario tras el tratamiento oncológico. Además, IL13RA2 parece relacionarse con el subtipo histológico, encontrándose una mayor sobreexpresión en los carcinomas de células claras (75%) (392). Por otro lado, los carcinomas de ovario con IL13RA2 positiva parecen metastatizar más precozmente a ganglios linfáticos y peritoneo que los pacientes con IL13RA2 negativa. En la invasión y metástasis del cáncer es necesario la degradación de la matriz extracelular y el aumento de expresión de las MMP, por lo que la expresión de MMP es generalmente baja en los tejidos normales y aumenta cuando se induce la remodelación de la matriz extracelular, luego MMP está relacionada con la capacidad de invasión y metástasis de los tumores malignos, concretamente a través de AP-1 (393,394). Aquellos pacientes con IL13RA2 positiva o metastásicos en ganglios linfáticos expresan mayores niveles de MMP y mayor activación de la vía ERK1/2.

El factor transcripcional AP-1 está regulado por varias vías como MAPK. Las quinasas reguladoras de la señalización extracelular son una de las principales componentes de la vía MAPK, luego la activación anormal de ERK está asociada con las metástasis en tumores (390,395–397). De esta



forma, IL13RA2 podría tener un papel importante en la tumorigénesis del carcinoma de ovario, crecimiento y metástasis, pudiendo usarse para monitorizar la respuesta al tratamiento y evolución de dicho carcinoma.

En un estudio con 1283 carcinomas invasivos de mama, se observó IL13RA2 expresado en el 10.8%, estando asociado a la positividad para receptores de estrógenos ($p < 0.001$) y de progesterona ($p < 0.001$), así como con el subtipo luminal ($p < 0.001$). Parece relacionarse además con unas peores tasas de SLP. En el análisis multivariante, IL13RA2 constituía uno de los factores de mal pronóstico independientes del carcinoma de mama luminal ($p=0.03$) (398,399).

IL13RA2 se ha asociado a peores resultados en otros tipos de tumores, como: en el carcinoma gástrico tras gastrectomía se ha asociado como factor pronóstico independiente, con peores tasas de SG ($p < 0.001$) (390); en pacientes con glioblastoma multiforme, la inhibición de IL13R2A se ha asociado a unas tasas inferiores de proliferación (400); en el carcinoma de colon está en relación con la capacidad de adhesión celular, migración, invasión y metástasis, con estadios más avanzados y peores resultados en supervivencia (391); en el cáncer de páncreas la expresión de IL13RA2 es mayor en las células metastásicas en comparación con las células del tumor primario (401).

Aunque igualmente no disponemos de datos publicados hasta la fecha sobre el papel de IL13RA2 en TCGNS, a parte de ser unos de los genes más relacionados con la recaída en nuestro estudio, se encuentra estrechamente relacionado con la activación de PI3K, MAPK y complejo de transcripción AP-1 (donde el principal componente es FOSL1), otros de los componentes más altamente relacionados con la recaída en pacientes con TCGNS según nuestros resultados.

Y, por último, GADD45A (growth arrest and DNA damage-induced 45, alpha), localizado en el cromosoma 1 (1p31.2-31.1), está altamente conservado en todas las especies (402) y codifica una proteína inducida en

situaciones de estrés celular y genotóxico, incluyendo ionización, radiaciones ultravioletas, así como, varios agentes quimioterápicos. GADD45A presenta múltiples funciones interfiriendo en el arresto del ciclo celular, estabilidad genómica, reparación por escisión de nucleótidos, accesibilidad a la cromatina y apoptosis (403–405). Está compuesta por tres miembros: Gadd45 α (GADD45A), Gadd45 β (GADD45B) y Gadd45 γ (GADD45G). Se cree que los tres miembros juegan un papel importante en la regulación de la reparación del ADN, proliferación celular y apoptosis (406,407). Por tanto, la pérdida de la regulación de GADD45 probablemente tenga un papel importante en la tumorigénesis.

GADD45A puede regular también la actividad de la matrix extracelular, cuyas alteraciones pueden promover la migración e infiltración de las células tumorales, y a la inversa, también disponemos de datos que sugieren que la sobreexpresión de MDM2 podría interferir en el adecuado funcionamiento de GADD45A (408,409). No sólo MDM2 puede regular la función de GADD45A, sino que existen múltiples factores de transcripción que pueden regular su expresión, como BRCA1, WT1, Oct-1, NF-YA, ATF4, AP-1, c-myc, ZBRK1 y Jun D (402,410–412).

En el cáncer de mama GADD45A está regulado principalmente por la expresión de dos proteínas supresoras tumorales, p53 y BRCA1, actuando en la regulación de la transición de la fase G2 a la fase M del ciclo celular, en la apoptosis y en la reparación del ADN. En situaciones de estrés genotóxico, p53 activa la transcripción de GADD45A, mientras que en ausencia de daños en el ADN, BRCA1 reprime GADD45A (403,405,406).

La disregulación de GADD45A permite a las células escapar de la muerte celular programada en múltiples tumores (413), siendo un indicador de mal pronóstico, como se observa con las siguientes publicaciones: el polimorfismo 1506T>C de GADD45A se ha asociado con el riesgo de cáncer de ovario ($p < 0.001$, OR 1.71. CI 95% (1.28 – 2.29)), así como factor pronóstico en el mismo (405,414); la pérdida de inducción de GADD45A tras la radioterapia se ha relacionado con una mejor respuesta clínica (415); en carcinoma ductal invasivo de páncreas su sobreexpresión se ha relacionado



con un peor pronóstico (416). A partir del estudio de Dong et al. (2007) con 59 pacientes con cáncer de páncreas, se observó que GADD45A y p53 pueden contribuir en el comportamiento biológico maligno del cáncer de páncreas (con una mediana de supervivencia peor en el grupo de pacientes con GADD45A y p53 positivos, en comparación con aquellos con GADD45A y p53 negativos ($p > 0.05$)) (417), datos que se confirman en otro estudio donde GADD45A contribuye a la proliferación y viabilidad del adenocarcinoma ductal de páncreas (418).

En el cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) encontramos un efecto contrario, donde los niveles de expresión de ARNm son diez veces menor en las muestras con CPCNP respecto al tejido pulmonar normal ($p < 0.001$), mientras que la alta expresión de GADD45A intratumoral en el CPCNP se ha asociado con un peor grado histológico ($p=0.041$) (419). Lo mismo ocurre en hepatocarcinoma y glioblastoma, donde la expresión de GADD45A está frecuentemente disminuida (413,420).

4. *Discusión de los resultados obtenidos del análisis bioinformático*

Analizando los datos obtenidos en nuestro estudio con herramientas más potentes, fundamentalmente en el caso de un alto número de variables (730 genes) con escaso número de muestras (54 pacientes), se llevó a cabo el análisis bioinformático encontrando un modelo de expresión génica capaz de predecir la recaída con AUC de 0.8, formado por los nueve genes MPL, Col24a1, NRA41, FOSL1, CREB5, FANCB, LAMB4, ZBTB16 y CALML3 (ordenados por orden de importancia, de mayor a menor (según voto mayoritario)), sin poder determinar su relación positiva o negativa con la recaída al usar tanto modelos lineales como no lineales en el análisis. Destacar que cuatro de estos nueve genes, forman parte la vía canónica del cáncer PI3K. Además, destaca FOSL1, el cual forma parte del modelo de red de coexpresión relacionado significativamente con la recaída (0.43 correlación con la recaída, $p=0.001$; contribución del gen al modelo de red de coexpresión 0.77, $p=9.65 \times 10^{-12}$) y NRA41 y ZBTB16, los cuales presentan

una expresión diferencial entre ambos grupos (recaída y no recaída) próxima a la significación estadística ($p=0.08$ y $p=0.06$, respectivamente).

Por otro lado, con el análisis estadístico t student se observó que tanto FOSL1 como ZBTB16 presentaban diferentes medias de expresión estadísticamente significativa entre los pacientes con recaída y sin recaída, evaluando cada gen independientemente al resto (FOSL1 $p=0.001$, 95% CI: 55.04 – 207.93); ZBTB16 $p=0.005$, 95% CI: (-117.20) – (-22.84)).

En primer lugar, merece centrarnos en el único gen de todos los encontrados en los distintos análisis del estudio con el que existen datos publicados de su relación directa con los tumores de células germinales testiculares, ZBTB16. El gen ZBTB16 o PLZF es el único de nuestro modelo de nueve genes del que existen publicados datos con implicación directa en el desarrollo de los tumores de células germinales testiculares. Se localiza en el cromosoma 11 (11q23.2), se identificó por primera vez con la traslocación t (11; 17) en la leucemia promielocítica aguda (421) y codifica un factor de transcripción de la familia “BTB-ZF” (422). La proteína codificada se denomina PLZF (“promyelocytic leukemia zinc finger”), la cual participa en la progresión del ciclo celular interactuando con histonas desacetilasas (HDAC). El reclutamiento de HDAC puede resultar en represión génica, aunque PLZF también puede activar la expresión génica (423,424).

Las proteínas de la familia “BTB-ZF” disponen de un papel importante en la apoptosis, diferenciación, desarrollo celular, transcripción, supresión tumoral y oncogénesis (425). Los miembros oncogénicos de esta familia incluyen PLZF, el receptor de ácido retinoico, BCL-6 (linfoma de células B 6) y FBI-1 (factor que se une al virus de inmunodeficiencia humana 1) (421,426,427).

La adecuada expresión de los genes BTB-ZF es esencial en el adecuado funcionamiento del sistema inmune, alterándose dramáticamente la función y el fenotipo de los linfocitos con la expresión anómala de estos factores de transcripción (428).

Durante una infección, las células T específicas del patógeno se expanden clonalmente, se diferencian en células efectoras y migran a los tejidos infectados para eliminar el patógeno. Posteriormente queda una población de linfocitos de memoria nuevamente inactivos, pero que difiere de las células T vírgenes (naïve) en el fenotipo, expresando generalmente niveles más altos del receptor de ácido hialurónico, CD44 y receptores de citoquinas como CD122 y, disponiendo cuando se vuelven a estimular de mayor nivel proliferativo y de producción de citoquinas como IFN- γ (429). Dentro de la población de células T, hay otros subconjuntos de células T que desempeñan una función importante durante el desarrollo. Estos subconjuntos incluyen las células T reguladoras (Treg), células T natural killer (NK) y células T invariantes asociadas a la mucosa (MAIT). Dichas células pueden producir rápidamente citoquinas tras la estimulación y poseen funciones múltiples, siendo a veces conflictivas en procesos de autoinmunidad (430,431).

En el sistema inmune, la expresión de ZBTB16 se encuentra únicamente en las células innatas, siendo esencial en el desarrollo y función de las células T NK, linfocitos de respuesta inmadura, linfocitos T invariantes asociados a mucosa y células T $\gamma\delta$ (432). La activación de PLZF provoca la activación de factores de transcripción como T-bet, FoxP3, ROR γ T, GATA3 y otros factores importantes en la diferenciación de las células T naïve en células T efectoras, de hecho la producción de IL-4 por las células T que expresan el factor de transcripción PLZF interviene en el desarrollo de las células T CD8+ (433). PLZF es altamente específico de las células T innatas, concretamente de las células NK $\alpha\beta$ y NK $\gamma\delta$ T (434–436), y no puede ser inducido en las células T convencionales vía activación del receptor de células T (TCR) ni por cambios inflamatorios (437). Otras publicaciones contradictorias sí han indicado que PLZF podría ser inducido por una fuerte expresión de TCR (438,439).

PLZF es esencial en casi todas las características diferenciadoras de las células T natural Killer, incluyendo su rápida y potente respuesta al antígeno. Con la ausencia de expresión de PLZF, la potente y rápida respuesta de las células inmunes NK se pierde. Además, las células T NK con expresión



deficiente de PLZF se asemejan en muchos aspectos a las células T naïve CD4 (435,436). Características únicas que diferencian las células T NK de las células T convencionales son la subunidad TCR α invariante, presencia de marcadores NK, capacidad de co-secretar IFN- γ e IL-4, entre otras citoquinas, y los gránulos de granzima citotóxica B preformados (440). Por tanto, la ausencia de PLZF no afecta de manera medible a las células T convencionales pero sí a las células T NK, las cuales no adquirirían sus funciones efectoras innatas y presentarían comportamientos similares a las células T convencionales (436).

Esta expresión altamente restringida de PLZF es esencial en el mantenimiento de la funcionalidad de las células T innatas, así como, en la prevención de la respuesta inmune impredecible/descontrolada por las células T convencionales. La expresión de PLZF se presenta en las células hematopoyéticas inmaduras y va disminuyendo su expresión progresivamente en la diferenciación (441), de esta manera la pérdida de PLZF cambia las células madres con capacidad de autorenovación a células diferenciadas a costa de la pérdida de la autorenovación, dicho de otra forma, PLZF mantiene el estado indiferenciado en las células en las que se expresa.

ZBTB16 afecta a diversas vías de señalización incluyendo el ciclo celular, diferenciación y apoptosis celular en células hematopoyéticas y en tumores sólidos. Existe una correlación inversa entre la expresión de PLZF y cKIT en las células madres normales o progenitores hematopoyéticos CD34+ durante las fases tempranas de la eritropoyesis y en leucemias mieloides agudas. PLZF se encuentra sobreexpresado en las células progenitoras hematopoyéticas CD34+ quiescentes, y rápidamente se infraexpresa durante las fases tempranas de la diferenciación eritropoyética (442). PLZF interactúa con los factores de transcripción GATA-1 y GATA-2 para regular la proliferación y diferenciación de células normales y leucémicas (423,443).

Es evidente una correlación entre el envejecimiento y el cáncer, probablemente debido a la acumulación de múltiples cambios genéticos a lo largo del tiempo (444), sugiriéndose que las células madres (con capacidad

de autorenovación) son la fuente de gran diversidad de tumores. Sin embargo, la pérdida de supresores tumorales como PTEN y PML pueden desencadenar el agotamiento de las células madres. Los factores que regulan el equilibrio entre la autorenovación y la diferenciación de células madre aseguran la homeostasis de los tejidos, mientras que la interrupción de estos mecanismos reguladores puede conducir a la degeneración de los tejidos o al cáncer (445). Un factor central en la homeostasis de las células madres es el complejo 1 de mamíferos TOR (mTORC1), el cual es un complejo de señalización que promueve la traducción de proteínas y el crecimiento celular (446). La regulación de mTORC1 está en relación con diversos estímulos como la disponibilidad de nutrientes, estado energético, factores de crecimiento y estrés celular. La activación persistente de mTORC1 en ciertos tejidos conduce a una mayor proliferación, con el consecuente posterior agotamiento de células madre, lo que pone de manifiesto que mTORC1 activado de manera aberrante es perjudicial para el mantenimiento de las células madre, con mecanismos subyacentes poco definidos (447–449). Las células espermatogónicas con pérdida de expresión PLZF, mejoran la actividad de mTORC1 y de ahí la capacidad proliferativa.

ZBTB16 está involucrado en procesos biológicos importantes, como la espermatogénesis, mantenimiento de células madre, formación de extremidades, hematopoyesis, regulación inmune y tumorigénesis (433,450–455). La deficiencia de PLZF provoca una expresión mayor de citoquinas inflamatorias, generando respuestas inflamatorias excesivas a estímulos infecciosos. Concretamente PLZF regula la densidad de la cromatina a través de la actividad de histonas desacetilasas, reprimiendo genes de respuesta inflamatoria (456).

La espermatogénesis es un proceso que ocurre dentro de los túbulos seminíferos de los testículos por el cual miles de espermatozoides se producen diariamente a partir de las espermatogonias (457,458). El proceso desde las espermatogonias hasta los espermatozoides tarda aproximadamente 64 días en humanos e interactúa estrechamente con las células de Sertoli, únicas células somáticas en los túbulos seminíferos.



Fuera de los túbulos, las células de Leydig, los nervios y los vasos sanguíneos también aportan señales sistémicas que modulan la espermatogénesis (457). Las células de Leydig intersticiales producen testosterona, necesaria para la normal espermatogénesis y el desarrollo de las características fenotípicas masculinas (457–459). Recíprocamente, la interrupción de la actividad espermatogónica también puede causar una secreción anormal de testosterona por las células de Leydig (455), lo que indica que la adecuada espermatogénesis es importante para todo el eje reproductor en los hombres. Durante la fase mitótica, las espermatogonias proliferativas y la autorenovación continuada dan lugar a dos subpoblaciones de células germinales (células germinales diferenciadas y células madres), siendo la expresión de KIT el factor que marca el proceso de diferenciación espermatogónico. De hecho, la proliferación del espermatogonio está estrechamente controlada por el receptor tirosín quinasa KIT (460,461).

En la esparmatogonia indiferenciada, PLZF (regulador del estado epigenético de las células indiferenciadas) se coexpresa con Oct4, el cual se requiere en el mantenimiento de las células madres embrionarias totipotentes (462–464). PLZF no solo desempeña un papel importante en el desarrollo de las extremidades y esqueleto axial (465), sino también es esencial para el adecuado equilibrio entre el mantenimiento y diferenciación de las células madres del testículo (455,466). Aquellos seres vivos sin expresión de PLZF, o mutantes luxoides, presentan una falta progresiva de espermatogonias en los túbulos seminíferos, un proceso espermatogénico deteriorado y, en consecuencia, una disminución en la producción de espermatozoides maduros, provocando infertilidad (467).

La expresión de PLZF es baja durante el desarrollo de las células germinales embrionarias y alcanza su punto máximo en los testículos postnatales, donde se expresa predominantemente en las células progenitoras. A diferencia del patrón de expresión de KIT en los testículos, PLZF se detecta por primera vez unos días antes del nacimiento, en el compartimento de células germinales, y posteriormente se mantiene en las células espermatogónicas de crecimiento lento. De esta forma, PLZF se expresa en espermatogonias positivas para Oct4 pero KIT negativas. En



testículos de neonatos, Oct4 y PLZF se co-expresan en las células madres espermatogónicas y en espermatogonias indiferenciadas (455,466). Las células madres, somáticas y germinales, disminuyen con la edad (468), lo que conlleva a un menor potencial de las células espermatogónicas para aliviar el estrés genotóxico (469). PLZF es indispensable en el mantenimiento de las espermatogonias, muestra de ello es que su sobreexpresión de forma aberrante conlleva al agotamiento de las espermatogonias y a un fenotipo similar al testículo envejecido, con mayor número de túbulos seminíferos degenerativos desprovistos de células germinales (455,466,470). Además, la expresión de PLZF provoca la represión transcripcional de KIT, considerándose este uno de los mecanismos por los que PLZF mantiene el conjunto de células madres espermatogónicas (471). Pocos genes dianas se han identificado en la inhibición de PLZF, como la ciclina A2, c-myc, HoxD11, Pbx1 y genes VLA4 (472–476).

Aunque el papel de ZBTB16 en la espermatogénesis está bien documentado, aún no se ha definido claramente su papel en los tumores de células germinales. Se han identificado nuevos marcadores de células germinales como NANOG, SOX2 y SALL4, sin embargo, estos marcadores carecen de especificidad para los subtipos de tumores de células germinales individuales (477–480) y además su expresión puede perderse en metástasis o después del tratamiento (481). La α -fetoproteína es un marcador tradicional para el tumor del saco vitelino, sin embargo, su sensibilidad es limitada y la tinción es con frecuencia irregular, con un 60% aproximadamente de positividad en los casos de tumor del saco vitelino (482). También se expresa en el carcinoma embrionario y teratoma y, además la tinción de aquellos tumores positivos se puede perder tras el tratamiento o en las metástasis. Glypican-3 es un marcador sensible identificado más recientemente para el tumor del saco vitelino (483,484), sin embargo, también se ha llegado a detectar en carcinoma embrionario, coriocarcinoma y teratoma, así como, en algunos tumores distintos a los de células germinales (482–485).



En un estudio con 67 tumores de células germinales adultas (62 tumores testiculares de células germinales, 2 tumores del saco vitelino ovárico, 1 tumor del saco vitelino mediastínico y 2 tumores del saco vitelino metastásico retroperitoneal), de los que 34 eran TCGT puros y 28 TCGT mixtos (de los 62 primarios testiculares), se encontró que el subtipo histológico saco vitelino o yolk sac expresaba ZBTB16 en todos los casos (n=15), independientemente de que se encontrase asociado a otros subtipos histológicos o no. Importante son estos resultados teniendo en cuenta que entre todos los subtipos histológicos de tumores de células germinales, el tumor del saco vitelino (el cual posee varios patrones histológicos), es el elemento más comúnmente infradiagnosticado (486–488), y con frecuencia se necesitan marcadores diagnósticos auxiliares para facilitar su diagnóstico. El resto de tumores sin presencia de este subtipo histológico no expresaban ZBTB16, incluidos seminoma (n=27), carcinoma embrionario (n=21), teratoma (n=17), coriocarcinoma (n=4) y neoplasia de células germinales in situ (n=35).

En cuanto a la expresión celular de ZBTB16 en los testículos, se observó en distintas situaciones lo siguiente (489):

- Las espermatogonias primarias ubicadas a lo largo de la membrana basal de los túbulos seminíferos no neoplásicos fueron fuertemente reactivas para ZBTB16 en todos los casos.
- En cuanto a las células del estroma del cordón espermático, las células de Sertoli y células de Leydig fueron negativas para ZBTB16 (ocasionalmente podía haber alguna tinción citoplasmática).
- Los apéndices testiculares fueron negativos para la expresión de ZBTB16.
- Ninguna de las NCGIS expresaba ZBTB16.
- En cuanto a los tumores de células germinales, todos los subtipos histológicos fueron negativos en la expresión de ZBTB16 excepto el tumor del saco vitelino, algunos tumores espermatocíticos y el tumor carcinoide.



Dentro del tumor del saco vitelino, los patrones microquísticos, mixoides y reticulares parecen tener el mayor porcentaje de células con tinción ZBTB16 en comparación con los patrones glandulares y papilares.

Si excluimos el tumor espermatocítico y el carcinoide, los cuales son tumores testiculares extremadamente raros y es poco probable que se confundan morfológicamente con el tumor del saco vitelino, la especificidad de la inmunotinción ZBTB16 para el tumor del saco vitelino entre los tumores de células germinales es del 100%. Y si se incluyen estas dos raras entidades, la especificidad de ZBTB16 para el tumor del saco vitelino baja al 96%. La sensibilidad de ZBTB16 en la detección del tumor del saco vitelino entre los tumores de células germinales fue del 100% (20/20). Por todo ello, ZBTB16 es un marcador altamente sensible y específico para el tumor del saco vitelino (489).

Como se ha comentado previamente, la pérdida de PLZF se ha relacionado con un mayor índice de proliferación, invasión y motilidad celular, así como, de resistencia a la apoptosis en diferentes tipos de células neoplásicas. La sobreexpresión de PLZF puede también inducir la detención del ciclo celular en la transición de la fase G1 a la fase S y reprimir la expresión de genes proliferativos como ciclina A, CCNA2 y myc (490), por lo que también puede presentar función supresora. Esta función supresora se ha observado en melanoma, carcinoma de cérvix, CPCNP, mesotelioma maligno y en algunas leucemias (452,454,491). En estos casos, PLZF puede aumentar la expresión de p21 a través de la represión de c-myc (475).

En cuanto al adenocarcinoma de próstata, en un estudio con 83 muestras de tumores primarios, 43 muestras de adenocarcinomas metastásicos y 8 muestras tanto de tumores primarios como metastásicos, se observó que PLZF se expresaba fuertemente en todas las células luminales benignas (n=77) y en adenocarcinomas de bajo grado (Gleason 3) (n=70). Por lo contrario, la expresión estuvo ausente o débil en las células basales y del estroma (n=70), disminuida o ausente en el 26% de los adenocarcinomas primarios de próstata de alto grado (Gleason 4 – 5) (n=70) y en el 84% de los adenocarcinomas metastásicos, independientemente de la localización

de las metástasis (n=43). Luego este estudio pone de manifiesto que la infraexpresión de PLZF es un proceso molecular importante en la progresión tumoral, siendo la pérdida de expresión de PLZF un prometedor biomarcador de agresividad y metástasis en el adenocarcinoma de próstata (453). Además, en estudios in vitro se ha observado que PLZF es un gen prostático sensible a andrógenos (492).

Por otro lado, como se ha mencionado previamente, ZBTB16 también puede actuar como protooncogén dependiendo del tipo celular en el que actúe (493). Puede estimular la proliferación controlando la expresión de genes de la vía p53 (ARF, TP53 y CDKN1A). Se observó en un estudio que el porcentaje de células positivas para PLZF en tejidos normales de riñón, SNC y testículos era del 20.2 – 25.1%, mientras que dicho porcentaje en células de carcinoma renal de células claras, glioblastoma y tejidos de seminoma fue del 42.3 - 86.6%, lo que pone de manifiesto la sobreexpresión de PLZF en estas neoplasias malignas.

En condiciones normales, cuando las células se exponen a un estrés genotóxico, se induce p53 y se activa la transcripción de CDKN1A codificando p21. P21 inducido detiene la progresión del ciclo celular y permite que las células reparen el ADN dañado, o bien, que dichas células terminen en apoptosis. En el caso de sobreexpresión de PLZF, se inhibe la expresión de p53 y CDKN1A independientemente del estrés genotóxico (493).

Centrándonos ahora en el protooncogén MPL (localizado en el cromosoma 1p34.2) codifica una proteína llamada CD110, receptor de la trombopoyetina y miembro de la superfamilia de receptores hematopoyéticos, y su ligando es la trombopoyetina (TPO), principal regulador de la megacariocitopoyesis y trombopoyesis. La trombopoyetina y su receptor MPL, controlan la proliferación de múltiples tipos de progenitores celulares hematopoyéticos inmaduros, induciendo la proliferación clonal de células leucémicas. A pesar de esto no se ha visto relación entre la sobreexpresión de TPO-MPL y la agresividad o respuesta al tratamiento de la leucemia mieloide crónica (494).

MPL está asociado a enfermedades como la mielofibrosis, trombocitemia esencial y trombocitopenia amegacariocítica congénita. En un estudio con 557 pacientes con trombocitemia esencial, el 66% presentaron mutaciones en JAK2, el 21% en CALR y el 3% en MPL, no presentando el 11% ninguna afectación en ninguno de estos tres genes. Con una mediana de seguimiento de 105 meses, el 31% murió, el 8% progresó a mielofibrosis y el 3% presentó una transformación blástica. En el análisis multivariante, únicamente las mutaciones en MPL (HR 6.7, 95% CI 2.3–19.7, $p < 0.001$), la esplenomegalia palpable (HR 2.3, 95% CI 1.02–5.3, $p = 0.04$) y la anemia (HR 3.3, 95% CI 1.7–6.4, $p < 0.001$) se asociaron de forma independiente con la supervivencia. Esto permitió clasificar a los pacientes según el riesgo de transformación a mielofibrosis pot-trombocitemia esencial en bajo, intermedio y alto riesgo (1 punto para esplenomegalia, 2 para anemia y 3 para mutaciones en MPL) (495).

Aunque, como vemos, no existen datos publicados sobre el papel de MPL en los TCGT, el hecho de que la unión de la trombopoyetina a CD110, lleve a la dimerización de CD110, provocando la fosforilación tirosín-quinasa de las familias JAK, STAT, MAPK y proteína Shc nos puede hacer pensar que de forma indirecta sí que puede participar en la génesis/agresividad de los TCGT.

Datos similares (ausentes) en TCGT tenemos del gen Col24a1, localizado igualmente en el brazo corto del cromosoma 1 (1p.22.3). Este gen es miembro de la familia de genes del colágeno y se cree que regula la fibrillogénesis de colágeno tipo I durante el desarrollo fetal. Codifica una proteína denominada cadena de colágeno XXIV alfa 1, pobremente caracterizada, expresada predominantemente en el tejido óseo. Col24a1 es un marcador de diferenciación osteoblástica tardía (496), relacionado con la osteocondrosis.

Interesante es el papel de NR4A1 o Nur77, localizado en el brazo largo del cromosoma 12 (12q.13.13). NR4A1 forma parte de la subfamilia de receptores nucleares huérfanos 4A (NR4A), que lo forman NR4A1 (Nur77, TR3), NR4A2 (Nurr1) y NR4A3 (Nor1). Son genes de inducción temprana por el estrés y juegan un papel único y superpuesto a nivel del metabolismo, cardiovascular, neurológico, función inmune, inflamación y cáncer (497,498). Nur77 es una proteína inducible por hipoxia, no existiendo ARNm ni proteínas Nur77 en condiciones de normoxia. Al igual que ocurre con VEGF, HIF-1 α (hypoxia inducible factor) incrementa la expresión ARNm de Nur77, uniéndose al promotor, y tanto Nur77 como HIF-1 α incrementan la expresión ARNm de VEGF. HIF-1 α es un importante factor de transcripción en la regulación de la expresión de genes de angiogénesis, enzimas del metabolismo de la glucosa y proteínas transportadoras de oxígeno, todo ello crítico para el adecuado uso del oxígeno (499).

El receptor NRA41 es un protooncogén regulador de la proliferación celular, supervivencia y migración/invasión celular en el cáncer de pulmón, melanoma, linfoma, riñón, páncreas, colon, cervix, próstata, ovario y gástrico (500–506). Además, los ligandos que provocan inactivación de NR4A1, activan p53, inducen ROS, activan MAPK α e inhiben mTOR (506,507). La disminución de la expresión del receptor de NR4A1 por ARN de interferencia (ARNi) demostró que en la mayoría de los tumores sólidos actúa como proto-oncogén, regulando el crecimiento y supervivencia celular. Apoya esta afirmación, los resultados de un estudio en el que se observó que antagonistas de NR4A1 disminuyen el crecimiento celular en el cáncer de mama, tanto receptores estrogénicos positivos como negativos y en HER2 positivos (508). Por otro lado, las citoquinas inflamatorias inducen la expresión de NR4A1 en el cáncer de mama, luego su expresión está elevada en el cáncer de mama con alta infiltración inmune (509).

NRA41 es un fuerte activador de la vía del gen TGF- β , el cual es uno de los genes que encontramos con expresión diferencial próxima a la significación en nuestro estudio (TGFB3 con $p=0.08$ y TGFB2 con $p=0.09$). En condiciones normales, y en células premalignas, TGF- β mejora la homeostasis celular, suprimiendo la progresión tumoral a través de la



regulación celular de la apoptosis y arresto del crecimiento. Cuando las células cancerosas pierden la respuesta tumoral supresiva a TGF- β , pueden usar TGF- β como un potente promotor de la motilidad celular, invasión, metástasis y mantenimiento tumoral de las células madres (510). De hecho, TGF- β en tumores malignos avanzados actúa como proto-oncogén, considerándose una diana terapéutica, muestra de ello es el cáncer de mama, donde estimula la transición epitelio-mesénquima (EMT), migración, invasión y metástasis (246,511). NR4A1 es un fuerte activador de la vía TGF- β , luego la pérdida de NR4A1 inhibe la activación de TGF- β y, por tanto, la pérdida de NR4A1 en condiciones normales favorece la transición epitelio-mesénquima, migración, invasión y metástasis.

La familia de factores de transcripción E2F regula la expresión de diversos genes implicados en la proliferación celular. Es así, que el control de E2F está alterado en varios tumores malignos, poniendo de manifiesto el papel central de E2F en el control del ciclo celular. Únicamente E2F1 de la familia E2F, regula la apoptosis celular (512) y Nur77 puede inducir la expresión de E2F1 uniéndose a su promotor. Se ha descrito que tanto Nur77 como E2F1 tienen un papel importante en la regulación de la apoptosis en el carcinoma de próstata (513).

También es importante mencionar el papel de las integrinas, receptores heterodímeros de superficie celular (subunidad α y β), que juegan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis celular y en varias patologías. La integrina β 1 supone el subgrupo mayor del complejo de integrinas (514,515). La integrina β 1 interactúa con otras vías de señalización, activando múltiples genes implicados en la adhesión, migración e invasión celular y, está regulada por el protooncogén NR4A1. La infraexpresión de NR4A1 provoca la disminución de la proteína integrina β 1, disminuyendo la adhesión celular. En el carcinoma de colon y páncreas, la integrina β 1 está altamente expresada y actúa como un factor pronóstico negativo, con un papel central en la migración e invasión celular. Antagonistas de NR4A1 e integrina β 1 hacen su efecto en el núcleo y pueden provocar una inhibición de la adhesión y migración celular (516,517).



NR4A1 también tiene su papel en neoplasias de estirpe hematológica como en el linfoma de células del manto, donde no tiene actividad supresora tumoral aunque su inhibición mejora significativamente el papel de ibrutinib (inhibidor de la tirosina quinasa de Bruton (BTK)) en la inhibición de BTK, luego NR4A1 es un potencial oncogén en el linfoma de células del manto (518).

Por el contrario, en otras situaciones la infraexpresión de NR4A1 se ha relacionado con peores resultados en supervivencia libre de progresión y global, secundariamente a que Nur77 media la apoptosis en diversos tumores malignos en respuesta a un amplio abanico de agentes quimioterápicos. Se ha observado encontrarse sobreexpresado en los tumores estadio I e infraexpresado en un conjunto significativo de tumores metastásicos (519,520).

NR4A1 también está relacionado con AKT, otro de los genes encontrados en nuestro estudio con una expresión diferencial próxima a la significación estadística (AKT3 con $p = 0.06$). La translocación del ARNm de NR4A1 del núcleo al citoplasma (induciendo con ello la apoptosis), está regulado por la activación de JNK (c-Jun N-terminal kinase) e inhibición de AKT (521). En el caso del carcinoma epitelial de ovario, esta traslocación únicamente se ha observado en carcinomas de ovario platino sensible, no así en platino resistente. Por lo que, en los pacientes con carcinoma de ovario metastásicos platino resistentes encontramos una expresión de Nur77 significativamente menor o un aberrante secuestro nuclear (522). La sobreexpresión de NR4A1 también se ha asociado con una mayor tasa de apoptosis en linfomas agresivos, como linfoma difuso de células grandes B (LDCGB) y linfomas foliculares de alto grado (523).

Como podemos observar con lo comentado previamente, Nur77 es una diana viable para la regulación coordinada de la proliferación y apoptosis celular, actuando principalmente como protooncogén en los tumores sólidos, aunque puntualmente puede actuar como supresor tumoral, como se observa en determinados linfomas, leucemias y carcinoma de ovario platino resistente (521,524).



Respecto a CREB5, gen codificante de proteínas localizado en el cromosoma 7 (7p15.1-p14.3), modificaciones en su expresión y metilación se ha asociado con la red de genes de respuesta inflamatoria y los niveles de IL6, asociados a un aumento de la morbimortalidad en individuos de edad avanzada (525–527). Por otro lado, la infraexpresión de CREB5 en los monocitos puede incrementar los niveles de TNF- α , disminuir los niveles de IL-10 en las células plasmáticas libres y mejorar la expresión de NF- κ B, causando inmunosupresión (525,528). Este gen tiene funciones cruciales en la regulación del crecimiento celular, proliferación, diferenciación y regulación del ciclo celular, encontrándose sobreexpresado en varios tipos de neoplasias malignas humanas.

Recientemente varios estudios han demostrados que la sobreexpresión de CREB5 está relacionada negativamente con el pronóstico del carcinoma epitelial de ovario y carcinoma de pulmón no microcítico, así como, con la rapidez de aparición de metástasis (529,530). En un estudio con 125 carcinomas de ovario, se observó una correlación positiva entre los altos niveles de expresión de CREB5, el estadio FIGO y la afectación ganglionar pélvica ($p < 0.05$). Estos pacientes con sobreexpresión de CREB5 tenían peores tasas de supervivencia libre de progresión y global en comparación con aquellos con infraexpresión de CREB5 (529).

En el estudio de Seo et al. (2008) se estudiaron 310 pacientes con CPCNP, encontrándose en los pacientes nunca fumadores una peor supervivencia asociada a la sobreexpresión de la proteína CREB y CREB-fosforilada, incrementando el riesgo de muerte en un 73% ($p=0.02$) y 169% ($p=0.02$) respectivamente. En los exfumadores se encontraron también peores resultados en supervivencia, aunque menos marcados, con un incremento del riesgo de muerte del 28% ($p=0.39$) y 113% ($p=0.01$) respectivamente, mientras que en los fumadores activos este incremento no fue significativo ($p=0.41$ y $p=0.96$, respectivamente). El motivo del por qué afecta más a los nunca fumadores es incierto, aunque algunas explicaciones pueden ser que la supervivencia de las células neoplásicas en los nunca

fumadores depende fundamentalmente de CREB y otra explicación podría ser que los exfumadores o fumadores activos tienen factores de confusión predominantes a CREB en la supervivencia. Por tanto, la inhibición de CREB suprimió efectivamente el crecimiento de las células del CPCNP (531).

Los altos niveles de expresión de CREB5 también se han asociado con la agresividad y aparición de metástasis del cáncer de colon, a través de la sobreexpresión de genes que regulan la migración celular, fundamentalmente CSF1R, MMP9, PDGFRB, FIGF e IL6 (530).

Por otro lado, el gen *FANCB*, localizado en el cromosoma X (Xp22.2), se relaciona entre otras con la vía de la anemia de Fanconi y la reparación del daño del ADN por recombinación homóloga. Defectos en los genes de la vía de la anemia de Fanconi intervienen en la producción secundaria de múltiples alteraciones como inestabilidad genómica, defectos en la recombinación homóloga, hipersensibilidad a agentes lesivos del ADN, autofagia selectiva, defectos en la segregación cromosómica y aneuploidía, hipersensibilidad al estrés oxidativo y citoquinas inflamatorias y, problemas en el mantenimiento y replicación de los telómeros (338,532–535).

La anemia de Fanconi es una enfermedad autosómica recesiva, caracterizada por distintas manifestaciones clínicas, fallo de la médula ósea, hipersensibilidad a agentes lesivos de la doble hebra del ADN como mitomicina C diepoxibutano, cisplatino y melfalán, inestabilidad cromosómica y predisposición a tumores malignos (536,537). Defectos bialélicos se asocian a la anemia de Fanconi autosómica recesiva y defectos en un solo alelo se asocia a la herencia recesiva ligada al cromosoma X en los varones (538).

Algunos genes de la vía de la anemia de Fanconi se han asociado con una susceptibilidad moderada-alta de tumores (BRCA1/FANCS, BRCA2/FANCD1, BRIP1/FANCI, PALB2/FANCN, RAD51C/FANCO, XRCC2/RANCU) (539,540). Sólo tres genes de esta vía (FANCD1/BRCA2, FANCN/PALB2, FANCI/BRIP1) parecen estar infraexpresados en la

susceptibilidad del cáncer de mama y ovario hereditarios. FANCN y FANCI explican el 2% de los cánceres de mama y ovario hereditario no-BRCA1 ni BRCA2. Por lo que, como observamos, existe una importante conexión entre la vía de anemia de Fanconi y la vía BRCA (541). Al menos el 20% de los pacientes con anemia Fanconi desarrollan tumores malignos, siendo el más destacado la leucemia mieloide y, encontrándose también aumentada la incidencia de otros como carcinoma escamoso de cabeza y cuello, carcinoma escamoso ginecológico, neoplasias malignas de esófago, hígado, SNC, piel y tumores renales (542). No disponemos de datos sobre la participación de FANCB en el desarrollo/diseminación de los tumores germinales de testículo, pero dado su implicación en procesos claves celulares como la inestabilidad genómica, probablemente tenga un papel importante en su desarrollo, hasta el momento no conocido.

La importancia de la susceptibilidad genética interindividuos al cáncer se pone de manifiesto, entre otros, con el hecho de que sólo el 15% de los fumadores desarrollan un cáncer de pulmón (543,544). Polimorfismos genéticos en los genes de la vía de la anemia de Fanconi, se han asociado con el adenocarcinoma de pulmón, concretamente los genes FANCC y FANCD1 (BRCA2). Los individuos con un alto índice acumulado de tabaco están expuestos a un nivel mayor de agentes lesivos del ADN, con el secundario mayor riesgo de desarrollo de carcinoma de pulmón si tienen una habilidad subóptima para mantener la estabilidad genómica (540). La inactivación de los genes de la vía de la anemia de Fanconi, no sólo ocurre en la vía germinal en los pacientes con anemia de Fanconi, sino también existen cambios epigenéticos y mutaciones somáticas que ocurren en gran variedad de tumores malignos en la población global, lo cual tiene implicaciones en la sensibilidad y resistencia tumoral a agentes oncológicos convencionales, como los inhibidores de la vía PARP y otros inhibidores de la reparación del ADN. Hasta el momento, no hay evidencia de que las alteraciones en FANCB tengan consecuencias fenotípicas en los portadores heterocigotos.

Respecto al gen LAMB4, localizado en el cromosoma 7 (7q31.1), codifica una proteína denominada “subunidad β 4 de la laminina” (545). Se cree que la laminina interviene en la organización, unión y migración celular en los tejidos durante el desarrollo embrionario, a través de la interacción con otros componentes de la matriz extracelular. De hecho, la laminina es el componente principal de la matriz extracelular, proporcionando soporte estructural a los tejidos, facilitando la señalización extracelular entre células y favoreciendo la diferenciación celular (546,547). Además, durante el desarrollo embrionario la matriz extracelular potencia el desarrollo del sistema nervioso entérico (548), facilitando la regulación de la migración de las células de la cresta neural (549–552).

LAMB4 está selectivamente expresado en el tejido colónico, existiendo alteraciones en este gen en enfermedades que afectan al tejido gastrointestinal (553). Entre las enfermedades relacionadas con LAMB4 destaca la diverticulitis. El plexo mientérico inerva tanto las capas musculares longitudinales como circulares del intestino, actuando como regulador principal de la motilidad intestinal. De esta forma, alteraciones en LAMB4 puede llevar a alteraciones en la formación del plexo mientérico con alteraciones secundarias en la motilidad intestinal. La diverticulosis se caracteriza por la presencia de divertículos, herniaciones en la mucosa y submucosa del colon a través de la capa muscular. La inflamación de estos divertículos, supone la diverticulitis (554). En su desarrollo participan tanto factores ambientales como genéticos. Por tanto, alteraciones en la motilidad y presión de la luz intestinal contribuyen al desarrollo de los divertículos, por lo que alteraciones en LAMB4 puede contribuir y predisponer a la diverticulosis, como se ha observado con la variante D435N, variante de un solo nucleótido, que provoca un codón sin sentido (555), (556).

Por otro lado, la proliferación celular requiere calmodulina, una proteína reguladora de las enzimas dependientes de calcio que interviene en las vías de traducción de señal de las células eucariotas. Concretamente calmodulina es un sensor intracelular de calcio que participa en las vías de



señalización que regulan la mayoría de las actividades celulares como el crecimiento, proliferación y migración celular (557). El gen CALML3, localizado en el cromosoma 10 (10p15.1), codifica la proteína CLP, la cual es una proteína transportadora de calcio, que se encuentra en la mayoría de las células epiteliales (558). Comparte el 85% de la secuencia de 148 aminoácidos de la proteína calmodulina, pero parece diferenciarse significativamente en la actividad transportadora de proteínas. CLP tiene cuatro dominios de unión al calcio, pero una afinidad aproximadamente diez veces menor que calmodulina, además CLP interactúa con diferentes proteínas a aquellas con las que interactúa calmodulina (559).

CLP se expresa durante la diferenciación celular, por lo que se encuentra infraexpresada en los tumores malignos y en las células transformadas. Esta proteína no afecta a la tasa de proliferación celular, aunque sí afecta a la morfología de las colonias, otorgándole bordes irregulares, indicativos de aumento de la motilidad celular. La sobreexpresión de CLP aumenta la expresión de miosina-10, requiriéndose en etapas finales de la diferenciación epitelial. Se incrementa la función de miosina-10 a medida que las células migran hacia capas más altas y establecen nuevos contactos (560).

CALML3 se ha encontrado relacionado con el carcinoma de mama, de piel y otorrinolaringológico principalmente. Alteraciones en los genes supresores tumorales p53 y BRCA1 se han relacionado con el carcinoma de mama, pero no sólo estos genes están implicados. Calmodulina juega un papel importante en la progresión celular, de forma que aumentos en la concentración de calmodulina se asocia a una rápida progresión tumoral (561,562). En un estudio con 80 carcinomas de mama, se observó cómo la expresión de CLP se reducía significativamente en el 79 - 88% de los carcinomas ductal infiltrante, carcinomas lobulillar infiltrante y carcinomas in situ, en comparación con el tejido mamario normal adyacente. Esto apoya la hipótesis de CLP como proteína supresora tumoral, que se encuentra infraexpresada precozmente en el caso de progresión tumoral del cáncer de mama (563).



Respecto a la mucosa oral, en las regiones de transformación maligna CLP se encuentra infraexpresada y en las zonas de carcinoma la inmunorreactividad es completamente negativa. Luego la expresión de CLP puede servir como marcador de tejido sano y su infraexpresión como un predictor de transformación maligna (564).

En cuanto a la piel, CALML3 regula los queratinocitos durante la diferenciación celular, aumentando progresivamente desde la capa suprabasal hasta las capas granulocíticas/queratinizadas (558). La localización nuclear de CALML3 está inversamente relacionada con Ki67 en todas las afecciones de la piel, poniendo de manifiesto que la presencia nuclear de CALML3 se relaciona con la diferenciación celular terminal y estado postmitótico. Por lo que en el caso contrario, la pérdida nuclear de CALML3, indica progresión a un fenotipo proliferativo y potencialmente maligno (565).

5. *Curiosidades obtenidas*

Dato bastante curioso y llamativo de nuestro estudio, es el hecho de que dos de los pacientes murieron como consecuencia de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), uno de ellos sin recaída del TCGNS (paciente número 27) y otro con recaída tumoral (paciente número 6). La esclerosis lateral amiotrófica es un trastorno motor neurodegenerativo progresivo, con una etiología desconocida y una incidencia anual de 1.4 – 2.7 / 100,000. En el 2 – 5% de los casos son familiares, por mutaciones en el gen de la superóxido dismutasa (566). Tiene un curso progresivo, con un desenlace frecuentemente fatal. La debilidad muscular, atrofia y fasciculaciones son debidas a la afectación de la motoneurona inferior. Y secundariamente a la afectación de la motoneurona superior, aumentan los reflejos de estiramiento muscular y la espasticidad de las extremidades. El diagnóstico de ELA se establece fundamentalmente en base a criterios clínicos, aunque los estudios de conducción nerviosa y electromiografía pueden ayudar a confirmar el diagnóstico.

La presencia de ELA como síndrome paraneoplásico es muy raro, asociándose comúnmente a CPCNP, carcinoma de mama, síndrome linfoproliferativo, discrasias de células sanguíneas y carcinoma de células renales (567–570). En el caso de presentación como síndrome paraneoplásico, clásicamente se asocia a la presencia de anticuerpos onconeurales, de hecho situaciones que apoyan la asociación entre ELA como síndrome paraneoplásico y tumor maligno son: presencia de anticuerpos onconeurales, fundamentalmente anti-Hu, anti-Yo, anti-CV2 y anti-Ri y, una relación conocida entre la neoplasia y la ELA como síndrome paraneoplásico (270). Es importante tener en cuenta esta pequeña relación entre ELA y neoplasias malignas, ya que ayuda al diagnóstico precoz de la neoplasia, un tratamiento en etapas más tempranas y en consecuencia la posible mejoría de la sintomatología o incluso resolución de la ELA (347,349,350).

En el paciente número 27 no se determinaron los anticuerpos onconeurales de ELA, al no considerarse la ELA como un síndrome paraneoplásico del TCGNS, presentando cursos independientes. Respecto al paciente número 6 desconocemos si se realizó o no estudio de anticuerpos paraneoplásicos, aunque en este paciente la ELA y el TCGNS presentaron cursos evolutivos independientes. Aunque no disponemos de un estudio de anticuerpos onconeurales en estos dos pacientes, dado la baja incidencia tanto de la esclerosis lateral amiotrófica como de los TCGNS, la presentación de dos casos de ELA en nuestra cohorte de 54 pacientes con TCGNS indica que pudiera existir una asociación entre ambas entidades patológicas no descrita al menos en la literatura científica.

6. *Limitaciones del estudio*

Respecto a las limitaciones principales de este estudio, destaca el carácter retrospectivo y el número de casos incluidos en comparación con la gran cantidad de genes estudiados. No obstante, la baja incidencia de los TCGT y la inclusión de sólo TCGNS estadio I sin tratamiento adyuvante, lleva a que el tamaño muestral pueda ser considerado adecuado.

7. *Directrices futuras*

Tras los resultados obtenidos merece validar en una cohorte mayor de pacientes, igualmente homogénea y de similares características (TCGNS estadio I tratados con orquiectomía exclusivamente), los siguientes genes:

- Firma de expresión génica de nueve genes obtenida con el análisis bioinformático (MPL, Col24a1, NR4A1, FOSL1, CREB5, FANCB, LAMB4, ZBTB16, CALML3).
- Los tres genes con expresión diferencial más próxima a la significación estadística obtenidos (AKT3, BAIAP3 y ZBTB16) ($p = 0.064$) obtenidos del análisis inicial de los 730 genes.
- Los cinco genes del modelo de coexpresión ME.purple con expresión diferencial próxima a la significación (IL13RA2, CCNA1, PLA2G10, GADD45A, RRAS2).
- MicroARN371, resultante de la literatura científica como biomarcador de enfermedad tumoral activa en pacientes con TCG.



VI.CONCLUSIONES





1). A través de un riguroso análisis bioinformático se ha identificado en pacientes con TCGNS estadio I tratados exclusivamente con orquiectomía una firma génica de nueve genes (MPL, Col24a1, NR4A1, FOSL1, CREB5, FANCB, LAMB4, ZBTB16, CALML3) que permite seleccionar aquellos pacientes con una alta probabilidad de recaída (AUC 0.8).

2). Con el análisis de redes de coexpresión se obtuvo un modelo de 31 genes relacionado con la recaída estadísticamente significativo (0.003), con una correlación con la recaída de 0.39, lo cual supone una correlación importante teniendo en cuenta el pequeño tamaño muestral, el gran número de genes analizados, que sólo fue analizada una variable (recaída sí vs no) y el carácter multifactorial de las recaídas.

3). No se obtuvo ningún gen con una expresión génica diferencial significativa entre el grupo de pacientes con y sin recaída, aunque sí existen varios genes que se aproximan a la significación y que, de hecho, algunos de estos forman parte del modelo de 31 genes de la red de coexpresión que encontramos relacionado con la recaída (IL13RA2, CCNA1, PLA2G10, GADD45A, RRAS2) y con el modelo de nueve genes obtenido con el análisis bioinformático (NR4A1 y ZBTB16). Y entre el modelo de red de coexpresión de 31 genes y el modelo de 9 genes obtenido con el análisis bioinformático, FOSL1 forma parte de ambos modelos. Por otro lado, también se obtuvo una media de expresión diferencial significativa entre ambos grupos de pacientes con los genes FOSL1 y ZBTB16 según el análisis t student, que aunque este estadístico valora cada gen aisladamente nuevamente coinciden los resultados con el hilo de genes que probablemente tengan un papel importante en la recaída de los pacientes con TCGNS. Además, como se ha ido exponiendo previamente, existen múltiples interacciones directa e indirectamente entre la mayoría de los genes resaltados como de mayor importancia en los distintos análisis llevados a cabo, de hecho cuatro genes de los nueve constituyentes de la firma génica obtenida con el análisis bioinformático están relacionados con la vía de señalización PI3K (Col24a1, NR4A1, CREB5, LAMB4).

4). Los resultados obtenidos en este estudio ponen de manifiesto la alta probabilidad de que este pequeño grupo de genes (partiendo de 730 genes) resultantes de los distintos análisis llevados a cabo y repetidos constantemente en los diferentes análisis, formen parte del modelo definitivo que en un futuro nos permita seleccionar a los pacientes con TCGNS con un alto riesgo de recaída en los que optemos invariablemente por la opción de quimioterapia adyuvante. Esto nos permitiría seleccionar mejor los pacientes candidatos a tratamiento adyuvante tras orquiectomía, evitando sobretamientos y secundariamente una disminución de los costes en toxicidades, calidad de vida y económicos.

5). Hasta la fecha ninguna terapia diana ha demostrado en pacientes con tumores de células germinales una razonable efectividad, poniendo de manifiesto la importancia de centrarnos en los pacientes en estadios iniciales para disminuir el riesgo de recaída y la probabilidad de que formen parte del pequeño grupo de pacientes metastásicos sin opciones curativas.

6). Estos datos son generadores de hipótesis y la posible aplicabilidad clínica de esta firma génica de nueve genes obtenida con el análisis bioinformático requiere ser testada en una cohorte de similares características pero con un mayor número de pacientes.

VII.BIBLIOGRAFÍA





1. Bokemeyer C, Oechsle K, Honecker F, Mayer F, Hartmann JT, Waller CF, et al. Combination chemotherapy with gemcitabine, oxaliplatin, and paclitaxel in patients with cisplatin-refractory or multiply relapsed germ-cell tumors: a study of the German Testicular Cancer Study Group. *Ann Oncol.* 14 de septiembre de 2007;19(3):448-53.
2. Daugaard G, Gundgaard MG, Mortensen MS, Agerbæk M, Holm NV, Rørth M, et al. Surveillance for Stage I Nonseminoma Testicular Cancer: Outcomes and Long-Term Follow-Up in a Population-Based Cohort. *J Clin Oncol.* Diciembre de 2014;32(34):3817-23.
3. Freedman LS, Parkinson MC, Jones WG, Oliver RT, Peckham MJ, Read G, et al. Histopathology in the prediction of relapse of patients with stage I testicular teratoma treated by orchidectomy alone. *Lancet Lond Engl.* 8 de agosto de 1987;2(8554):294-8.
4. Read G, Stenning SP, Cullen MH, Parkinson MC, Horwich A, Kaye SB, et al. Medical Research Council prospective study of surveillance for stage I testicular teratoma. Medical Research Council Testicular Tumors Working Party. *J Clin Oncol.* Noviembre de 1992;10(11):1762-8.
5. Klepp O, Olsson AM, Henrikson H, Aass N, Dahl O, Stenwig AE, et al. Prognostic factors in clinical stage I nonseminomatous germ cell tumors of the testis: multivariate analysis of a prospective multicenter study. Swedish-Norwegian Testicular Cancer Group. *J Clin Oncol.* Marzo de 1990;8(3):509-18.
6. Galvez-Carvajal L, Sanchez-Muñoz A, Ribelles N, Saez M, Baena J, Ruiz S, et al. Targeted treatment approaches in refractory germ cell tumors. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2019 Nov;143:130-138.
7. Dennis L, Danaher P, Boykin R, Bailey C, Beechem J. Multiplexed Cancer Pathway Analysis. :8.
8. Kobayashi K, Saito T, Kitamura Y, Nobushita T, Kawasaki T, Hara N, et al. Oncological outcomes in patients with stage I testicular seminoma and nonseminoma: pathological risk factors for relapse and feasibility of surveillance after orchidectomy. *Diagn Pathol.* 8 de abril de 2013;8:57.
9. Germà-Lluch JR, Garcia del Muro X, Maroto P, Paz-Ares L, Arranz JA, Gumà J, et al. Clinical pattern and therapeutic results achieved in 1490 patients with germ-cell tumours of the testis: the experience of the Spanish Germ-Cell Cancer Group (GG). *Eur Urol.* Diciembre de 2002;42(6):553-62; discussion 562-563.
10. Mortensen MS, Lauritsen J, Gundgaard MG, Agerbæk M, Holm NV, Christensen IJ, et al. A Nationwide Cohort Study of Stage I Seminoma Patients Followed on a Surveillance Program. *Eur Urol.* Diciembre de 2014;66(6):1172-8.
11. Daugaard G, Gundgaard MG, Mortensen MS, Agerbæk M, Holm NV, Rørth M, et al. Surveillance for Stage I Nonseminoma Testicular Cancer: Outcomes and Long-Term Follow-Up in a Population-Based Cohort. *J Clin Oncol.* 1 de diciembre de 2014;32(34):3817-23.
12. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018: Cancer Statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* Enero de 2018;68(1):7-30.
13. Ghazarian AA, Kelly SP, Altekruze SF, Rosenberg PS, McGlynn KA. Future of testicular germ cell tumor incidence in the United States: Forecast through 2026: Forecast of TGCT Incidence Rates. *Cancer.* 15 de junio de 2017;123(12):2320-8.
14. Trabert B, Chen J, Devesa SS, Bray F, McGlynn KA. International patterns and trends in testicular cancer incidence, overall and by histologic subtype, 1973-2007. *Andrology.* Enero de 2015;3(1):4-12.
15. Global Burden of Disease Cancer Collaboration, Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, Barregard L, Bhutta ZA, et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol.* 1 de abril de 2017;3(4):524.
16. Znaor A, Lortet-Tieulent J, Jemal A, Bray F. International Variations and Trends in Testicular Cancer Incidence and Mortality. *Eur Urol.* Junio de 2014;65(6):1095-106.
17. Ghazarian AA, Trabert B, Devesa SS, McGlynn KA. Recent trends in the incidence of testicular germ cell tumors in the United States. *Andrology.* Enero de 2015;3(1):13-8.
18. Cheng L, Albers P, Berney DM, Feldman DR, Daugaard G, Gilligan T, et al. Testicular cancer. *Nat Rev Dis Primer.* Diciembre de 2018;4(1):29.
19. Sturgeon JF, Moore MJ, Kakiashvili DM, Duran I, Anson-Cartwright LC, Berthold DR, et al. Non-Risk-Adapted Surveillance in Clinical Stage I Nonseminomatous Germ Cell



- Tumors: The Princess Margaret Hospital's Experience. *Eur Urol*. Abril de 2011;59(4):556-62.
20. Tandstad T, Dahl O, Cohn-Cedermark G, Cavallin-Stahl E, Stierner U, Solberg A, et al. Risk-Adapted Treatment in Clinical Stage I Nonseminomatous Germ Cell Testicular Cancer: The SWENOTECA Management Program. *J Clin Oncol*. Mayo de 2009;27(13):2122-8.
 21. Gandaglia G, Becker A, Trinh Q-D, Abdollah F, Schiffmann J, Roghmann F, et al. Long-term survival in patients with germ cell testicular cancer: A population-based competing-risks regression analysis. *Eur J Surg Oncol EJSO*. Enero de 2014;40(1):103-12.
 22. Fung C, Sesso HD, Williams AM, Kerns SL, Monahan P, Abu Zaid M, et al. Multi-Institutional Assessment of Adverse Health Outcomes Among North American Testicular Cancer Survivors After Modern Cisplatin-Based Chemotherapy. *J Clin Oncol*. 10 de abril de 2017;35(11):1211-22.
 23. Chovanec M, Hanna N, Cary KC, Einhorn L, Albany C. Management of stage I testicular germ cell tumours. *Nat Rev Urol*. Noviembre de 2016;13(11):663-73.
 24. Kerns SL, Fung C, Monahan PO, Ardeshir-Rouhani-Fard S, Abu Zaid MI, Williams AM, et al. Cumulative Burden of Morbidity Among Testicular Cancer Survivors After Standard Cisplatin-Based Chemotherapy: A Multi-Institutional Study. *J Clin Oncol*. 20 de mayo de 2018;36(15):1505-12.
 25. Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE. Pathogenesis of testicular carcinoma in situ and germ cell cancer: still more questions than answers. *Int J Androl*. Agosto de 2011;34(4 Pt 2):e2-6.
 26. Looijenga LHJ, Gillis AJM, Stoop HJ, Hersmus R, Oosterhuis JW. Chromosomes and expression in human testicular germ-cell tumors: insight into their cell of origin and pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. Diciembre de 2007;1120:187-214.
 27. Looijenga LHJ, Gillis AJM, Stoop H, Biermann K, Oosterhuis JW. Dissecting the molecular pathways of (testicular) germ cell tumour pathogenesis; from initiation to treatment-resistance. *Int J Androl*. Agosto de 2011;34(4 Pt 2):e234-251.
 28. Rajpert-de Meyts E, Hoei-Hansen CE. From gonocytes to testicular cancer: the role of impaired gonadal development. *Ann N Y Acad Sci*. Diciembre de 2007;1120:168-80.
 29. Reuter VE. Origins and molecular biology of testicular germ cell tumors. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. Febrero de 2005;18 Suppl 2:S51-60.
 30. Sheikine Y, Genega E, Melamed J, Lee P, Reuter VE, Ye H. Molecular genetics of testicular germ cell tumors. *Am J Cancer Res*. 2012;2(2):153-67.
 31. Looijenga LHJ, Gillis AJM, Stoop H, Biermann K, Oosterhuis JW. Dissecting the molecular pathways of (testicular) germ cell tumour pathogenesis; from initiation to treatment-resistance. *Int J Androl*. Agosto de 2011;34(4 Pt 2):e234-251.
 32. van de Geijn G-JM, Hersmus R, Looijenga LHJ. Recent developments in testicular germ cell tumor research. *Birth Defects Res Part C Embryo Today Rev*. Marzo de 2009;87(1):96-113.
 33. Sheikine Y, Genega E, Melamed J, Lee P, Reuter VE, Ye H. Molecular genetics of testicular germ cell tumors. *Am J Cancer Res*. 2012;2(2):153-67.
 34. Haddad FS, Sorini PM, Somsin AA, Nathan MH, Dobbs RM, Berger CS, et al. Familial double testicular tumors: identical chromosome changes in seminoma and embryonal carcinoma of the same testis. *J Urol*. Abril de 1988;139(4):748-50.
 35. Boublikova L, Buchler T, Stary J, Abrahamova J, Trka J. Molecular biology of testicular germ cell tumors: unique features awaiting clinical application. *Crit Rev Oncol Hematol*. Marzo de 2014;89(3):366-85.
 36. van de Geijn G-JM, Hersmus R, Looijenga LHJ. Recent developments in testicular germ cell tumor research. *Birth Defects Res Part C Embryo Today Rev*. Marzo de 2009;87(1):96-113.
 37. Kanetsky PA, Mitra N, Vardhanabhuti S, Li M, Vaughn DJ, Letrero R, et al. Common variation in KITLG and at 5q31.3 predisposes to testicular germ cell cancer. *Nat Genet*. Julio de 2009;41(7):811-5.
 38. Oosterhuis JW, Looijenga LHJ. Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nat Rev Cancer*. Marzo de 2005;5(3):210-22.
 39. Almstrup K, Leffers H, Lothe RA, Skakkebaek NE, Sonne SB, Nielsen JE, et al. Improved gene expression signature of testicular carcinoma in situ. *Int J Androl*. Agosto de 2007;30(4):292-302; discussion 303.



40. Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod Oxf Engl*. Mayo de 2001;16(5):972-8.
41. Stoop H, Honecker F, van de Geijn GJM, Gillis AJM, Cools MC, de Boer M, et al. Stem cell factor as a novel diagnostic marker for early malignant germ cells. *J Pathol*. Septiembre de 2008;216(1):43-54.
42. Rodriguez E, Houldsworth J, Reuter VE, Meltzer P, Zhang J, Trent JM, et al. Molecular cytogenetic analysis of i(12p)-negative human male germ cell tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. Diciembre de 1993;8(4):230-6.
43. Atkin NB, Baker MC. Specific chromosome change, i(12p), in testicular tumours? *Lancet Lond Engl*. 11 de diciembre de 1982;2(8311):1349.
44. Korkola JE, Houldsworth J, Bosl GJ, Chaganti RSK. Molecular events in germ cell tumours: linking chromosome-12 gain, acquisition of pluripotency and response to cisplatin. *BJU Int*. Noviembre de 2009;104(9 Pt B):1334-8.
45. Rajpert-De Meyts E. Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspects. *Hum Reprod Update*. Junio de 2006;12(3):303-23.
46. Looijenga LHJ, de Leeuw H, van Oorschot M, van Gurp RJHLM, Stoop H, Gillis AJM, et al. Stem cell factor receptor (c-KIT) codon 816 mutations predict development of bilateral testicular germ-cell tumors. *Cancer Res*. 15 de noviembre de 2003;63(22):7674-8.
47. Ottesen AM, Larsen J, Gerdes T, Larsen JK, Lundsteen C, Skakkebaek NE, et al. Cytogenetic investigation of testicular carcinoma in situ and early seminoma by high-resolution comparative genomic hybridization analysis of subpopulations flow sorted according to DNA content. *Cancer Genet Cytogenet*. Marzo de 2004;149(2):89-97.
48. Sinke RJ, Suijkerbuijk RF, de Jong B, Oosterhuis JW, Geurts van Kessel A. Uniparental origin of i(12p) in human germ cell tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. Marzo de 1993;6(3):161-5.
49. Ottesen AM, Skakkebaek NE, Lundsteen C, Leffers H, Larsen J, Rajpert-De Meyts E. High-resolution comparative genomic hybridization detects extra chromosome arm 12p material in most cases of carcinoma in situ adjacent to overt germ cell tumors, but not before the invasive tumor development. *Genes Chromosomes Cancer*. Octubre de 2003;38(2):117-25.
50. Rodriguez S, Jafer O, Goker H, Summersgill BM, Zafarana G, Gillis AJM, et al. Expression profile of genes from 12p in testicular germ cell tumors of adolescents and adults associated with i(12p) and amplification at 12p11.2-p12.1. *Oncogene*. 27 de marzo de 2003;22(12):1880-91.
51. Chaganti RS, Houldsworth J. The cytogenetic theory of the pathogenesis of human adult male germ cell tumors. Review article. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. Enero de 1998;106(1):80-3; discussion 83-84.
52. Kraggerud SM, Skotheim RI, Szymanska J, Eknaes M, Fosså SD, Stenwig AE, et al. Genome profiles of familial/bilateral and sporadic testicular germ cell tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. Junio de 2002;34(2):168-74.
53. Almstrup K, Hoei-Hansen CE, Nielsen JE, Wirkner U, Ansorge W, Skakkebæk NE, et al. Genome-wide gene expression profiling of testicular carcinoma in situ progression into overt tumours. *Br J Cancer*. Mayo de 2005;92(10):1934-41.
54. Almstrup K, Hoei-Hansen CE, Wirkner U, Blake J, Schwager C, Ansorge W, et al. Embryonic stem cell-like features of testicular carcinoma in situ revealed by genome-wide gene expression profiling. *Cancer Res*. 15 de julio de 2004;64(14):4736-43.
55. AlDubayan SH, Pyle LC, Gamulin M, Kulis T, Moore ND, Taylor-Weiner A, et al. Association of Inherited Pathogenic Variants in Checkpoint Kinase 2 (CHEK2) With Susceptibility to Testicular Germ Cell Tumors. *JAMA Oncol*. 1 de abril de 2019;5(4):514-22.
56. AlDubayan SH, Giannakis M, Moore ND, Han GC, Reardon B, Hamada T, et al. Inherited DNA-Repair Defects in Colorectal Cancer. *Am J Hum Genet*. 01 de 2018;102(3):401-14.
57. Xiang H, Geng X, Ge W, Li H. Meta-analysis of CHEK2 1100delC variant and colorectal cancer susceptibility. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. Noviembre de 2011;47(17):2546-51.
58. Hale V, Weischer M, Park JY. CHEK2 (*) 1100delC Mutation and Risk of Prostate Cancer. *Prostate Cancer*. 2014;2014:294575.



59. Honorio S, Agathangelou A, Wernert N, Rothe M, Maher ER, Latif F. Frequent epigenetic inactivation of the RASSF1A tumour suppressor gene in testicular tumours and distinct methylation profiles of seminoma and nonseminoma testicular germ cell tumours. *Oncogene*. Enero de 2003;22(3):461-6.
60. Kersemaekers A-MF, Mayer F, Molier M, van Weeren PC, Oosterhuis JW, Bokemeyer C, et al. Role of P53 and MDM2 in treatment response of human germ cell tumors. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 15 de marzo de 2002;20(6):1551-61.
61. Guillou L, Estreicher A, Chaubert P, Hurlimann J, Kurt AM, Metthez G, et al. Germ cell tumors of the testis overexpress wild-type p53. *Am J Pathol*. Octubre de 1996;149(4):1221-8.
62. Lutzker SG. P53 tumour suppressor gene and germ cell neoplasia. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. Enero de 1998;106(1):85-9.
63. Heidenreich A, Schenkman NS, Sesterhenn IA, Mostofi KF, Moul JW, Srivastava S, et al. Immunohistochemical and mutational analysis of the p53 tumour suppressor gene and the bcl-2 oncogene in primary testicular germ cell tumours. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. Enero de 1998;106(1):90-9; discussion 99-100.
64. Gillis AJM, Stoop HJ, Hersmus R, Oosterhuis JW, Sun Y, Chen C, et al. High-throughput microRNAome analysis in human germ cell tumours. *J Pathol*. Noviembre de 2007;213(3):319-28.
65. Dolezalova D, Mraz M, Barta T, Plevova K, Vinarsky V, Holubcova Z, et al. MicroRNAs Regulate p21Waf1/Cip1 Protein Expression and the DNA Damage Response in Human Embryonic Stem Cells. *STEM CELLS*. Julio de 2012;30(7):1362-72.
66. Spierings DCJ, de Vries EGE, Stel AJ, te Rietstap N, Vellenga E, de Jong S. Low p21Waf1/Cip1 protein level sensitizes testicular germ cell tumor cells to Fas-mediated apoptosis. *Oncogene*. 17 de junio de 2004;23(28):4862-72.
67. Mayer F, Stoop H, Scheffer GL, Scheper R, Oosterhuis JW, Looijenga LHJ, et al. Molecular Determinants of Treatment Response in Human Germ Cell Tumors. :8.
68. Koster R, di Pietro A, Timmer-Bosscha H, Gibcus JH, van den Berg A, Suurmeijer AJ, et al. Cytoplasmic p21 expression levels determine cisplatin resistance in human testicular cancer. *J Clin Invest*. Octubre de 2010;120(10):3594-605.
69. Bartkova J, Falck J, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE, Lukas J, Bartek J. Chk2 tumour suppressor protein in human spermatogenesis and testicular germ-cell tumours. *Oncogene*. 13 de septiembre de 2001;20(41):5897-902.
70. Bartkova J, Horejsi Z, Koed K, Krämer A, Tort F, Zieger K, et al. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*. 14 de abril de 2005;434(7035):864-70.
71. Harbour JW, Luo RX, Dei Santi A, Postigo AA, Dean DC. Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell*. 17 de septiembre de 1999;98(6):859-69.
72. Bartkova J, Lukas C, Sørensen CS, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE, Lukas J, et al. Deregulation of the RB pathway in human testicular germ cell tumours. *J Pathol*. Junio de 2003;200(2):149-56.
73. Strohmeyer T, Reissmann P, Cordon-Cardo C, Hartmann M, Ackermann R, Slamon D. Correlation between retinoblastoma gene expression and differentiation in human testicular tumors. *Proc Natl Acad Sci*. 1 de agosto de 1991;88(15):6662-6.
74. Schmidt M, Fan Z. Protection against chemotherapy-induced cytotoxicity by cyclin-dependent kinase inhibitors (CKI) in CKI-responsive cells compared with CKI-unresponsive cells. *Oncogene*. 27 de septiembre de 2001;20(43):6164-71.
75. Houldsworth J, Reuter V, Bosl GJ, Chaganti RS. Aberrant expression of cyclin D2 is an early event in human male germ cell tumorigenesis. *Cell Growth Differ Mol Biol J Am Assoc Cancer Res*. Marzo de 1997;8(3):293-9.
76. Bartkova J, Thullberg M, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE, Bartek J. Lack of p19INK4d in human testicular germ-cell tumours contrasts with high expression during normal spermatogenesis. *Oncogene*. 24 de agosto de 2000;19(36):4146-50.
77. Bartkova J, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE, Lukas J, Bartek J. Deregulation of the G1/S-phase control in human testicular germ cell tumours. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. Enero de 2003;111(1):252-65; discussion 265-266.
78. Bartkova J, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE, Lukas J, Bartek J. DNA damage response in human testes and testicular germ cell tumours: biology and implications for therapy. *Int J Androl*. Agosto de 2007;30(4):282-91; discussion 291.



79. Oosterhuis JW, Looijenga LHJ. Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nat Rev Cancer*. Marzo de 2005;5(3):210-22.
80. Durán I, García-Velasco A, Ballestín C, García E, Martínez-Tello F, Pond GR, et al. Expression of EGFR, HER-2/neu and KIT in germ cell tumours. *Clin Transl Oncol Off Publ Fed Span Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex*. Junio de 2010;12(6):443-9.
81. Madani A. Expression of KIT and epidermal growth factor receptor in chemotherapy refractory non-seminomatous germ-cell tumors. *Ann Oncol*. 1 de junio de 2003;14(6):873-80.
82. Izquierdo MA, Van der Valk P, Van Ark-Otte J, Rubio G, Germa-Lluch JR, Ueda R, et al. Differential expression of the c-kit proto-oncogene in germ cell tumours. *J Pathol*. Noviembre de 1995;177(3):253-8.
83. Bokemeyer C, Kuczyk MA, Dunn T, Serth J, Hartmann K, Jonasson J, et al. Expression of stem-cell factor and its receptor c-kit protein in normal testicular tissue and malignant germ-cell tumours. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1996;122(5):301-6.
84. Strohmeier T, Reese D, Press M, Ackermann R, Hartmann M, Slamon D. Expression of the c-kit proto-oncogene and its ligand stem cell factor (SCF) in normal and malignant human testicular tissue. *J Urol*. Febrero de 1995;153(2):511-5.
85. Nikolaou M, Valavanis C, Aravantinos G, Fountzilias G, Tamvakis N, Lekka I, et al. Kit expression in male germ cell tumors. *Anticancer Res*. Junio de 2007;27(3B):1685-8.
86. Moe-Behrens GHG, Klinger FG, Eskild W, Grotmol T, Haugen TB, De Felici M. Akt/PTEN signaling mediates estrogen-dependent proliferation of primordial germ cells in vitro. *Mol Endocrinol Baltim Md*. Diciembre de 2003;17(12):2630-8.
87. Looijenga LHJ, de Leeuw H, van Oorschot M, van Gurp RJHLM, Stoop H, Gillis AJM, et al. Stem cell factor receptor (c-KIT) codon 816 mutations predict development of bilateral testicular germ-cell tumors. *Cancer Res*. 15 de noviembre de 2003;63(22):7674-8.
88. Sommerer F, Hengge UR, Markwarth A, Vomschloss S, Stolzenburg J-U, Wittekind C, et al. Mutations of BRAF and RAS are rare events in germ cell tumours. *Int J Cancer*. 10 de enero de 2005;113(2):329-35.
89. Kemmer K, Corless CL, Fletcher JA, McGreevey L, Haley A, Griffith D, et al. KIT mutations are common in testicular seminomas. *Am J Pathol*. Enero de 2004;164(1):305-13.
90. Soule S. HER-2/neu expression in germ cell tumours. *J Clin Pathol*. 1 de septiembre de 2002;55(9):656-8.
91. Di Vizio D, Cito L, Boccia A, Chieffi P, Insabato L, Pettinato G, et al. Loss of the tumor suppressor gene PTEN marks the transition from intratubular germ cell neoplasias (ITGCN) to invasive germ cell tumors. *Oncogene*. 10 de marzo de 2005;24(11):1882-94.
92. Kimura T, Suzuki A, Fujita Y, Yomogida K, Lomeli H, Asada N, et al. Conditional loss of PTEN leads to testicular teratoma and enhances embryonic germ cell production. *Dev Camb Engl*. Abril de 2003;130(8):1691-700.
93. Wang X, Zhang S, Maclennan GT, Biermann K, Foster RS, Beck SD, et al. Epidermal growth factor receptor protein expression and gene amplification in the chemorefractory metastatic embryonal carcinoma. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. Enero de 2009;22(1):7-12.
94. Moroni M, Veronese S, Schiavo R, Carminati O, Sorensen BS, Gambacorta M, et al. Epidermal growth factor receptor expression and activation in nonseminomatous germ cell tumors. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. Septiembre de 2001;7(9):2770-5.
95. Hechelhammer L, Störkel S, Odermatt B, Heitz PU, Jochum W. Epidermal growth factor receptor is a marker for syncytiotrophoblastic cells in testicular germ cell tumors. *Virchows Arch Int J Pathol*. Julio de 2003;443(1):28-31.
96. Honecker F, Wermann H, Mayer F, Gillis AJM, Stoop H, van Gurp RJLM, et al. Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and BRAF mutation in treatment-resistant germ cell tumors. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 de mayo de 2009;27(13):2129-36.
97. Rodriguez S, Jafer O, Goker H, Summersgill BM, Zafarana G, Gillis AJM, et al. Expression profile of genes from 12p in testicular germ cell tumors of adolescents and adults associated with i(12p) and amplification at 12p11.2-p12.1. *Oncogene*. 27 de marzo de 2003;22(12):1880-91.



98. Goddard NC, McIntyre A, Summersgill B, Gilbert D, Kitazawa S, Shipley J. KIT and RAS signalling pathways in testicular germ cell tumours: new data and a review of the literature. *Int J Androl.* Agosto de 2007;30(4):337-48; discussion 349.
99. Biermann K, Heukamp LC, Steger K, Zhou H, Franke FE, Sonnack V, et al. Genome-wide expression profiling reveals new insights into pathogenesis and progression of testicular germ cell tumors. *Cancer Genomics Proteomics.* Octubre de 2007;4(5):359-67.
100. Skotheim RI, Monni O, Mousses S, Fosså SD, Kallioniemi O-P, Lothe RA, et al. New insights into testicular germ cell tumorigenesis from gene expression profiling. *Cancer Res.* 15 de abril de 2002;62(8):2359-64.
101. Lail-Trecker M, Gulati R, Peluso JJ. A role for hepatocyte growth factor/scatter factor in regulating normal and neoplastic cells of reproductive tissues. *J Soc Gynecol Investig.* Junio de 1998;5(3):114-21.
102. Beviglia L, Matsumoto K, Lin CS, Ziober BL, Kramer RH. Expression of the c-Met/HGF receptor in human breast carcinoma: correlation with tumor progression. *Int J Cancer.* 20 de junio de 1997;74(3):301-9.
103. Kristiansen W, Haugen TB, Witczak O, Andersen JM, Fosså SD, Aschim EL. CYP1A1, CYP3A5 and CYP3A7 polymorphisms and testicular cancer susceptibility. *Int J Androl.* Febrero de 2011;34(1):77-83.
104. Kristiansen W, Aschim EL, Andersen JM, Witczak O, Fosså SD, Haugen TB. Variations in testosterone pathway genes and susceptibility to testicular cancer in Norwegian men. *Int J Androl.* Diciembre de 2012;35(6):819-27.
105. Chia VM, Li Y, Quraishi SM, Graubard BI, Figueroa JD, Weber J-P, et al. Effect modification of endocrine disruptors and testicular germ cell tumour risk by hormone-metabolizing genes. *Int J Androl.* 1 de agosto de 2010;33(4):588-96.
106. Figueroa JD, Sakoda LC, Graubard BI, Chanock S, Rubertone MV, Erickson RL, et al. Genetic variation in hormone metabolizing genes and risk of testicular germ cell tumors. *Cancer Causes Control CCC.* Noviembre de 2008;19(9):917-29.
107. Ferlin A, Ganz F, Pengo M, Selice R, Frigo AC, Foresta C. Association of testicular germ cell tumor with polymorphisms in estrogen receptor and steroid metabolism genes. *Endocr Relat Cancer.* Marzo de 2010;17(1):17-25.
108. Garolla A, Ferlin A, Vinanzi C, Roverato A, Sotti G, Artibani W, et al. Molecular analysis of the androgen receptor gene in testicular cancer. *Endocr Relat Cancer.* Septiembre de 2005;12(3):645-55.
109. Korkola JE, Houldsworth J, Chadalavada RSV, Olshen AB, Dobrzynski D, Reuter VE, et al. Down-regulation of stem cell genes, including those in a 200-kb gene cluster at 12p13.31, is associated with in vivo differentiation of human male germ cell tumors. *Cancer Res.* 15 de enero de 2006;66(2):820-7.
110. Cantile M, Franco R, Schiavo G, Procino A, Cindolo L, Botti G, et al. The HOX genes network in uro-genital cancers: mechanisms and potential therapeutic implications. *Curr Med Chem.* 2011;18(32):4872-84.
111. Skotheim RI, Lind GE, Monni O, Nesland JM, Abeler VM, Fosså SD, et al. Differentiation of human embryonal carcinomas in vitro and in vivo reveals expression profiles relevant to normal development. *Cancer Res.* 1 de julio de 2005;65(13):5588-98.
112. Jørgensen A, Nielsen JE, Almstrup K, Toft BG, Petersen BL, Rajpert-De Meyts E. Dysregulation of the mitosis-meiosis switch in testicular carcinoma in situ. *J Pathol.* Marzo de 2013;229(4):588-98.
113. Hersmus R, de Leeuw BHCGM, Stoop H, Bernard P, van Doorn HC, Brüggewirth HT, et al. A novel SRY missense mutation affecting nuclear import in a 46,XY female patient with bilateral gonadoblastoma. *Eur J Hum Genet EJHG.* Diciembre de 2009;17(12):1642-9.
114. Gilbert DC, Chandler I, McIntyre A, Goddard NC, Gabe R, Huddart RA, et al. Clinical and biological significance of CXCL12 and CXCR4 expression in adult testes and germ cell tumours of adults and adolescents. *J Pathol.* Enero de 2009;217(1):94-102.
115. Burger JA, Kipps TJ. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood.* 1 de marzo de 2006;107(5):1761-7.
116. Cipriano SC, Chen L, Burns KH, Koff A, Matzuk MM. Inhibin and p27 interact to regulate gonadal tumorigenesis. *Mol Endocrinol Baltim Md.* Junio de 2001;15(6):985-96.



- 117.Devouassoux-Shisheboran M, Mauduit C, Tabone E, Droz JP, Benahmed M. Growth regulatory factors and signalling proteins in testicular germ cell tumours. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. Enero de 2003;111(1):212-24; discussion 224.
- 118.Olivarez D, Ulbright T, DeRiese W, Foster R, Reister T, Einhorn L, et al. Neovascularization in clinical stage A testicular germ cell tumor: prediction of metastatic disease. *Cancer Res*. 15 de mayo de 1994;54(10):2800-2.
- 119.Fukuda S, Shirahama T, Imazono Y, Tsushima T, Ohmori H, Kayajima T, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in patients with testicular germ cell tumors as an indicator of metastatic disease. *Cancer*. 15 de marzo de 1999;85(6):1323-30.
- 120.Mego M, Cierna Z, Svetlovska D, Macak D, Machalekova K, Miskovska V, et al. PARP expression in germ cell tumours. *J Clin Pathol*. Julio de 2013;66(7):607-12.
- 121.Lind GE, Skotheim RI, Lothe RA. The epigenome of testicular germ cell tumors. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. Octubre de 2007;115(10):1147-60.
- 122.Okamoto K. Epigenetics: a way to understand the origin and biology of testicular germ cell tumors. *Int J Urol Off J Jpn Urol Assoc*. Junio de 2012;19(6):504-11.
- 123.Zequi S de C, da Costa WH, Santana TBM, Favaretto RL, Sacomani CAR, Guimaraes GC. Bilateral testicular germ cell tumours: a systematic review. *BJU Int*. Octubre de 2012;110(8):1102-9.
- 124.Hemminki K, Liu H, Sundquist J. Second cancers after testicular cancer diagnosed after 1980 in Sweden. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. Julio de 2010;21(7):1546-51.
- 125.Frank C, Fallah M, Sundquist J, Hemminki A, Hemminki K. Population Landscape of Familial Cancer. *Sci Rep*. 10 de agosto de 2015;5:12891.
- 126.Holzik MFL, Rapley E, Hoekstra H, Sleijfer D, Nolte I, Sijmons R. Genetic predisposition to testicular germ-cell tumours. *Lancet Oncol*. Junio de 2004;5(6):363-71.
- 127.Jørgensen N, Vierula M, Jacobsen R, Pukkala E, Perheentupa A, Virtanen HE, et al. Recent adverse trends in semen quality and testis cancer incidence among Finnish men. *Int J Androl*. Agosto de 2011;34(4 Pt 2):e37-48.
- 128.Chieffi P, Franco R, Portella G. Molecular and cell biology of testicular germ cell tumors. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2009;278:277-308.
- 129.Manecksha RP, Fitzpatrick JM. Epidemiology of testicular cancer. *BJU Int*. Noviembre de 2009;104(9 Pt B):1329-33.
- 130.Trabert B, Zugna D, Richiardi L, McGlynn KA, Akre O. Congenital malformations and testicular germ cell tumors: Congenital Malformations and TGCT. *Int J Cancer*. 15 de octubre de 2013;133(8):1900-4.
- 131.Rajpert-De Meyts E, McGlynn KA, Okamoto K, Jewett MAS, Bokemeyer C. Testicular germ cell tumours. *The Lancet*. Abril de 2016;387(10029):1762-74.
- 132.Akre O, Pettersson A, Richiardi L. Risk of contralateral testicular cancer among men with unilaterally undescended testis: A meta analysis. *Int J Cancer*. 1 de febrero de 2009;124(3):687-9.
- 133.Boublikova L, Buchler T, Stary J, Abrahamova J, Trka J. Molecular biology of testicular germ cell tumors: unique features awaiting clinical application. *Crit Rev Oncol Hematol*. Marzo de 2014;89(3):366-85.
- 134.Rajpert-De Meyts E. Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspects. *Hum Reprod Update*. Junio de 2006;12(3):303-23.
- 135.Rapley E. Susceptibility alleles for testicular germ cell tumour: a review. *Int J Androl*. Agosto de 2007;30(4):242-50; discussion 250.
- 136.Turnbull C, Rahman N. Genome-wide association studies provide new insights into the genetic basis of testicular germ-cell tumour. *Int J Androl*. Agosto de 2011;34(4 Pt 2):e86-96; discussion e96-97.
- 137.Rapley EA, Turnbull C, Al Olama AA, Dermitzakis ET, Linger R, Huddart RA, et al. A genome-wide association study of testicular germ cell tumor. *Nat Genet*. Julio de 2009;41(7):807-10.
- 138.Gilbert D, Rapley E, Shipley J. Testicular germ cell tumours: predisposition genes and the male germ cell niche. *Nat Rev Cancer*. Abril de 2011;11(4):278-88.
- 139.Crockford GP, Linger R, Hockley S, Dudakia D, Johnson L, Huddart R, et al. Genome-wide linkage screen for testicular germ cell tumour susceptibility loci. *Hum Mol Genet*. 1 de febrero de 2006;15(3):443-51.



140. Huyghe E, Matsuda T, Thonneau P. Increasing incidence of testicular cancer worldwide: a review. *J Urol.* Julio de 2003;170(1):5-11.
141. Dieckmann KP, Skakkebaek NE. Carcinoma in situ of the testis: review of biological and clinical features. *Int J Cancer.* 10 de diciembre de 1999;83(6):815-22.
142. Rud CN, Daugaard G, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE, Petersen JH, Jørgensen N. Sperm Concentration, Testicular Volume and Age Predict Risk of Carcinoma In Situ in Contralateral Testis of Men with Testicular Germ Cell Cancer. *J Urol.* Diciembre de 2013;190(6):2074-80.
143. Harland SJ, Cook PA, Fossa SD, Horwich A, Mead GM, Parkinson MC, et al. Intratubular germ cell neoplasia of the contralateral testis in testicular cancer: defining a high risk group. *J Urol.* Octubre de 1998;160(4):1353-7.
144. Sturgeon JF, Moore MJ, Kakiashvili DM, Duran I, Anson-Cartwright LC, Berthold DR, et al. Non-Risk-Adapted Surveillance in Clinical Stage I Nonseminomatous Germ Cell Tumors: The Princess Margaret Hospital's Experience. *Eur Urol.* Abril de 2011; 59(4): 556-62.
145. Lago-Hernandez CA, Feldman H, O'Donnell E, Mahal BA, Perez V, Howard S, et al. A refined risk stratification scheme for clinical stage 1 NSGCT based on evaluation of both embryonal predominance and lymphovascular invasion. *Ann Oncol.* 17 de abril de 2015;mdv180.
146. Kollmannsberger C, Moore C, Chi KN, Murray N, Daneshmand S, Gleave M, et al. Non-risk-adapted surveillance for patients with stage I nonseminomatous testicular germ-cell tumors: diminishing treatment-related morbidity while maintaining efficacy. *Ann Oncol.* 1 de junio de 2010;21(6):1296-301.
147. Sturgeon JF, Moore MJ, Kakiashvili DM, Duran I, Anson-Cartwright LC, Berthold DR, et al. Non-Risk-Adapted Surveillance in Clinical Stage I Nonseminomatous Germ Cell Tumors: The Princess Margaret Hospital's Experience. *Eur Urol.* Abril de 2011;59(4):556-62.
148. Read G, Stenning SP, Cullen MH, Parkinson MC, Horwich A, Kaye SB, et al. Medical Research Council prospective study of surveillance for stage I testicular teratoma. Medical Research Council Testicular Tumors Working Party. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* Noviembre de 1992;10(11):1762-8.
149. Amato RJ, Ro JY, Ayala AG, Swanson DA. Risk-adapted treatment for patients with clinical stage I nonseminomatous germ cell tumor of the testis. *Urology.* Enero de 2004;63(1):144-8; discussion 148-149.
150. Kollmannsberger C, Tandstad T, Bedard PL, Cohn-Cedermark G, Chung PW, Jewett MA, et al. Patterns of Relapse in Patients With Clinical Stage I Testicular Cancer Managed With Active Surveillance. *J Clin Oncol.* Enero de 2015;33(1):51-7.
151. Heidenreich A, Sesterhenn IA, Mostofi FK, Moul JW. Prognostic risk factors that identify patients with clinical stage I nonseminomatous germ cell tumors at low risk and high risk for metastasis. *Cancer.* 1 de septiembre de 1998;83(5):1002-11.
152. Sweeney CJ, Hermans BP, Heilman DK, Foster RS, Donohue JP, Einhorn LH. Results and Outcome of Retroperitoneal Lymph Node Dissection for Clinical Stage I Embryonal Carcinoma-Predominant Testis Cancer. *J Clin Oncol.* Enero de 2000;18(2):358-358.
153. Moul JW, McCarthy WF, Fernandez EB, Sesterhenn IA. Percentage of embryonal carcinoma and of vascular invasion predicts pathological stage in clinical stage I nonseminomatous testicular cancer. *Cancer Res.* 15 de enero de 1994;54(2):362-4.
154. Tandstad T, Stahl O, Hakansson U, Dahl O, Haugnes HS, Klepp OH, et al. One course of adjuvant BEP in clinical stage I nonseminoma mature and expanded results from the SWENOTECA group. *Ann Oncol.* 1 de noviembre de 2014;25(11):2167-72.
155. Tandstad T, Dahl O, Cohn-Cedermark G, Cavallin-Stahl E, Stierner U, Solberg A, et al. Risk-Adapted Treatment in Clinical Stage I Nonseminomatous Germ Cell Testicular Cancer: The SWENOTECA Management Program. *J Clin Oncol.* Mayo de 2009;27(13):2122-8.
156. Nayan M, Jewett MAS, Hosni A, Anson-Cartwright L, Bedard PL, Moore M, et al. Conditional Risk of Relapse in Surveillance for Clinical Stage I Testicular Cancer. *Eur Urol.* Enero de 2017;71(1):120-7.
157. Mortensen MS, Lauritsen J, Kier MGG, Bandak M, Appelt AL, Agerbæk M, et al. Late Relapses in Stage I Testicular Cancer Patients on Surveillance. *Eur Urol.* Agosto de 2016;70(2):365-71.



158. Tandstad T, Ståhl O, Håkansson U, Dahl O, Haugnes HS, Klepp OH, et al. One course of adjuvant BEP in clinical stage I nonseminoma mature and expanded results from the SWENOTECA group. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. Noviembre de 2014;25(11):2167-72.
159. Loehrer PJ, Gonin R, Nichols CR, Weathers T, Einhorn LH. Vinblastine plus ifosfamide plus cisplatin as initial salvage therapy in recurrent germ cell tumor. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. Julio de 1998;16(7):2500-4.
160. Pico J-L, Rosti G, Kramar A, Wandt H, Koza V, Salvioni R, et al. A randomised trial of high-dose chemotherapy in the salvage treatment of patients failing first-line platinum chemotherapy for advanced germ cell tumours. *Ann Oncol*. 1 de julio de 2005;16(7):1152-9.
161. Pizzocaro G, Pasi M, Zanoni F, Salvioni R, Milani A, Pilotti S. Relapse Pattern of Pathologic Stage I Nonseminomatous Germ Cell Tumors of the Testis following Orchidectomy and Lymphadenectomy. *Eur Urol*. 1985;11(2):79-82.
162. Freedman LS, Parkinson MC, Jones WG, Oliver RT, Peckham MJ, Read G, et al. Histopathology in the prediction of relapse of patients with stage I testicular teratoma treated by orchidectomy alone. *Lancet Lond Engl*. 8 de agosto de 1987;2(8554):294-8.
163. Nicolai N, Miceli R, Artusi R, Piva L, Pizzocaro G, Salvioni R. A simple model for predicting nodal metastasis in patients with clinical stage I nonseminomatous germ cell testicular tumors undergoing retroperitoneal lymph node dissection only. *J Urol*. Enero de 2004;171(1):172-6.
164. Huddart RA, O'Doherty MJ, Padhani A, Rustin GJS, Mead GM, Joffe JK, et al. 18fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the prediction of relapse in patients with high-risk, clinical stage I nonseminomatous germ cell tumors: preliminary report of MRC Trial TE22--the NCRI Testis Tumour Clinical Study Group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 de julio de 2007;25(21):3090-5.
165. Albers P, Siener R, Krege S, Schmelz H, Dieckmann K, Heidenreich A, et al. One course of adjuvant PEB chemotherapy versus retroperitoneal lymph node dissection in patients with stage I non-seminomatous germ-cell tumors (NSGCT): Results of the German Prospective Multicenter Trial (Association of Urological Oncology (AUO)/German Testicular Cancer Study Group (GTCSG) Trial 01-94). *J Clin Oncol* 2006; 18: 4512.
166. Lin WW, Kim ED, Quesada ET, Lipshultz LI, Coburn M. Unilateral testicular injury from external trauma: evaluation of semen quality and endocrine parameters. *J Urol*. Marzo de 1998;159(3):841-3.
167. Ferreira U, Netto Júnior NR, Esteves SC, Rivero MA, Schirren C. Comparative study of the fertility potential of men with only one testis. *Scand J Urol Nephrol*. 1991;25(4):255-9.
168. Pont J, Albrecht W, Postner G, Sellner F, Angel K, Hörtl W. Adjuvant chemotherapy for high-risk clinical stage I nonseminomatous testicular germ cell cancer: long-term results of a prospective trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. Febrero de 1996;14(2):441-8.
169. Gels ME, Hoekstra HJ, Sleijfer DT, Marrink J, de Bruijn HW, Molenaar WM, et al. Detection of recurrence in patients with clinical stage I nonseminomatous testicular germ cell tumors and consequences for further follow-up: a single-center 10-year experience. *J Clin Oncol*. Mayo de 1995;13(5):1188-94.
170. Nicolai N, Pizzocaro G. A surveillance study of clinical stage I nonseminomatous germ cell tumors of the testis: 10-year followup. *J Urol*. Septiembre de 1995;154(3):1045-9.
171. Weissbach L, Boedefeld EA, Horstmann-Dubral B. Surgical treatment of stage-I non-seminomatous germ cell testis tumor. Final results of a prospective multicenter trial 1982-1987. Testicular Tumor Study Group. *Eur Urol*. 1990;17(2):97-106.
172. Oliver RT, Raja MA, Ong J, Gallagher CJ. Pilot study to evaluate impact of a policy of adjuvant chemotherapy for high risk stage 1 malignant teratoma on overall relapse rate of stage 1 cancer patients. *J Urol*. Noviembre de 1992;148(5):1453-5; discussion 1455-1456.
173. Studer UE, Fey MF, Calderoni A, Kraft R, Mazzucchelli L, Sonntag RW. Adjuvant chemotherapy after orchidectomy in high-risk patients with clinical stage I non-seminomatous testicular cancer. *Eur Urol*. 1993;23(4):444-9.
174. Cullen MH, Stenning SP, Parkinson MC, Fossa SD, Kaye SB, Horwich AH, et al. Short-course adjuvant chemotherapy in high-risk stage I nonseminomatous germ cell tumors



- of the testis: a Medical Research Council report. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. Abril de 1996;14(4):1106-13.
175. Pont J, Albrecht W, Postner G, Sellner F, Angel K, Hörtl W. Adjuvant chemotherapy for high-risk clinical stage I nonseminomatous testicular germ cell cancer: long-term results of a prospective trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. febrero de 1996;14(2):441-8.
 176. Klepp O, Dahl O, Flodgren P, Stierner U, Olsson AM, Oldbring J, et al. Risk-adapted treatment of clinical stage 1 non-seminoma testis cancer. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. junio de 1997;33(7):1038-44.
 177. Böhlen D, Borner M, Sonntag RW, Fey MF, Studer UE. Long-term results following adjuvant chemotherapy in patients with clinical stage I testicular nonseminomatous malignant germ cell tumors with high risk factors. *J Urol*. abril de 1999;161(4):1148-52.
 178. Chevreau C, Mazerolles C, Soulié M, Gaspard M-H, Mourey L, Bujan L, et al. Long-term efficacy of two cycles of BEP regimen in high-risk stage I nonseminomatous testicular germ cell tumors with embryonal carcinoma and/or vascular invasion. *Eur Urol*. agosto de 2004;46(2):209-14; discussion 214-215.
 179. Albers P, Siener R, Krege S, Schmelz H-U, Dieckmann K-P, Heidenreich A, et al. Randomized Phase III Trial Comparing Retroperitoneal Lymph Node Dissection With One Course of Bleomycin and Etoposide Plus Cisplatin Chemotherapy in the Adjuvant Treatment of Clinical Stage I Nonseminomatous Testicular Germ Cell Tumors: AUO Trial AH 01/94 by the German Testicular Cancer Study Group. *J Clin Oncol*. 20 de junio de 2008;26(18):2966-72.
 180. Huddart RA, Joffe JK, White JD, Hutton P, Lewis R, Mazhar D, et al. 111: A single-arm trial evaluating one cycle of BEP as adjuvant chemotherapy in high-risk, stage 1 non-seminomatous or combined germ cell tumors of the testis (NSGCTT). *J Clin Oncol*. 20 de febrero de 2017;35(6_suppl):400-400.
 181. Oliver RTD, Ong J, Shamash J, Ravi R, Nagund V, Harper P, et al. long-term follow-up of anglian germ cell cancer group surveillance versus patients with stage 1 nonseminoma treated with adjuvant chemotherapy. *Urology*. marzo de 2004;63(3):556-61.
 182. Ståhl O, Eberhard J, Jepson K, Spano M, Cwikiel M, Cavallin-Ståhl E, et al. Sperm DNA integrity in testicular cancer patients. *Hum Reprod Oxf Engl*. diciembre de 2006;21(12):3199-205.
 183. Eberhard J, Ståhl O, Giwercman Y, Cwikiel M, Cavallin-Ståhl E, Lundin KB, et al. Impact of therapy and androgen receptor polymorphism on sperm concentration in men treated for testicular germ cell cancer: a longitudinal study. *Hum Reprod Oxf Engl*. junio de 2004;19(6):1418-25.
 184. Eberhard J, Ståhl O, Cwikiel M, Cavallin-Ståhl E, Giwercman Y, Salmonson EC, et al. Risk factors for post-treatment hypogonadism in testicular cancer patients. *Eur J Endocrinol*. abril de 2008;158(4):561-70.
 185. Skoogh J, Steineck G, Stierner UK, Cavllin-Ståhl E, Olofsson U, Wallin A, et al. Long-term cognitive function among testicular cancer survivors treated with chemotherapy. *J Clin Oncol*. 20 de mayo de 2008;26(15_suppl):5035-5035.
 186. Meinardi MT, Gietema JA, van der Graaf WT, van Veldhuisen DJ, Runne MA, Sluiter WJ, et al. Cardiovascular morbidity in long-term survivors of metastatic testicular cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. abril de 2000;18(8):1725-32.
 187. Fosså SD, Lehne G, Heimdal K, Theodorsen L. Clinical and biochemical long-term toxicity after postoperative cisplatin-based chemotherapy in patients with low-stage testicular cancer. *Oncology*. agosto de 1995;52(4):300-5.
 188. Fosså SD, Aass N, Winderen M, Börner OP, Olsen DR. Long-term renal function after treatment for malignant germ-cell tumours. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. febrero de 2002;13(2):222-8.
 189. Haugnes HS, Aass N, Fosså SD, Dahl O, Klepp O, Wist EA, et al. Components of the metabolic syndrome in long-term survivors of testicular cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. febrero de 2007;18(2):241-8.
 190. Van den Belt-Dusebout AW, de Wit R, Gietema JA, Horenblas S, Louwman MWJ, Ribot JG, et al. Treatment-Specific Risks of Second Malignancies and Cardiovascular Disease in 5-Year Survivors of Testicular Cancer. *J Clin Oncol*. octubre de 2007;25(28):4370-8.



191. Travis LB, Beard C, Allan JM, Dahl AA, Feldman DR, Oldenburg J, et al. Testicular Cancer Survivorship: Research Strategies and Recommendations. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 4 de agosto de 2010;102(15):1114-30.
192. Travis LB, Andersson M, Gospodarowicz M, van Leeuwen FE, Bergfeldt K, Lynch CF, et al. Treatment-associated leukemia following testicular cancer. *J Natl Cancer Inst.* 19 de julio de 2000;92(14):1165-71.
193. Stephenson AJ, Bosl GJ, Bajorin DF, Stasi J, Motzer RJ, Sheinfeld J. Retroperitoneal lymph node dissection in patients with low stage testicular cancer with embryonal carcinoma predominance and/or lymphovascular invasion. *J Urol.* Agosto de 2005;174(2):557-60; discussion 560.
194. Kondagunta GV, Sheinfeld J, Mazumdar M, Mariani TV, Bajorin D, Bacik J, et al. Relapse-free and overall survival in patients with pathologic stage II nonseminomatous germ cell cancer treated with etoposide and cisplatin adjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 de febrero de 2004;22(3):464-7.
195. Hermans BP, Sweeney CJ, Foster RS, Einhorn LE, Donohue JP. Risk of systemic metastases in clinical stage I nonseminoma germ cell testis tumor managed by retroperitoneal lymph node dissection. *J Urol.* Junio de 2000;163(6):1721-4.
196. Motzer RJ, Agarwal N, Beard C, Bhayani S, Bolger GB, Buyyounouski MK, et al. Testicular cancer. *J Natl Compr Cancer Netw JNCCN.* Abril de 2012;10(4):502-35.
197. Einhorn EH. Testicular cancer: an oncological success story. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* Diciembre de 1997;3(12 Pt 2):2630-2.
198. Loehrer PJ, Gonin R, Nichols CR, Weathers T, Einhorn LH. Vinblastine plus ifosfamide plus cisplatin as initial salvage therapy in recurrent germ cell tumor. *J Clin Oncol.* Julio de 1998;16(7):2500-4.
199. Motzer RJ, Bajorin DF, Vlamis V, Weisen S, Bosl GJ. Ifosfamide-based chemotherapy for patients with resistant germ cell tumors: the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center experience. *Semin Oncol.* Diciembre de 1992;19(6 Suppl 12):8-11.
200. Einhorn LH, Williams SD, Chamness A, Brames MJ, Perkins SM, Abonour R. High-Dose Chemotherapy and Stem-Cell Rescue for Metastatic Germ-Cell Tumors. *N Engl J Med.* 26 de julio de 2007;357(4):340-8.
201. Feldman DR, Sheinfeld J, Bajorin DF, Fischer P, Turkula S, Ishill N, et al. TI-CE High-Dose Chemotherapy for Patients With Previously Treated Germ Cell Tumors: Results and Prognostic Factor Analysis. *J Clin Oncol.* Abril de 2010;28(10):1706-13.
202. Standard-Dose Combination Chemotherapy or High-Dose Combination Chemotherapy and Stem Cell Transplant in Treating Patients With Relapsed or Refractory Germ Cell Tumors. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02375204>.
203. Murphy BR, Breeden ES, Donohue JP, Messemer J, Walsh W, Roth BJ, et al. Surgical salvage of chemorefractory germ cell tumors. *J Clin Oncol.* Febrero de 1993;11(2):324-9.
204. Van de Vijver MJ, He YD, van 't Veer LJ, Dai H, Hart AAM, Voskuil DW, et al. A Gene-Expression Signature as a Predictor of Survival in Breast Cancer. *N Engl J Med.* 19 de diciembre de 2002;347(25):1999-2009.
205. Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, Shah R, Varambally S, Kurachi K, et al. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature.* Agosto de 2001;412(6849):822-6.
206. Chen H-Y, Yu S-L, Chen C-H, Chang G-C, Chen C-Y, Yuan A, et al. A Five-Gene Signature and Clinical Outcome in Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 4 de enero de 2007;356(1):11-20.
207. Korkola JE, Houldsworth J, Feldman DR, Olshen AB, Qin L-X, Patil S, et al. Identification and Validation of a Gene Expression Signature That Predicts Outcome in Adult Men With Germ Cell Tumors. *J Clin Oncol.* Noviembre de 2009;27(31):5240-7.
208. Chieffi P, Chieffi S. Molecular biomarkers as potential targets for therapeutic strategies in human testicular germ cell tumors: an overview. *J Cell Physiol.* Agosto de 2013;228(8):1641-6.
209. Noel EE, Yeste-Velasco M, Mao X, Perry J, Kudahetti SC, Li NF, et al. The Association of CCND1 Overexpression and Cisplatin Resistance in Testicular Germ Cell Tumors and Other Cancers. *Am J Pathol.* Junio de 2010;176(6):2607-15.
210. Korkola JE, Heck S, Olshen AB, Feldman DR, Reuter VE, Houldsworth J, et al. Development and Validation of a Gene-Based Model for Outcome Prediction in Germ



- Cell Tumors Using a Combined Genomic and Expression Profiling Approach. Kerr C, editor. PLOS ONE. 1 de diciembre de 2015;10(12):e0142846.
211. De Wit R. Refinement of the Management of Germ Cell Cancer: What's Next? *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 4 de octubre de 2019;JCO1902302.
 212. Bellman R, Dreyfus S. *Dynamic programming*. 1. Princeton Landmarks in Mathematics ed., with a new introduction. Princeton, NJ: Princeton University Press; 2010. 340 p. (Princeton Landmarks in mathematics).
 213. Hira ZM, Gillies DF. A Review of Feature Selection and Feature Extraction Methods Applied on Microarray Data. *Adv Bioinforma*. 2015;2015:1-13.
 214. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer Genome Landscapes. *Science*. 29 de marzo de 2013;339(6127):1546-58.
 215. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*. Agosto de 2004;10(8):789-99.
 216. Radtke F, Raj K. The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? *Nat Rev Cancer*. Diciembre de 2003;3(10):756-67.
 217. Miele L, Osborne B. Arbitrator of differentiation and death: Notch signaling meets apoptosis. *J Cell Physiol*. Diciembre de 1999;181(3):393-409.
 218. Rangarajan A. Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *EMBO J*. 2 de julio de 2001;20(13):3427-36.
 219. Nicolas M, Wolfer A, Raj K, Kummer JA, Mill P, van Noort M, et al. Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat Genet*. Marzo de 2003;33(3):416-21.
 220. Baron R, Rawadi G. Wnt signaling and the regulation of bone mass. *Curr Osteoporos Rep*. Junio de 2007;5(2):73-80.
 221. Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, et al. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell*. 31 de diciembre de 1993;75(7):1417-30.
 222. Krauss S, Concordet J-P, Ingham PW. A functionally conserved homolog of the *Drosophila* segment polarity gene *hh* is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. *Cell*. Diciembre de 1993;75(7):1431-44.
 223. Riddle RD, Johnson RL, Laufer E, Tabin C. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell*. Diciembre de 1993;75(7):1401-16.
 224. Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev*. 1 de diciembre de 2001;15(23):3059-87.
 225. McMahon AP, Ingham PW, Tabin CJ. Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr Top Dev Biol*. 2003;53:1-114.
 226. Ingham PW, Placzek M. Orchestrating ontogenesis: variations on a theme by sonic hedgehog. *Nat Rev Genet*. Noviembre de 2006;7(11):841-50.
 227. Callejo A, Culi J, Guerrero I. Patched, the receptor of Hedgehog, is a lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci*. 22 de enero de 2008;105(3):912-7.
 228. Umehara F, Tate G, Itoh K, Yamaguchi N, Douchi T, Mitsuya T, et al. A novel mutation of desert hedgehog in a patient with 46,XY partial gonadal dysgenesis accompanied by minifascicular neuropathy. *Am J Hum Genet*. Noviembre de 2000;67(5):1302-5.
 229. Bitgood MJ, Shen L, McMahon AP. Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr Biol*. Marzo de 1996;6(3):298-304.
 230. Palma V. Hedgehog-Gli signaling regulates the behavior of cells with stem cell properties in the developing neocortex. *Development*. 10 de diciembre de 2003;131(2):337-45.
 231. Lai K, Kaspar BK, Gage FH, Schaffer DV. Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat Neurosci*. Enero de 2003;6(1):21-7.
 232. Ruiz i Altaba A, Mas C, Stecca B. The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer. *Trends Cell Biol*. Septiembre de 2007;17(9):438-47.
 233. Bhaumik SR, Smith E, Shilatifard A. Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nat Struct Mol Biol*. Noviembre de 2007;14(11):1008-16.
 234. Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. Septiembre de 1997;389(6648):251-60.
 235. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 23 de febrero de 2007;128(4):693-705.



236. Campos EI, Reinberg D. Histones: annotating chromatin. *Annu Rev Genet.* 2009;43:559-99.
237. Lee TI, Young RA. Transcriptional Regulation and Its Misregulation in Disease. *Cell.* Marzo de 2013;152(6):1237-51.
238. Casamassimi A, Federico A, Rienzo M, Esposito S, Ciccocicola A. Transcriptome Profiling in Human Diseases: New Advances and Perspectives. *Int J Mol Sci.* 29 de julio de 2017;18(8):1652.
239. Subba Rao K. Mechanisms of disease: DNA repair defects and neurological disease. *Nat Clin Pract Neurol.* Marzo de 2007;3(3):162-72.
240. Durocher D, Jackson SP. DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme? *Curr Opin Cell Biol.* Abril de 2001;13(2):225-31.
241. Huen MS, Chen J. The DNA damage response pathways: at the crossroad of protein modifications. *Cell Res.* Enero de 2008;18(1):8-16.
242. Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER, Hurov KE, Luo J, et al. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science.* 25 de mayo de 2007;316(5828):1160-6.
243. Katsuno Y, Lamouille S, Derynck R. TGF- β signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression: *Curr Opin Oncol.* Enero de 2013;25(1):76-84.
244. Heldin C-H, Vanlandewijck M, Moustakas A. Regulation of EMT by TGF β in cancer. *FEBS Lett.* 4 de julio de 2012;586(14):1959-70.
245. Moustakas A, Heldin C-H. Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Sci.* Octubre de 2007;98(10):1512-20.
246. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* Febrero de 2009;19(2):156-72.
247. Massagué J. TGF β signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Octubre de 2012;13(10):616-30.
248. Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, Bonni S, Zhu H, Thomsen GH, et al. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol Cell.* Diciembre de 2000;6(6):1365-75.
249. Ebisawa T, Fukuchi M, Murakami G, Chiba T, Tanaka K, Imamura T, et al. Smurf1 Interacts with Transforming Growth Factor- β Type I Receptor through Smad7 and Induces Receptor Degradation. *J Biol Chem.* 20 de abril de 2001;276(16):12477-80.
250. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature.* Octubre de 2003;425(6958):577-84.
251. Heldin C-H, Landström M, Moustakas A. Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol.* Abril de 2009;21(2):166-76.
252. Xie F, Ling L, van Dam H, Zhou F, Zhang L. TGF- β signaling in cancer metastasis. *Acta Biochim Biophys Sin.* 1 de enero de 2018;50(1):121-32.
253. De Luca A, Maiello MR, D'Alessio A, Pergameno M, Normanno N. The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets.* Abril de 2012;16(sup2):S17-27.
254. Yang S-H, Sharrocks AD, Whitmarsh AJ. MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. *Gene.* 15 de enero de 2013;513(1):1-13.
255. Cossa G, Gatti L, Cassinelli G, Lanzi C, Zaffaroni N, Perego P. Modulation of sensitivity to antitumor agents by targeting the MAPK survival pathway. *Curr Pharm Des.* 2013;19(5):883-94.
256. Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol.* Abril de 1997;9(2):180-6.
257. Burotto M, Chiou VL, Lee J-M, Kohn EC. The MAPK pathway across different malignancies: A new perspective: Tissue-Specific MAPK Signaling. *Cancer.* 15 de noviembre de 2014;120(22):3446-56.
258. Bromberg J. Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest.* 1 de mayo de 2002;109(9):1139-42.
259. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet.* Agosto de 2006;7(8):606-19.
260. Carracedo A, Pandolfi PP. The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene.* 18 de septiembre de 2008;27(41):5527-41.



- 261.Xia D, Srinivas H, Ahn Y-H, Sethi G, Sheng X, Yung WKA, et al. Mitogen-activated protein kinase kinase-4 promotes cell survival by decreasing PTEN expression through an NF kappa B-dependent pathway. *J Biol Chem.* 9 de febrero de 2007;282(6):3507-19.
- 262.Beck SE, Carethers JM. BMP suppresses PTEN expression via RAS/ERK signaling. *Cancer Biol Ther.* Agosto de 2007;6(8):1313-7.
- 263.Vasudevan KM, Burikhanov R, Goswami A, Rangnekar VM. Suppression of PTEN expression is essential for antiapoptosis and cellular transformation by oncogenic Ras. *Cancer Res.* 1 de noviembre de 2007;67(21):10343-50.
- 264.Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Clark GJ, Der CJ. Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene.* 17 de septiembre de 1998;17(11 Reviews):1395-413.
- 265.Baraja PC. La ruta RAS-ERK como diana antitumoral. :15.
- 266.Dalton S. Linking the Cell Cycle to Cell Fate Decisions. *Trends Cell Biol.* Octubre de 2015;25(10):592-600.
- 267.Kulkarni MM. Digital Multiplexed Gene Expression Analysis Using the NanoString nCounter System. En: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, et al., editores. *Current Protocols in Molecular Biology* [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2011 [citado 16 de marzo de 2019]. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471142727.mb25b10s94>
- 268.Zhang B, Horvath S. A general framework for weighted gene co-expression network analysis. *Stat Appl Genet Mol Biol.* 2005;4:Article17.
- 269.Horvath S, Zhang B, Carlson M, Lu KV, Zhu S, Felciano RM, et al. Analysis of oncogenic signaling networks in glioblastoma identifies ASPM as a molecular target. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 14 de noviembre de 2006;103(46):17402-7.
- 270.Horvath S. *Weighted network analysis: applications in genomics and systems biology.* New York: Springer; 2011.
- 271.Bokemeyer C, Oechsle K, Honecker F, Mayer F, Hartmann JT, Waller CF, et al. Combination chemotherapy with gemcitabine, oxaliplatin, and paclitaxel in patients with cisplatin-refractory or multiply relapsed germ-cell tumors: a study of the German Testicular Cancer Study Group. *Ann Oncol.* 14 de septiembre de 2007;19(3):448-53.
- 272.Kollmannsberger C, Mayer F, Pressler H, Koch S, Kanz L, Oosterhuis JW, et al. Absence of c-KIT and members of the epidermal growth factor receptor family in refractory germ cell cancer. *Cancer.* 15 de julio de 2002;95(2):301-8.
- 273.Juliachs M, Castillo-Ávila W, Vidal A, Piulats JM, García Del Muro X, Condom E, et al. ErbBs inhibition by lapatinib blocks tumor growth in an orthotopic model of human testicular germ cell tumor. *Int J Cancer.* Julio de 2013;133(1):235-46.
- 274.A Phase II Study of Sunitinib and Erlotinib in Recurrent/Refractory Germ Cell Tumors. Available from: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01962896>.
- 275.Juliachs M, Vidal A, del Muro XG, Piulats JM, Condom E, Casanovas O, et al. Effectivity of pazopanib treatment in orthotopic models of human testicular germ cell tumors. *BMC Cancer.* Diciembre de 2013;13(1):382.
- 276.Kollmannsberger C, Pressler H, Mayer F, Kanz L, Bokemeyer C. Cisplatin-refractory, HER2/neu-expressing germ-cell cancer: induction of remission by the monoclonal antibody Trastuzumab. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* Noviembre de 1999;10(11):1393-4.
- 277.Mego M, Svetlovska D, Miskovska V, Obertova J, Palacka P, Rajec J, et al. Phase II study of everolimus in refractory testicular germ cell tumors. *Urol Oncol.* Marzo de 2016;34(3):122.e17-22.
- 278.Fenner M, Oing C, Dieing A, Gauler T, Oechsle K, Lorch A, et al. Everolimus in patients with multiply relapsed or cisplatin refractory germ cell tumors: results of a phase II, single-arm, open-label multicenter trial (RADIT) of the German Testicular Cancer Study Group. *J Cancer Res Clin Oncol.* Marzo de 2019;145(3):717-23.
- 279.Einhorn LH, Brames MJ, Heinrich MC, Corless CL, Madani A. Phase II study of imatinib mesylate in chemotherapy refractory germ cell tumors expressing KIT. *Am J Clin Oncol.* Febrero de 2006;29(1):12-3.
- 280.Piulats JM, García del Muro X, Huddart R, Aparicio J, Paz-Ares L, Sanchez M, Olmos d, et al. Phase II multicenter study of imatinib in patients with chemorefractory germ cell tumors that express c-kit. *Cancer Research* 2007.
- 281.Pectasides D, Nikolaou M, Pectasides E, Koumariou A, Valavanis C, Economopoulos T. Complete response after imatinib mesylate administration in a patient with chemoresistant stage IV seminoma. *Anticancer Res.* Agosto de 2008;28(4C):2317-20.

282. Pedersini R, Vattemi E, Mazzoleni G, Graiff C. Complete response after treatment with imatinib in pretreated disseminated testicular seminoma with overexpression of c-KIT. *Lancet Oncol*. Noviembre de 2007;8(11):1039-40.
283. Voigt W, Kegel T, Maher G, Jordan K, Müller L, Schmoll H-J. Bevacizumab plus high-dose ifosfamide, etoposide and carboplatin (HD-ICE) as third-line salvage chemotherapy induced an unexpected dramatic response in highly platinum refractory germ-cell cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. Marzo de 2006;17(3):531-3.
284. Mego M, Recková M, Sycova-Mila Z, Obertova J, Brozmanova K, Salek T, et al. Bevacizumab in a growing teratoma syndrome. Case report. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. Mayo de 2007;18(5):962-3.
285. Jain A, Brames MJ, Vaughn DJ, Einhorn LH. Phase II clinical trial of oxaliplatin and bevacizumab in refractory germ cell tumors. *Am J Clin Oncol*. Octubre de 2014;37(5):450-3.
286. Oechsle K, Kollmannsberger C, Honecker F, Mayer F, Waller CF, Hartmann JT, et al. Long-term survival after treatment with gemcitabine and oxaliplatin with and without paclitaxel plus secondary surgery in patients with cisplatin-refractory and/or multiply relapsed germ cell tumors. *Eur Urol*. Octubre de 2011;60(4):850-5.
287. Kollmannsberger C, Rick O, Derigs H-G, Schleucher N, Schöffski P, Beyer J, et al. Activity of oxaliplatin in patients with relapsed or cisplatin-refractory germ cell cancer: a study of the German Testicular Cancer Study Group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 15 de abril de 2002;20(8):2031-7.
288. Nieto Y, Tu S-M, Bassett R, Jones RB, Gulbis AM, Tannir N, et al. Bevacizumab/high-dose chemotherapy with autologous stem-cell transplant for poor-risk relapsed or refractory germ-cell tumors. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. Octubre de 2015;26(10):2125-32.
289. Rick O, Braun T, Siegert W, Beyer J. Activity of thalidomide in patients with platinum-refractory germ-cell tumours. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. Agosto de 2006;42(12):1775-9.
290. Oechsle K, Bokemeyer C, Honecker F. Lenalidomide in patients with cisplatin-refractory and multiply relapsed germ cell tumors. *J Cancer Res Clin Oncol*. Enero de 2010;136(1):165-7.
291. Viglietto G, Romano A, Maglione D, Rambaldi M, Paoletti I, Lago CT, et al. Neovascularization in human germ cell tumors correlates with a marked increase in the expression of the vascular endothelial growth factor but not the placenta-derived growth factor. *Oncogene*. 1 de agosto de 1996;13(3):577-87.
292. Castillo-Avila W, Piulats JM, Garcia Del Muro X, Vidal A, Condom E, Casanovas O, et al. Sunitinib inhibits tumor growth and synergizes with cisplatin in orthotopic models of cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant human testicular germ cell tumors. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 de mayo de 2009;15(10):3384-95.
293. Oechsle K, Honecker F, Cheng T, Mayer F, Czaykowski P, Winquist E, et al. Preclinical and clinical activity of sunitinib in patients with cisplatin-refractory or multiply relapsed germ cell tumors: a Canadian Urologic Oncology Group/German Testicular Cancer Study Group cooperative study. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. Diciembre de 2011;22(12):2654-60.
294. Subbiah V, Meric-Bernstam F, Mills GB, Shaw KRM, Bailey AM, Rao P, et al. Next generation sequencing analysis of platinum refractory advanced germ cell tumor sensitive to Sunitinib (Sutent®) a VEGFR2/PDGFRβ/c-kit/ FLT3/RET/CSF1R inhibitor in a phase II trial. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol*. 1 de agosto de 2014;7:52.
295. Feldman DR, Turkula S, Ginsberg MS, Ishill N, Patil S, Carousso M, et al. Phase II trial of sunitinib in patients with relapsed or refractory germ cell tumors. *Invest New Drugs*. Agosto de 2010;28(4):523-8.
296. Necchi A, Lo Vullo S, Giannatempo P, Raggi D, Calareso G, Togliardi E, et al. Pazopanib in advanced germ cell tumors after chemotherapy failure: results of the open-label, single-arm, phase 2 Pazotest trial. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 01 de 2017;28(6):1346-51.
297. Skoneczna IA, Natorka U, Tacikowska M, Kraszewska E, Kotowicz B, Fuksiewicz M, et al. Sorafenib monotherapy in patients with inoperable/recurrent germ cell tumors (GCT) refractory to chemotherapy: Phase II study. *J Clin Oncol*. 1 de febrero de 2014;32(4_suppl):367-367.



- 298.Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:677-704.
- 299.Fankhauser CD, Curioni-Fontecedro A, Allmann V, Beyer J, Tischler V, Sulser T, et al. Frequent PD-L1 expression in testicular germ cell tumors. *Br J Cancer.* 28 de julio de 2015;113(3):411-3.
- 300.Cierna Z, Mego M, Miskovska V, Machalekova K, Chovanec M, Svetlovska D, et al. Prognostic value of programmed-death-1 receptor (PD-1) and its ligand 1 (PD-L1) in testicular germ cell tumors. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* Febrero de 2016;27(2):300-5.
- 301.Zschäbitz S, Lasitschka F, Hadaschik B, Hofheinz R-D, Jentsch-Ullrich K, Grüner M, et al. Response to anti-programmed cell death protein-1 antibodies in men treated for platinum refractory germ cell cancer relapsed after high-dose chemotherapy and stem cell transplantation. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2017;76:1-7.
- 302.Adra N, Einhorn LH, Althouse SK, Ammakkanavar NR, Musapatika D, Albany C, et al. Phase II trial of pembrolizumab in patients with platinum refractory germ-cell tumors: a Hoosier Cancer Research Network Study GU14-206. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 01 de 2018;29(1):209-14.
- 303.Vaughn DJ, Flaherty K, Lal P, Gallagher M, O'Dwyer P, Wilner K, et al. Treatment of Growing Teratoma Syndrome. *N Engl J Med.* 22 de enero de 2009;360(4):423-4.
- 304.Vaughn DJ, Hwang W-T, Lal P, Rosen MA, Gallagher M, O'Dwyer PJ. Phase 2 trial of the cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in patients with retinoblastoma protein-expressing germ cell tumors. *Cancer.* 1 de mayo de 2015;121(9):1463-8.
- 305.Guggenheim ER, Ondrus AE, Movassaghi M, Lippard SJ. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity facilitates the dissociation of nuclear proteins from platinum-modified DNA. *Bioorg Med Chem.* 1 de diciembre de 2008;16(23):10121-8.
- 306.Feldman DR, Einhorn LH, Quinn DI, Loria Y, Joffe JK, Vaughn DJ, et al. A phase 2 multicenter study of tivantinib (ARQ 197) monotherapy in patients with relapsed or refractory germ cell tumors. *Invest New Drugs.* Agosto de 2013;31(4):1016-22.
- 307.Necchi A, Magazzu D, Anichini A, Raggi D, Giannatempo P, Nicolai N, et al. An open-label, single-group, phase 2 study of brentuximab vedotin as salvage therapy for males with relapsed germ-cell tumors (GCT): Results at the end of first stage (FM12GCT01). *J Clin Oncol.* 10 de enero de 2016;34(2_suppl):480-480.
- 308.Albany C, Feldman DR, Garbo LE, Einhorn LH. Antitumor activity of brentuximab vedotin in CD30 positive refractory germ cell tumors. *J Clin Oncol.* 20 de febrero de 2013;31(6_suppl):327-327.
- 309.Murphy BR, Breeden ES, Donohue JP, Messemer J, Walsh W, Roth BJ, et al. Surgical salvage of chemorefractory germ cell tumors. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* Febrero de 1993;11(2):324-9.
- 310.Dieckmann K-P, Radtke A, Geczi L, Matthies C, Anheuser P, Eckardt U, et al. Serum Levels of MicroRNA-371a-3p (M371 Test) as a New Biomarker of Testicular Germ Cell Tumors: Results of a Prospective Multicentric Study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 de junio de 2019;37(16):1412-23.
- 311.Nappi L, Thi M, Lum A, Huntsman D, Eigl BJ, Martin C, et al. Developing a Highly Specific Biomarker for Germ Cell Malignancies: Plasma miR371 Expression Across the Germ Cell Malignancy Spectrum. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 25 de septiembre de 2019;JCO1802057.
- 312.Heintz NH, Janssen YM, Mossman BT. Persistent induction of c-fos and c-jun expression by asbestos. *Proc Natl Acad Sci.* 15 de abril de 1993;90(8):3299-303.
- 313.Zanella CL, Posada J, Tritton TR, Mossman BT. Asbestos causes stimulation of the extracellular signal-regulated kinase 1 mitogen-activated protein kinase cascade after phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res.* 1 de diciembre de 1996;56(23):5334-8.
- 314.Shaulian E, Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene.* 30 de abril de 2001;20(19):2390-400.
- 315.Milde-Langosch K. The Fos family of transcription factors and their role in tumorigenesis. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. Noviembre de 2005;41(16):2449-61.
- 316.Hu YC, Lam KY, Law S, Wong J, Srivastava G. Identification of differentially expressed genes in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) by cDNA expression array: overexpression of Fra-1, Neogenin, Id-1, and CDC25B genes in ESCC. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* agosto de 2001;7(8):2213-21.



317. Ramos-Nino ME, Scapoli L, Martinelli M, Land S, Mossman BT. Microarray analysis and RNA silencing link fra-1 to cd44 and c-met expression in mesothelioma. *Cancer Res.* 1 de julio de 2003;63(13):3539-45.
318. Hapke S, Kessler H, Lubber B, Bengel A, Hutzler P, Höfler H, et al. Ovarian cancer cell proliferation and motility is induced by engagement of integrin alpha(v)beta3/Vitronectin interaction. *Biol Chem.* Julio de 2003;384(7):1073-83.
319. Diesch J, Sanij E, Gilan O, Love C, Tran H, Fleming NI, et al. Widespread FRA1-dependent control of mesenchymal transdifferentiation programs in colorectal cancer cells. *PloS One.* 2014;9(3):e88950.
320. Young MR, Colburn NH. Fra-1 a target for cancer prevention or intervention. *Gene.* 1 de septiembre de 2006;379:1-11.
321. Zhong G, Chen X, Fang X, Wang D, Xie M, Chen Q. Fra-1 is upregulated in lung cancer tissues and inhibits the apoptosis of lung cancer cells by the P53 signaling pathway. *Oncol Rep.* Enero de 2016;35(1):447-53.
322. Chiappetta G, Ferraro A, Botti G, Monaco M, Pasquinelli R, Vuttariello E, et al. FRA-1 protein overexpression is a feature of hyperplastic and neoplastic breast disorders. *BMC Cancer.* Diciembre de 2007;7(1):17.
323. Belguise K, Kersual N, Galtier F, Chalbos D. FRA-1 expression level regulates proliferation and invasiveness of breast cancer cells. *Oncogene.* 17 de febrero de 2005;24(8):1434-44.
324. Abraham AG, O'Neill E. PI3K/Akt-mediated regulation of p53 in cancer. *Biochem Soc Trans.* Agosto de 2014;42(4):798-803.
325. Stinson S, Lackner MR, Adai AT, Yu N, Kim H-J, O'Brien C, et al. miR-221/222 targeting of trichorhinophalangeal 1 (TRPS1) promotes epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer. *Sci Signal.* 9 de agosto de 2011;4(186):pt5.
326. Tchernitsa OI, Sers C, Zuber J, Hinzmann B, Grips M, Schramme A, et al. Transcriptional basis of KRAS oncogene-mediated cellular transformation in ovarian epithelial cells. *Oncogene.* 3 de junio de 2004;23(26):4536-55.
327. Ramos-Nino ME, Timblin CR, Mossman BT. Mesothelial cell transformation requires increased AP-1 binding activity and ERK-dependent Fra-1 expression. *Cancer Res.* 1 de noviembre de 2002;62(21):6065-9.
328. Ramos-Nino ME, Blumen SR, Pass H, Mossman BT. Fra-1 governs cell migration via modulation of CD44 expression in human mesotheliomas. *Mol Cancer.* 2007;6(1):81.
329. Zhang Q, Adiseshaiah P, Reddy SP. Matrix metalloproteinase/epidermal growth factor receptor/mitogen-activated protein kinase signaling regulate fra-1 induction by cigarette smoke in lung epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* Enero de 2005;32(1):72-81.
330. Ma K, Chang D, Gong M, Ding F, Luo A, Tian F, et al. Expression and significance of FRA-1 in non-small-cell lung cancer. *Cancer Invest.* Marzo de 2009;27(3):353-9.
331. Gruda MC, Kovary K, Metz R, Bravo R. Regulation of Fra-1 and Fra-2 phosphorylation differs during the cell cycle of fibroblasts and phosphorylation in vitro by MAP kinase affects DNA binding activity. *Oncogene.* Septiembre de 1994;9(9):2537-47.
332. Lv L, Shen Z, Zhang J, Zhang H, Dong J, Yan Y, et al. Clinicopathological significance of SIRT1 expression in colorectal adenocarcinoma. *Med Oncol Northwood Lond Engl.* Junio de 2014;31(6):965.
333. Li C, Wang L, Zheng L, Zhan X, Xu B, Jiang J, et al. SIRT1 expression is associated with poor prognosis of lung adenocarcinoma. *OncoTargets Ther.* 2015;8:977-84.
334. Ng DC, Shafae S, Lee D, Bikle DD. Requirement of an AP-1 site in the calcium response region of the involucrin promoter. *J Biol Chem.* 4 de agosto de 2000;275(31):24080-8.
335. Debinski W, Gibo DM. Fos-related antigen 1 modulates malignant features of glioma cells. *Mol Cancer Res MCR.* Abril de 2005;3(4):237-49.
336. Usui A, Hoshino I, Akutsu Y, Sakata H, Nishimori T, Murakami K, et al. The molecular role of Fra-1 and its prognostic significance in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer.* 1 de julio de 2012;118(13):3387-96.
337. Rösl F, Das BC, Lengert M, Geletneký K, zur Hausen H. Antioxidant-induced changes of the AP-1 transcription complex are paralleled by a selective suppression of human papillomavirus transcription. *J Virol.* Enero de 1997;71(1):362-70.
338. Meetei AR, Sechi S, Wallisch M, Yang D, Young MK, Joenje H, et al. A multiprotein nuclear complex connects Fanconi anemia and Bloom syndrome. *Mol Cell Biol.* Mayo de 2003;23(10):3417-26.



339. Kazama S, Kitayama J, Hiyoshi M, Taketomi Y, Murakami M, Nishikawa T, et al. Phospholipase A2 Group III and Group X Have Opposing Associations with Prognosis in Colorectal Cancer. *ANTICANCER Res.* 2015;8.
340. Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature.* 9 de marzo de 1995;374(6518):131-4.
341. Sherr CJ. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell.* 18 de noviembre de 1994;79(4):551-5.
342. Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science.* 16 de diciembre de 1994;266(5192):1821-8.
343. Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell.* 18 de noviembre de 1994;79(4):573-82.
344. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst.* 7 de junio de 1995;87(11):796-802.
345. Tokumaru Y, Yamashita K, Osada M, Nomoto S, Sun D-I, Xiao Y, et al. Inverse correlation between cyclin A1 hypermethylation and p53 mutation in head and neck cancer identified by reversal of epigenetic silencing. *Cancer Res.* 1 de septiembre de 2004;64(17):5982-7.
346. Sriuranpong V, Mutirangura A, Gillespie JW, Patel V, Amornphimoltham P, Molinolo AA, et al. Global gene expression profile of nasopharyngeal carcinoma by laser capture microdissection and complementary DNA microarrays. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 de agosto de 2004;10(15):4944-58.
347. Maxwell SA, Davis GE. Differential gene expression in p53-mediated apoptosis-resistant vs. apoptosis-sensitive tumor cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 21 de noviembre de 2000;97(24):13009-14.
348. Müller-Tidow C, Ji P, Diederichs S, Potratz J, Bäumer N, Köhler G, et al. The cyclin A1-CDK2 complex regulates DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol.* Octubre de 2004;24(20):8917-28.
349. Xu X-L, Yu J, Zhang H-Y, Sun M-H, Gu J, Du X, et al. Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol.* 1 de diciembre de 2004;10(23):3441-54.
350. Kittumthorn N, Yanatatsanajit P, Kiatpongsan S, Phokaew C, Triratanachat S, Trivijitsilp P, et al. Cyclin A1 promoter hypermethylation in human papillomavirus-associated cervical cancer. *BMC Cancer.* 8 de marzo de 2006;6:55.
351. Wegiel B, Bjartell A, Tuomela J, Dizeyi N, Tinzl M, Helczynski L, et al. Multiple cellular mechanisms related to cyclin A1 in prostate cancer invasion and metastasis. *J Natl Cancer Inst.* 16 de julio de 2008;100(14):1022-36.
352. Hawkins PT, Anderson KE, Davidson K, Stephens LR. Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochem Soc Trans.* Noviembre de 2006;34(Pt 5):647-62.
353. Bader AG, Kang S, Zhao L, Vogt PK. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer.* Diciembre de 2005;5(12):921-9.
354. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science.* 31 de mayo de 2002;296(5573):1655-7.
355. Tomida S, Yatabe Y, Yanagisawa K, Mitsudomi T, Takahashi T. Throwing new light on lung cancer pathogenesis: updates on three recent topics. *Cancer Sci.* Febrero de 2005;96(2):63-8.
356. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science.* 23 de abril de 2004;304(5670):554.
357. Campbell IG, Russell SE, Choong DYH, Montgomery KG, Ciavarella ML, Hooi CSF, et al. Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Res.* 1 de noviembre de 2004;64(21):7678-81.
358. Bachman KE, Argani P, Samuels Y, Silliman N, Ptak J, Szabo S, et al. The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. *Cancer Biol Ther.* Agosto de 2004;3(8):772-5.
359. Levine DA, Bogomolny F, Yee CJ, Lash A, Barakat RR, Borgen PI, et al. Frequent mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancers. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 de abril de 2005;11(8):2875-8.



360. Wu G, Xing M, Mambo E, Huang X, Liu J, Guo Z, et al. Somatic mutation and gain of copy number of PIK3CA in human breast cancer. *Breast Cancer Res.* Octubre de 2005;7(5):R609.
361. Lee JW, Soung YH, Kim SY, Lee HW, Park WS, Nam SW, et al. PIK3CA gene is frequently mutated in breast carcinomas and hepatocellular carcinomas. *Oncogene.* 17 de febrero de 2005;24(8):1477-80.
362. Barber DF, Alvarado-Kristensson M, González-García A, Pulido R, Carrera AC. PTEN regulation, a novel function for the p85 subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Sci STKE Signal Transduct Knowl Environ.* 21 de noviembre de 2006;2006(362):pe49.
363. Byun D-S, Cho K, Ryu B-K, Lee M-G, Park J-I, Chae K-S, et al. Frequent monoallelic deletion of PTEN and its reciprocal association with PIK3CA amplification in gastric carcinoma. *Int J Cancer.* 10 de abril de 2003;104(3):318-27.
364. Wee S, Wiederschain D, Maira S-M, Loo A, Miller C, deBeaumont R, et al. PTEN-deficient cancers depend on PIK3CB. *Proc Natl Acad Sci.* 2 de septiembre de 2008;105(35):13057-62.
365. Edgar KA, Wallin JJ, Berry M, Lee LB, Prior WW, Sampath D, et al. Isoform-specific phosphoinositide 3-kinase inhibitors exert distinct effects in solid tumors. *Cancer Res.* 1 de febrero de 2010;70(3):1164-72.
366. Campbell PM, Der CJ. Oncogenic Ras and its role in tumor cell invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol.* Abril de 2004;14(2):105-14.
367. Kodaki T, Woscholski R, Hallberg B, Rodriguez-Viciana P, Downward J, Parker PJ. The activation of phosphatidylinositol 3-kinase by Ras. *Curr Biol CB.* 1 de septiembre de 1994;4(9):798-806.
368. Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, et al. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature.* 18 de agosto de 1994;370(6490):527-32.
369. Karnoub AE, Weinberg RA. Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol.* julio de 2008;9(7):517-31.
370. Alarcón B, Martínez-Martín N. RRas2, RhoG and T-cell phagocytosis. *Small GTPases.* abril de 2012;3(2):97-101.
371. Rong R, He Q, Liu Y, Sheikh MS, Huang Y. TC21 mediates transformation and cell survival via activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and NF-kappaB signaling pathway. *Oncogene.* 7 de febrero de 2002;21(7):1062-70.
372. Erdogan M, Pozzi A, Bhowmick N, Moses HL, Zent R. Signaling pathways regulating TC21-induced tumorigenesis. *J Biol Chem.* 21 de septiembre de 2007;282(38):27713-20.
373. Gutierrez-Erlandsson S, Herrero-Vidal P, Fernandez-Alfara M, Hernandez-Garcia S, Gonzalo-Flores S, Mudarra-Rubio A, et al. R-RAS2 overexpression in tumors of the human central nervous system. *Mol Cancer.* 23 de octubre de 2013;12(1):127.
374. Lee JH, Pyon J-K, Lee SH, Lee YJ, Kang SG, Kim CH, et al. Greater expression of TC21/R-ras2 in highly aggressive malignant skin cancer. *Int J Dermatol.* Agosto de 2011;50(8):956-60.
375. Clark GJ, Kinch MS, Gilmer TM, Burridge K, Der CJ. Overexpression of the Ras-related TC21/R-Ras2 protein may contribute to the development of human breast cancers. *Oncogene.* 4 de enero de 1996;12(1):169-76.
376. Sharma R, Sud N, Chattopadhyay TK, Ralhan R. TC21/R-Ras2 upregulation in esophageal tumorigenesis: potential diagnostic implications. *Oncology.* 2005;69(1):10-8.
377. Barker KT, Crompton MR. Ras-related TC21 is activated by mutation in a breast cancer cell line, but infrequently in breast carcinomas in vivo. *Br J Cancer.* Agosto de 1998;78(3):296-300.
378. Graham SM, Oldham SM, Martin CB, Drugan JK, Zohn IE, Campbell S, et al. TC21 and Ras share indistinguishable transforming and differentiating activities. *Oncogene.* Marzo de 1999;18(12):2107-16.
379. Cox AD, Brtva TR, Lowe DG, Der CJ. R-Ras induces malignant, but not morphologic, transformation of NIH3T3 cells. *Oncogene.* Noviembre de 1994;9(11):3281-8.
380. Chan AM, Miki T, Meyers KA, Aaronson SA. A human oncogene of the RAS superfamily unmasked by expression cDNA cloning. *Proc Natl Acad Sci.* 2 de agosto de 1994;91(16):7558-62.



381. Huang Y, Saez R, Chao L, Santos E, Aaronson SA, Chan AM. A novel insertional mutation in the TC21 gene activates its transforming activity in a human leiomyosarcoma cell line. *Oncogene*. 5 de octubre de 1995;11(7):1255-60.
382. Karnoub AE, Weinberg RA. Chemokine networks and breast cancer metastasis. *Breast Dis*. 2007 de 2006;26:75-85.
383. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*. 4 de octubre de 2007;449(7162):557-63.
384. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer*. Julio de 2004;4(7):540-50.
385. Terabe M, Park JM, Berzofsky JA. Role of IL-13 in regulation of anti-tumor immunity and tumor growth. *Cancer Immunol Immunother*. Febrero de 2004;53(2):79-85.
386. Mentink-Kane MM, Wynn TA. Opposing roles for IL-13 and IL-13 receptor alpha 2 in health and disease. *Immunol Rev*. Diciembre de 2004;202:191-202.
387. Donaldson DD, Whitters MJ, Fitz LJ, Neben TY, Finnerty H, Henderson SL, et al. The murine IL-13 receptor alpha 2: molecular cloning, characterization, and comparison with murine IL-13 receptor alpha 1. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 de septiembre de 1998;161(5):2317-24.
388. Suzuki A, Leland P, Joshi BH, Puri RK. Targeting of IL-4 and IL-13 receptors for cancer therapy. *Cytokine*. Septiembre de 2015;75(1):79-88.
389. Papageorgis P, Ozturk S, Lambert AW, Neophytou CM, Tzatsos A, Wong CK, et al. Targeting IL13Ralpha2 activates STAT6-TP63 pathway to suppress breast cancer lung metastasis. *Breast Cancer Res BCR*. 25 de julio de 2015;17:98.
390. Lin C, Liu H, Zhang H, He H, Li H, Shen Z, et al. Interleukin-13 receptor $\alpha 2$ is associated with poor prognosis in patients with gastric cancer after gastrectomy. *Oncotarget* [Internet]. 2 de agosto de 2016 [citado 2 de enero de 2020];7(31). Disponible en: <http://www.oncotarget.com/fulltext/10297>
391. Barderas R, Bartolomé RA, Fernandez-Aceñero MJ, Torres S, Casal JI. High expression of IL-13 receptor $\alpha 2$ in colorectal cancer is associated with invasion, liver metastasis, and poor prognosis. *Cancer Res*. 1 de junio de 2012;72(11):2780-90.
392. Kioi M, Kawakami M, Shimamura T, Husain SR, Puri RK. Interleukin-13 receptor alpha2 chain: a potential biomarker and molecular target for ovarian cancer therapy. *Cancer*. 15 de septiembre de 2006;107(6):1407-18.
393. Basset P, Okada A, Chenard MP, Kannan R, Stoll I, Anglard P, et al. Matrix metalloproteinases as stromal effectors of human carcinoma progression: therapeutic implications. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol*. Marzo de 1997;15(8-9):535-41.
394. Johnsen M, Lund LR, Rømer J, Almholt K, Danø K. Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation. *Curr Opin Cell Biol*. octubre de 1998;10(5):667-71.
395. Ming J, Liu N, Gu Y, Qiu X, Wang E-H. PRL-3 facilitates angiogenesis and metastasis by increasing ERK phosphorylation and up-regulating the levels and activities of RhoA/C in lung cancer. *Pathology (Phila)*. Febrero de 2009;41(2):118-26.
396. Fu H, Hu Z, Wen J, Wang K, Liu Y. TGF-beta promotes invasion and metastasis of gastric cancer cells by increasing fascin1 expression via ERK and JNK signal pathways. *Acta Biochim Biophys Sin*. Agosto de 2009;41(8):648-56.
397. Li L-H, Zheng M-H, Luo Q, Ye Q, Feng B, Lu A-G, et al. P21-activated protein kinase 1 induces colorectal cancer metastasis involving ERK activation and phosphorylation of FAK at Ser-910. *Int J Oncol*. Octubre de 2010;37(4):951-62.
398. Kwon HJ, Choi JE, Bae YK. Interleukin-13 receptor alpha 2 expression in tumor cells is associated with reduced disease-free survival in patients with luminal subtype invasive breast cancer. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. Junio de 2018;40(6):1010428318783657.
399. Kawakami K, Kawakami M, Puri RK. Specifically targeted killing of interleukin-13 (IL-13) receptor-expressing breast cancer by IL-13 fusion cytotoxin in animal model of human disease. *Mol Cancer Ther*. Febrero de 2004;3(2):137-47.
400. Hsi LC, Kundu S, Palomo J, Xu B, Ficco R, Vogelbaum MA, et al. Silencing IL-13R $\alpha 2$ promotes glioblastoma cell death via endogenous signaling. *Mol Cancer Ther*. Julio de 2011;10(7):1149-60.



401. Fujisawa T, Joshi B, Nakajima A, Puri RK. A novel role of interleukin-13 receptor alpha2 in pancreatic cancer invasion and metastasis. *Cancer Res.* 15 de noviembre de 2009;69(22):8678-85.
402. Rosemary Sifakas A, Richardson DR. Growth arrest and DNA damage-45 alpha (GADD45alpha). *Int J Biochem Cell Biol.* Mayo de 2009;41(5):986-9.
403. Harkin DP, Bean JM, Miklos D, Song YH, Truong VB, Englert C, et al. Induction of GADD45 and JNK/SAPK-dependent apoptosis following inducible expression of BRCA1. *Cell.* 28 de mayo de 1999;97(5):575-86.
404. Hollander MC, Sheikh MS, Bulavin DV, Lundgren K, Augeri-Henmueller L, Shehee R, et al. Genomic instability in Gadd45a-deficient mice. *Nat Genet.* Octubre de 1999;23(2):176-84.
405. Wang XW, Zhan Q, Coursen JD, Khan MA, Kontny HU, Yu L, et al. GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci.* 30 de marzo de 1999;96(7):3706-11.
406. Smith ML, Kontny HU, Zhan Q, Sreenath A, O'Connor PM, Fornace AJ. Antisense GADD45 expression results in decreased DNA repair and sensitizes cells to u.v.-irradiation or cisplatin. *Oncogene.* 21 de noviembre de 1996;13(10):2255-63.
407. Takekawa M, Saito H. A family of stress-inducible GADD45-like proteins mediate activation of the stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK. *Cell.* 13 de noviembre de 1998;95(4):521-30.
408. Chen CY, Oliner JD, Zhan Q, Fornace AJ, Vogelstein B, Kastan MB. Interactions between p53 and MDM2 in a mammalian cell cycle checkpoint pathway. *Proc Natl Acad Sci.* 29 de marzo de 1994;91(7):2684-8.
409. Hildesheim J, Belova GI, Tyner SD, Zhou X, Vardanian L, Fornace AJ. Gadd45a regulates matrix metalloproteinases by suppressing DeltaNp63alpha and beta-catenin via p38 MAP kinase and APC complex activation. *Oncogene.* 11 de marzo de 2004;23(10):1829-37.
410. Gao M, Dong W, Hu M, Yu M, Guo L, Qian L, et al. GADD45alpha mediates arsenite-induced cell apoptotic effect in human hepatoma cells via JNKs/AP-1-dependent pathway. *J Cell Biochem.* 15 de abril de 2010;109(6):1264-73.
411. Zerbini LF, Libermann TA. Life and death in cancer. GADD45 alpha and gamma are critical regulators of NF-kappaB mediated escape from programmed cell death. *Cell Cycle Georget Tex.* Enero de 2005;4(1):18-20.
412. Hoffman B, Liebermann DA. Gadd45 in modulation of solid tumors and leukemia. *Adv Exp Med Biol.* 2013;793:21-33.
413. Zhu N, Shao Y, Xu L, Yu L, Sun L. Gadd45-alpha and Gadd45-gamma utilize p38 and JNK signaling pathways to induce cell cycle G2/M arrest in Hep-G2 hepatoma cells. *Mol Biol Rep.* Noviembre de 2009;36(8):2075-85.
414. Yuan C, Liu X, Liu X, Yang N, Liu Z, Yan S, et al. The GADD45A (1506T>C) Polymorphism Is Associated with Ovarian Cancer Susceptibility and Prognosis. *Bau D-T, editor. PLOS ONE.* 30 de septiembre de 2015;10(9):e0138692.
415. Santucci MA, Barbieri E, Frezza G, Perrone A, Iacurti E, Galuppi A, et al. Radiation-induced gadd45 expression correlates with clinical response to radiotherapy of cervical carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 15 de enero de 2000;46(2):411-6.
416. Yamasawa K, Nio Y, Dong M, Yamaguchi K, Itakura M. Clinicopathological Significance of Abnormalities in Gadd45 Expression and Its Relationship to p53 in Human Pancreatic Cancer. :8.
417. Dong M, Dong Q, Zhang H, Zhou J, Tian Y, Dong Y. Expression of Gadd45a and p53 proteins in human pancreatic cancer: potential effects on clinical outcomes. *J Surg Oncol.* 15 de marzo de 2007;95(4):332-6.
418. Schneider G, Weber A, Zechner U, Oswald F, Friess HM, Schmid RM, et al. GADD45alpha is highly expressed in pancreatic ductal adenocarcinoma cells and required for tumor cell viability. *Int J Cancer.* 15 de mayo de 2006;118(10):2405-11.
419. Higashi H, Vallböhmer D, Warnecke-Eberz U, Hokita S, Xi H, Brabender J, et al. Down-regulation of Gadd45 expression is associated with tumor differentiation in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* Junio de 2006;26(3A):2143-7.
420. Reddy SP, Britto R, Vinnakota K, Aparna H, Sreepathi HK, Thota B, et al. Novel glioblastoma markers with diagnostic and prognostic value identified through transcriptome analysis. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 de mayo de 2008;14(10):2978-87.

421. Chen Z, Brand NJ, Chen A, Chen SJ, Tong JH, Wang ZY, et al. Fusion between a novel Krüppel-like zinc finger gene and the retinoic acid receptor-alpha locus due to a variant t(11;17) translocation associated with acute promyelocytic leukaemia. *EMBO J.* Marzo de 1993;12(3):1161-7.
422. David G, Alland L, Hong SH, Wong CW, DePinho RA, Dejean A. Histone deacetylase associated with mSin3A mediates repression by the acute promyelocytic leukemia-associated PLZF protein. *Oncogene.* 14 de mayo de 1998;16(19):2549-56.
423. Labbaye C, Quaranta MT, Pagliuca A, Miliati S, Licht JD, Testa U, et al. PLZF induces megakaryocytic development, activates Tpo receptor expression and interacts with GATA1 protein. *Oncogene.* 26 de septiembre de 2002;21(43):6669-79.
424. Doulatov S, Notta F, Rice KL, Howell L, Zelent A, Licht JD, et al. PLZF is a regulator of homeostatic and cytokine-induced myeloid development. *Genes Dev.* 1 de septiembre de 2009;23(17):2076-87.
425. Kelly KF, Daniel JM. POZ for effect--POZ-ZF transcription factors in cancer and development. *Trends Cell Biol.* Noviembre de 2006;16(11):578-87.
426. Phan RT, Dalla-Favera R. The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature.* 2 de diciembre de 2004;432(7017):635-9.
427. Choi W-I, Jeon B-N, Yun C-O, Kim P-H, Kim S-E, Choi K-Y, et al. Proto-oncogene FBI-1 represses transcription of p21CIP1 by inhibition of transcription activation by p53 and Sp1. *J Biol Chem.* 8 de mayo de 2009;284(19):12633-44.
428. Beaulieu AM, Sant'Angelo DB. The BTB-ZF family of transcription factors: key regulators of lineage commitment and effector function development in the immune system. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 de septiembre de 2011;187(6):2841-7.
429. Williams MA, Bevan MJ. Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:171-92.
430. Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:297-336.
431. Treiner E, Lantz O. CD1d- and MR1-restricted invariant T cells: of mice and men. *Curr Opin Immunol.* Octubre de 2006;18(5):519-26.
432. Zhao J, Weng X, Bagchi S, Wang C-R. Polyclonal type II natural killer T cells require PLZF and SAP for their development and contribute to CpG-mediated antitumor response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 18 de febrero de 2014;111(7):2674-9.
433. Weinreich MA, Odumade OA, Jameson SC, Hogquist KA. T cells expressing the transcription factor PLZF regulate the development of memory-like CD8+ T cells. *Nat Immunol.* Agosto de 2010;11(8):709-16.
434. Alonzo ES, Gottschalk RA, Das J, Egawa T, Hobbs RM, Pandolfi PP, et al. Development of promyelocytic zinc finger and ThPOK-expressing innate gamma delta T cells is controlled by strength of TCR signaling and Id3. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 de febrero de 2010;184(3):1268-79.
435. Savage AK, Constantinides MG, Han J, Picard D, Martin E, Li B, et al. The transcription factor PLZF directs the effector program of the NKT cell lineage. *Immunity.* 19 de septiembre de 2008;29(3):391-403.
436. Kovalovsky D, Uche OU, Eladad S, Hobbs RM, Yi W, Alonzo E, et al. The BTB-zinc finger transcriptional regulator PLZF controls the development of invariant natural killer T cell effector functions. *Nat Immunol.* Septiembre de 2008;9(9):1055-64.
437. Zhang S, Laouar A, Denzin LK, Sant'Angelo DB. Zbtb16 (PLZF) is stably suppressed and not inducible in non-innate T cells via T cell receptor-mediated signaling. *Sci Rep.* 16 de julio de 2015;5:12113.
438. Kreslavsky T, Savage AK, Hobbs R, Gounari F, Bronson R, Pereira P, et al. TCR-inducible PLZF transcription factor required for innate phenotype of a subset of gammadelta T cells with restricted TCR diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 28 de julio de 2009;106(30):12453-8.
439. Seiler MP, Mathew R, Liszewski MK, Spooner CJ, Spooner C, Barr K, et al. Elevated and sustained expression of the transcription factors Egr1 and Egr2 controls NKT lineage differentiation in response to TCR signaling. *Nat Immunol.* 5 de febrero de 2012;13(3):264-71.
440. Matsuda JL, Mallewaey T, Scott-Browne J, Gapin L. CD1d-restricted iNKT cells, the «Swiss-Army knife» of the immune system. *Curr Opin Immunol.* Junio de 2008;20(3):358-68.



- 441.Reid A, Gould A, Brand N, Cook M, Strutt P, Li J, et al. Leukemia translocation gene, PLZF, is expressed with a speckled nuclear pattern in early hematopoietic progenitors. *Blood*. 15 de diciembre de 1995;86(12):4544-52.
- 442.Spinello I, Quaranta MT, Pasquini L, Pelosi E, Petrucci E, Pagliuca A, et al. PLZF-mediated control on c-kit expression in CD34+ cells and early erythropoiesis. *Oncogene*. Junio de 2009;28(23):2276-88.
- 443.Tsuzuki S, Enver T. Interactions of GATA-2 with the promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) protein, its homologue FAZF, and the t(11;17)-generated PLZF-retinoic acid receptor alpha oncoprotein. *Blood*. 1 de mayo de 2002;99(9):3404-10.
- 444.Rossi DJ, Jamieson CHM, Weissman IL. Stems cells and the pathways to aging and cancer. *Cell*. 22 de febrero de 2008;132(4):681-96.
- 445.Ito K, Bernardi R, Pandolfi PP. A novel signaling network as a critical rheostat for the biology and maintenance of the normal stem cell and the cancer-initiating cell. *Curr Opin Genet Dev*. Febrero de 2009;19(1):51-9.
- 446.Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Mayo de 2009;10(5):307-18.
- 447.Castilho RM, Squarize CH, Chodosh LA, Williams BO, Gutkind JS. mTOR mediates Wnt-induced epidermal stem cell exhaustion and aging. *Cell Stem Cell*. 4 de septiembre de 2009;5(3):279-89.
- 448.Gan B, DePinho RA. mTORC1 signaling governs hematopoietic stem cell quiescence. *Cell Cycle Georget Tex*. 1 de abril de 2009;8(7):1003-6.
- 449.Yilmaz OH, Valdez R, Theisen BK, Guo W, Ferguson DO, Wu H, et al. Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. *Nature*. 25 de mayo de 2006;441(7092):475-82.
- 450.Kolesnichenko M, Vogt PK. Understanding PLZF: two transcriptional targets, REDD1 and smooth muscle α -actin, define new questions in growth control, senescence, self-renewal and tumor suppression. *Cell Cycle Georget Tex*. 1 de marzo de 2011;10(5):771-5.
- 451.Brunner G, Reitz M, Schwipper V, Tilkorn H, Lippold A, Biess B, et al. Increased expression of the tumor suppressor PLZF is a continuous predictor of long-term survival in malignant melanoma patients. *Cancer Biother Radiopharm*. Agosto de 2008;23(4):451-9.
- 452.Cheung M, Pei J, Pei Y, Jhanwar SC, Pass HI, Testa JR. The promyelocytic leukemia zinc-finger gene, PLZF, is frequently downregulated in malignant mesothelioma cells and contributes to cell survival. *Oncogene*. 18 de marzo de 2010;29(11):1633-40.
- 453.Xiao G-Q, Unger P, Yang Q, Kinoshita Y, Singh K, McMahon L, et al. Loss of PLZF Expression in Prostate Cancer by Immunohistochemistry Correlates with Tumor Aggressiveness and Metastasis. Kyprianou N, editor. *PLOS ONE*. 25 de marzo de 2015;10(3):e0121318.
- 454.Wang X, Wang L, Guo S, Bao Y, Ma Y, Yan F, et al. Hypermethylation reduces expression of tumor-suppressor PLZF and regulates proliferation and apoptosis in non-small-cell lung cancers. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. Octubre de 2013;27(10):4194-203.
- 455.Costoya JA, Hobbs RM, Barna M, Cattoretti G, Manova K, Sukhwani M, et al. Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat Genet*. Junio de 2004;36(6):653-9.
- 456.Hargreaves DC, Horng T, Medzhitov R. Control of inducible gene expression by signal-dependent transcriptional elongation. *Cell*. 10 de julio de 2009;138(1):129-45.
- 457.Oatley JM, Brinster RL. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2008;24:263-86.
- 458.Brinster RL. Male germline stem cells: from mice to men. *Science*. 20 de abril de 2007;316(5823):404-5.
- 459.Saez JM. Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation. *Endocr Rev*. Octubre de 1994;15(5):574-626.
- 460.Kissel H, Timokhina I, Hardy MP, Rothschild G, Tajima Y, Soares V, et al. Point mutation in kit receptor tyrosine kinase reveals essential roles for kit signaling in spermatogenesis and oogenesis without affecting other kit responses. *EMBO J*. 15 de marzo de 2000;19(6):1312-26.



461. Blume-Jensen P, Jiang G, Hyman R, Lee KF, O’Gorman S, Hunter T. Kit/stem cell factor receptor-induced activation of phosphatidylinositol 3'-kinase is essential for male fertility. *Nat Genet.* Febrero de 2000;24(2):157-62.
462. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet.* Abril de 2000;24(4):372-6.
463. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell.* 30 de octubre de 1998;95(3):379-91.
464. Pesce M, Gross MK, Schöler HR. In line with our ancestors: Oct-4 and the mammalian germ. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol.* Septiembre de 1998;20(9):722-32.
465. Barna M, Hawe N, Niswander L, Pandolfi PP. Plzf regulates limb and axial skeletal patterning. *Nat Genet.* Junio de 2000;25(2):166-72.
466. Buaas FW, Kirsh AL, Sharma M, McLean DJ, Morris JL, Griswold MD, et al. Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat Genet.* Junio de 2004;36(6):647-52.
467. Green MC. LUXOID—A NEW HEREDITARY LEG AND FOOT ABNORMALITY. *J Hered.* Mayo de 1955;46(3):91-9.
468. Paul C, Robaire B. Ageing of the male germ line. *Nat Rev Urol.* Abril de 2013;10(4):227-34.
469. Paul C, Nagano M, Robaire B. Aging results in molecular changes in an enriched population of undifferentiated rat spermatogonia. *Biol Reprod.* Diciembre de 2013;89(6):147.
470. Ferder IC, Wang N. Hypermaintenance and hypofunction of aged spermatogonia: insight from age-related increase of Plzf expression. *Oncotarget.* 30 de junio de 2015;6(18):15891-901.
471. Filipponi D, Hobbs RM, Ottolenghi S, Rossi P, Jannini EA, Pandolfi PP, et al. Repression of kit expression by Plzf in germ cells. *Mol Cell Biol.* Octubre de 2007;27(19):6770-81.
472. Quaranta MT, Spinello I, Testa U, Mariani G, Diverio D, Foà R, et al. PLZF-mediated control on VLA-4 expression in normal and leukemic myeloid cells. *Oncogene.* 19 de enero de 2006;25(3):399-408.
473. Shiraishi K, Yamasaki K, Nanba D, Inoue H, Hanakawa Y, Shirakata Y, et al. Pre-B-cell leukemia transcription factor 1 is a major target of promyelocytic leukemia zinc-finger-mediated melanoma cell growth suppression. *Oncogene.* 18 de enero de 2007;26(3):339-48.
474. Yeyati PL, Shaknovich R, Boterashvili S, Li J, Ball HJ, Waxman S, et al. Leukemia translocation protein PLZF inhibits cell growth and expression of cyclin A. *Oncogene.* 28 de enero de 1999;18(4):925-34.
475. McConnell MJ, Chevallier N, Berkofsky-Fessler W, Giltane JM, Malani RB, Staudt LM, et al. Growth suppression by acute promyelocytic leukemia-associated protein PLZF is mediated by repression of c-myc expression. *Mol Cell Biol.* Diciembre de 2003;23(24):9375-88.
476. Barna M, Merghoub T, Costoya JA, Ruggero D, Branford M, Bergia A, et al. Plzf mediates transcriptional repression of HoxD gene expression through chromatin remodeling. *Dev Cell.* Octubre de 2002;3(4):499-510.
477. Bahrami A, Ro JY, Ayala AG. An overview of testicular germ cell tumors. *Arch Pathol Lab Med.* Agosto de 2007;131(8):1267-80.
478. Hart AH, Hartley L, Parker K, Ibrahim M, Looijenga LHJ, Pauchnik M, et al. The pluripotency homeobox gene NANOG is expressed in human germ cell tumors. *Cancer.* 15 de noviembre de 2005;104(10):2092-8.
479. De Jong J, Stoop H, Gillis AJM, van Gorp RJHLM, van de Geijn G-JM, Boer M de, et al. Differential expression of SOX17 and SOX2 in germ cells and stem cells has biological and clinical implications. *J Pathol.* Mayo de 2008;215(1):21-30.
480. Cao D, Li J, Guo CC, Allan RW, Humphrey PA. SALL4 is a novel diagnostic marker for testicular germ cell tumors. *Am J Surg Pathol.* Julio de 2009;33(7):1065-77.
481. Mostofi FK. Histological change ostensibly induced by therapy in the metastasis of germ cell tumors of testis. *Prog Clin Biol Res.* 1985;203:47-60.
482. Zynger DL, McCallum JC, Luan C, Chou PM, Yang XJ. Glypican 3 has a higher sensitivity than alpha-fetoprotein for testicular and ovarian yolk sac tumour:



- immunohistochemical investigation with analysis of histological growth patterns. *Histopathology*. Mayo de 2010;56(6):750-7.
483. Preda O, Nicolae A, Aneiros-Fernández J, Borda A, Nogales FF. Glypican 3 is a sensitive, but not a specific, marker for the diagnosis of yolk sac tumours. *Histopathology*. Enero de 2011;58(2):312-4; author reply 314-315.
484. Zynger DL, Dimov ND, Luan C, Teh BT, Yang XJ. Glypican 3: a novel marker in testicular germ cell tumors. *Am J Surg Pathol*. Diciembre de 2006;30(12):1570-5.
485. Saikali Z, Sinnott D. Expression of glypican 3 (GPC3) in embryonal tumors. *Int J Cancer*. 20 de septiembre de 2000;89(5):418-22.
486. Ye H, Ulbright TM. Difficult differential diagnoses in testicular pathology. *Arch Pathol Lab Med*. Abril de 2012;136(4):435-46.
487. Ulbright TM. The Most Common, Clinically Significant Misdiagnoses in Testicular Tumor Pathology, and How to Avoid Them: *Adv Anat Pathol*. Enero de 2008;15(1):18-27.
488. Kao C-S, Idrees MT, Young RH, Ulbright TM. Solid pattern yolk sac tumor: a morphologic and immunohistochemical study of 52 cases. *Am J Surg Pathol*. Marzo de 2012;36(3):360-7.
489. Xiao G-Q, Li F, Unger PD, Katerji H, Yang Q, McMahon L, et al. ZBTB16: a novel sensitive and specific biomarker for yolk sac tumor. *Mod Pathol*. Junio de 2016;29(6):591-8.
490. Pesche S, Latil A, Muzeau F, Cussenot O, Fournier G, Longy M, et al. PTEN/MMAC1/TEP1 involvement in primary prostate cancers. *Oncogene*. 4 de junio de 1998;16(22):2879-83.
491. Felicetti F, Bottero L, Felli N, Mattia G, Labbaye C, Alvino E, et al. Role of PLZF in melanoma progression. *Oncogene*. 3 de junio de 2004;23(26):4567-76.
492. Jiang F, Wang Z. Identification and characterization of PLZF as a prostatic androgen-responsive gene. *The Prostate*. 1 de junio de 2004;59(4):426-35.
493. Choi W-I, Kim M-Y, Jeon B-N, Koh D-I, Yun C-O, Li Y, et al. Role of Promyelocytic Leukemia Zinc Finger (PLZF) in Cell Proliferation and Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1A (*p21WAF/CDKN1A*) Gene Repression. *J Biol Chem*. 4 de julio de 2014;289(27):18625-40.
494. Kaban K, Kantarjian H, Talpaz M, O'Brien S, Cortes J, Giles FJ, et al. Expression of thrombopoietin and its receptor (c-mpl) in chronic myelogenous leukemia: correlation with disease progression and response to therapy. *Cancer*. 1 de febrero de 2000;88(3):570-6.
495. Haider M, Elala YC, Gangat N, Hanson CA, Tefferi A. MPL mutations and palpable splenomegaly are independent risk factors for fibrotic progression in essential thrombocythemia. *Blood Cancer J*. Octubre de 2016;6(10):e487-e487.
496. Matsuo N, Tanaka S, Gordon MK, Koch M, Yoshioka H, Ramirez F. CREB-AP1 protein complexes regulate transcription of the collagen XXIV gene (*Col24a1*) in osteoblasts. *J Biol Chem*. 3 de marzo de 2006;281(9):5445-52.
497. Safe S, Jin U-H, Morpurgo B, Abudayyeh A, Singh M, Tjalkens RB. Nuclear receptor 4A (NR4A) family - orphans no more. *J Steroid Biochem Mol Biol*. Marzo de 2016;157:48-60.
498. Pearen MA, Muscat GEO. Minireview: Nuclear Hormone Receptor 4A Signaling: Implications for Metabolic Disease. *Mol Endocrinol*. Octubre de 2010;24(10):1891-903.
499. Choi J-W, Park SC, Kang GH, Liu JO, Youn H-D. Nur77 activated by hypoxia-inducible factor-1alpha overproduces proopiomelanocortin in von Hippel-Lindau-mutated renal cell carcinoma. *Cancer Res*. 1 de enero de 2004;64(1):35-9.
500. Wang J-R, Gan W-J, Li X-M, Zhao Y-Y, Li Y, Lu X-X, et al. Orphan nuclear receptor Nur77 promotes colorectal cancer invasion and metastasis by regulating MMP-9 and E-cadherin. *Carcinogenesis*. Noviembre de 2014;35(11):2474-84.
501. Zhou F, Drabsch Y, Dekker TJA, de Vinuesa AG, Li Y, Hawinkels LJAC, et al. Nuclear receptor NR4A1 promotes breast cancer invasion and metastasis by activating TGF-β signalling. *Nat Commun*. 3 de marzo de 2014;5:3388.
502. Lee S-O, Jin U-H, Kang JH, Kim SB, Guthrie AS, Sreevalsan S, et al. The orphan nuclear receptor NR4A1 (Nur77) regulates oxidative and endoplasmic reticulum stress in pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Res MCR*. Abril de 2014;12(4):527-38.
503. Smith AG, Lim W, Pearen M, Muscat GEO, Sturm RA. Regulation of NR4A nuclear receptor expression by oncogenic BRAF in melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res*. Junio de 2011;24(3):551-63.



- 504.Zhan Y, He J, Chen H, Wang W, Cai J. Orphan receptor TR3 is essential for the maintenance of stem-like properties in gastric cancer cells. *Cancer Lett.* 1 de febrero de 2013;329(1):37-44.
- 505.Kolluri SK, Bruey-Sedano N, Cao X, Lin B, Lin F, Han Y-H, et al. Mitogenic effect of orphan receptor TR3 and its regulation by MEKK1 in lung cancer cells. *Mol Cell Biol.* Diciembre de 2003;23(23):8651-67.
- 506.Hedrick E, Lee S-O, Kim G, Abdelrahim M, Jin U-H, Safe S, et al. Nuclear Receptor 4A1 (NR4A1) as a Drug Target for Renal Cell Adenocarcinoma. *PloS One.* 2015;10(6):e0128308.
- 507.Liu J, Zeng H, Zhang L, Zhan Y, Chen Y, Wang Y, et al. A unique pharmacophore for activation of the nuclear orphan receptor Nur77 in vivo and in vitro. *Cancer Res.* 1 de mayo de 2010;70(9):3628-37.
- 508.Hedrick E, Lee S-O, Doddapaneni R, Singh M, Safe S. Nuclear receptor 4A1 as a drug target for breast cancer chemotherapy. *Endocr Relat Cancer.* Octubre de 2015;22(5):831-40.
- 509.Zhou F, Drabsch Y, Dekker TJA, de Vinuesa AG, Li Y, Hawinkels LJAC, et al. Nuclear receptor NR4A1 promotes breast cancer invasion and metastasis by activating TGF- β signalling. *Nat Commun.* 3 de marzo de 2014;5:3388.
- 510.Massagué J. TGFbeta in Cancer. *Cell.* 25 de julio de 2008;134(2):215-30.
- 511.Ikushima H, Miyazono K. TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* Junio de 2010;10(6):415-24.
- 512.DeGregori J, Leone G, Miron A, Jakoi L, Nevins JR. Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci.* 8 de julio de 1997;94(14):7245-50.
- 513.Woronicz JD, Calnan B, Ngo V, Winoto A. Requirement for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis of T-cell hybridomas. *Nature.* 20 de enero de 1994;367(6460):277-81.
- 514.Brakebusch C, Fässler R. beta 1 integrin function in vivo: adhesion, migration and more. *Cancer Metastasis Rev.* Septiembre de 2005;24(3):403-11.
- 515.Desgrosellier JS, Cheresh DA. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer.* Enero de 2010;10(1):9-22.
- 516.Grzesiak JJ, Cao HST, Burton DW, Kaushal S, Vargas F, Clopton P, et al. Knockdown of the β 1 integrin subunit reduces primary tumor growth and inhibits pancreatic cancer metastasis. *Int J Cancer.* 15 de diciembre de 2011;129(12):2905-15.
- 517.Bartolomé RA, Barderas R, Torres S, Fernandez-Aceñero MJ, Mendes M, García-Foncillas J, et al. Cadherin-17 interacts with α 2 β 1 integrin to regulate cell proliferation and adhesion in colorectal cancer cells causing liver metastasis. *Oncogene.* 27 de marzo de 2014;33(13):1658-69.
- 518.Li Y, Wang F, Lu L, Zhu F, Huang S, Nomie K, et al. NR4A1 inhibition synergizes with ibrutinib in killing mantle cell lymphoma cells. *Blood Cancer J.* 23 de 2017;7(12):632.
- 519.Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet.* Enero de 2003;33(1):49-54.
- 520.Alexopoulou AN, Leao M, Caballero OL, Da Silva L, Reid L, Lakhani SR, et al. Dissecting the transcriptional networks underlying breast cancer: NR4A1 reduces the migration of normal and breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res BCR.* 2010;12(4):R51.
- 521.Li H, Kolluri SK, Gu J, Dawson MI, Cao X, Hobbs PD, et al. Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3. *Science.* 18 de agosto de 2000;289(5482):1159-64.
- 522.Wilson AJ, Liu AY, Roland J, Adebayo OB, Fletcher SA, Slaughter JC, et al. TR3 modulates platinum resistance in ovarian cancer. *Cancer Res.* 1 de agosto de 2013;73(15):4758-69.
- 523.Deutsch AJA, Rinner B, Wenzl K, Pichler M, Troppan K, Steinbauer E, et al. NR4A1-mediated apoptosis suppresses lymphomagenesis and is associated with a favorable cancer-specific survival in patients with aggressive B-cell lymphomas. *Blood.* 10 de abril de 2014;123(15):2367-77.
- 524.Wu Q, Liu S, Ye X, Huang Z, Su W. Dual roles of Nur77 in selective regulation of apoptosis and cell cycle by TPA and ATRA in gastric cancer cells. *Carcinogenesis.* octubre de 2002;23(10):1583-92.



525. Nevalainen T, Kananen L, Marttila S, Jylhä M, Hervonen A, Hurme M, et al. Transcriptomic and epigenetic analyses reveal a gender difference in aging-associated inflammation: the Vitality 90+ study. *Age Dordr Neth*. Agosto de 2015;37(4):9814.
526. Harris TB, Ferrucci L, Tracy RP, Corti MC, Wacholder S, Ettinger WH, et al. Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. *Am J Med*. Mayo de 1999;106(5):506-12.
527. Schnabel RB, Yin X, Larson MG, Yamamoto JF, Fontes JD, Kathiresan S, et al. Multiple inflammatory biomarkers in relation to cardiovascular events and mortality in the community. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Julio de 2013;33(7):1728-33.
528. Long X, Li Y, Qiu S, Liu J, He L, Peng Y. MiR-582-5p/miR-590-5p targeted CREB1/CREB5-NF- κ B signaling and caused opioid-induced immunosuppression in human monocytes. *Transl Psychiatry*. 15 de marzo de 2016;6:e757.
529. He S, Deng Y, Liao Y, Li X, Liu J, Yao S. CREB5 promotes tumor cell invasion and correlates with poor prognosis in epithelial ovarian cancer. *Oncol Lett [Internet]*. 20 de octubre de 2017 [citado 22 de septiembre de 2019]; Disponible en: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2017.7234>
530. Qi L, Ding Y. Involvement of the CREB5 regulatory network in colorectal cancer metastasis. *Yi Chuan Hered*. Julio de 2014;36(7):679-84.
531. Seo H-S, Liu DD, Bekele BN, Kim M-K, Pisters K, Lippman SM, et al. Cyclic AMP response element-binding protein overexpression: a feature associated with negative prognosis in never smokers with non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 1 de agosto de 2008;68(15):6065-73.
532. Meetei AR, de Winter JP, Medhurst AL, Wallisch M, Waisfisz Q, van de Vrugt HJ, et al. A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nat Genet*. Octubre de 2003;35(2):165-70.
533. Nalepa G, Enzor R, Sun Z, Marchal C, Park S-J, Yang Y, et al. Fanconi anemia signaling network regulates the spindle assembly checkpoint. *J Clin Invest*. Septiembre de 2013;123(9):3839-47.
534. Barthelemy J, Hanenberg H, Leffak M. FANCI is essential to maintain microsatellite structure genome-wide during replication stress. *Nucleic Acids Res*. 19 de 2016;44(14):6803-16.
535. Michl J, Zimmer J, Tarsounas M. Interplay between Fanconi anemia and homologous recombination pathways in genome integrity. *EMBO J*. 02 de 2016;35(9):909-23.
536. Tischkowitz MD, Hodgson SV. Fanconi anaemia. *J Med Genet*. Enero de 2003;40(1):1-10.
537. Joenje H, Patel KJ. The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia. *Nat Rev Genet*. Junio de 2001;2(6):446-57.
538. Meetei AR, Levitus M, Xue Y, Medhurst AL, Zwaan M, Ling C, et al. X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. *Nat Genet*. Noviembre de 2004;36(11):1219-24.
539. D'Andrea AD. Susceptibility pathways in Fanconi's anemia and breast cancer. *N Engl J Med*. 20 de mayo de 2010;362(20):1909-19.
540. Yang S-Y, Hsiung C-N, Li Y-J, Chang G-C, Tsai Y-H, Chen K-Y, et al. Fanconi anemia genes in lung adenocarcinoma- a pathway-wide study on cancer susceptibility. *J Biomed Sci*. Diciembre de 2016;23(1):23.
541. Barroso E, Pita G, Arias JI, Menendez P, Zamora P, Blanco M, et al. The Fanconi anemia family of genes and its correlation with breast cancer susceptibility and breast cancer features. *Breast Cancer Res Treat*. Diciembre de 2009;118(3):655-60.
542. Kutler DI, Singh B, Satagopan J, Batish SD, Berwick M, Giampietro PF, et al. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood*. 15 de febrero de 2003;101(4):1249-56.
543. Schwartz AG, Prysak GM, Bock CH, Cote ML. The molecular epidemiology of lung cancer. *Carcinogenesis*. Marzo de 2007;28(3):507-18.
544. Wu X, Zhao H, Suk R, Christiani DC. Genetic susceptibility to tobacco-related cancer. *Oncogene*. 23 de agosto de 2004;23(38):6500-23.
545. Domogatskaya A, Rodin S, Tryggvason K. Functional Diversity of Laminins. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 10 de noviembre de 2012;28(1):523-53.
546. Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Diciembre de 2014;15(12):786-801.



547. Rozario T, DeSimone DW. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev Biol.* 1 de mayo de 2010;341(1):126-40.
548. Rauch U, Schäfer K-H. The extracellular matrix and its role in cell migration and development of the enteric nervous system. *Eur J Pediatr Surg Off J Austrian Assoc Pediatr Surg Al Z Kinderchir.* Junio de 2003;13(3):158-62.
549. Endo Y, Ishiwata-Endo H, Yamada KM. Extracellular matrix protein anosmin promotes neural crest formation and regulates FGF, BMP, and WNT activities. *Dev Cell.* 14 de agosto de 2012;23(2):305-16.
550. Perris R, Perissinotto D. Role of the extracellular matrix during neural crest cell migration. *Mech Dev.* Julio de 2000;95(1-2):3-21.
551. Gershon MD, Chalazonitis A, Rothman TP. From neural crest to bowel: development of the enteric nervous system. *J Neurobiol.* Febrero de 1993;24(2):199-214.
552. Theveneau E, Mayor R. Neural crest delamination and migration: from epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration. *Dev Biol.* 1 de junio de 2012;366(1):34-54.
553. Choi MR, An CH, Yoo NJ, Lee SH. Laminin gene *LAMB4* is somatically mutated and expressionally altered in gastric and colorectal cancers. *APMIS.* Enero de 2015;123(1):65-71.
554. Everhart JE, Ruhl CE. Burden of digestive diseases in the United States part II: lower gastrointestinal diseases. *Gastroenterology.* Marzo de 2009;136(3):741-54.
555. Coble JL, Sheldon KE, Yue F, Salameh TJ, Harris, III LR, Deiling S, et al. Identification of a rare *LAMB4* variant associated with familial diverticulitis through exome sequencing. *Hum Mol Genet [Internet].* 8 de junio de 2017 [citado 19 de agosto de 2019]; Disponible en: <https://academic.oup.com/hmg/article-lookup/doi/10.1093/hmg/ddx204>
556. Commane DM, Arasaradnam RP, Mills S, Mathers JC, Bradburn M. Diet, ageing and genetic factors in the pathogenesis of diverticular disease. *World J Gastroenterol.* 2009;15(20):2479.
557. Chin D, Means AR. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol.* Agosto de 2000;10(8):322-8.
558. Rogers MS, Kobayashi T, Pittelkow MR, Strehler EE. Human calmodulin-like protein is an epithelial-specific protein regulated during keratinocyte differentiation. *Exp Cell Res.* 15 de julio de 2001;267(2):216-24.
559. Edman CF, George SE, Means AR, Schulman H, Yaswen P. Selective activation and inhibition of calmodulin-dependent enzymes by a calmodulin-like protein found in human epithelial cells. *Eur J Biochem.* 1 de diciembre de 1994;226(2):725-30.
560. Bennett RD, Mauer AS, Strehler EE. Calmodulin-like protein increases filopodia-dependent cell motility via up-regulation of myosin-10. *J Biol Chem.* 2 de febrero de 2007;282(5):3205-12.
561. Takemoto D, Jilka C. Increased content of calmodulin in human leukemia cells. *Leuk Res.* 1983;7(1):97-100.
562. Takuwa N, Zhou W, Takuwa Y. Calcium, calmodulin and cell cycle progression. *Cell Signal.* Febrero de 1995;7(2):93-104.
563. Rogers MS, Foley MA, Crotty TB, Hartmann LC, Ingle JN, Roche PC, et al. Loss of immunoreactivity for human calmodulin-like protein is an early event in breast cancer development. *Neoplasia N Y N.* Agosto de 1999;1(3):220-5.
564. Brooks MD, Bennett RD, Strehler EE, Sebo TJ, Eckert SE, Carr AB. Human calmodulin-like protein (CLP) expression in oral squamous mucosa and in malignant transformation. *J Prosthodont Off J Am Coll Prosthodont.* Enero de 2009;18(1):11-6.
565. Bennett RD, Pittelkow MR, Strehler EE. Immunolocalization of the tumor-sensitive calmodulin-like protein CALML3 in normal human skin and hyperproliferative skin disorders. *PLoS One.* 2013;8(4):e62347.
566. Hays AP, Naini A, He CZ, Mitsumoto H, Rowland LP. Sporadic amyotrophic lateral sclerosis and breast cancer: Hyaline conglomerate inclusions lead to identification of SOD1 mutation. *J Neurol Sci.* 15 de marzo de 2006;242(1-2):67-9.
567. Gordon PH, Rowland LP, Younger DS, Sherman WH, Hays AP, Louis ED, et al. Lymphoproliferative disorders and motor neuron disease: an update. *Neurology.* Junio de 1997;48(6):1671-8.
568. Forsyth PA, Dalmau J, Graus F, Cwik V, Rosenblum MK, Posner JB. Motor neuron syndromes in cancer patients. *Ann Neurol.* Junio de 1997;41(6):722-30.

569. Evans BK, Fagan C, Arnold T, Dropcho EJ, Oh SJ. Paraneoplastic motor neuron disease and renal cell carcinoma: improvement after nephrectomy. *Neurology*. Junio de 1990;40(6):960-2.
570. Turk HM, Ozet A, Kuzhan O, Komurcu F, Arpacı F, Ozturk B, et al. Paraneoplastic motor neuron disease resembling amyotrophic lateral sclerosis in a patient with renal cell carcinoma. *Med Princ Pract Int J Kuwait Univ Health Sci Cent*. 2009;18(1):73-5.
571. Corcia P, Gordon PH, Camdessanche J-P. Is there a paraneoplastic ALS? *Amyotroph Lateral Scler Front Degener*. Junio de 2015;16(3-4):252-7.
572. Mehrpour M, Mohebi N, Motamed MR, Zamani F. Amyotrophic lateral sclerosis as a paraneoplastic manifestation in the neuroendocrine tumor of stomach: a case report. *Acta Med Iran*. 2013;51(10):724-6.
573. García Martín G, Perez Errazquin F, Chamorro Muñoz M, Romero Acebal M. [Amyotrophic lateral sclerosis and anti-CV2 antibodies. Paraneoplastic association?]. *Neurol Barc Spain*. Agosto de 2007;22(6):406-9.

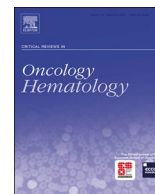
ANEXOS





Anexo 1

Principales vías y dianas en los pacientes con
TCGT sobre las que se han desarrollado
fármacos diana



Targeted treatment approaches in refractory germ cell tumors

Laura Galvez-Carvajal¹, Alfonso Sanchez-Muñoz¹, Nuria Ribelles, Maribel Saez, Javier Baena, Sofia Ruiz, Catherine Ithurbisquy, Emilio Alba*

UGCI of Medical Oncology. Hospitales Regional and Universitario Virgen de la Victoria, IBIMA, UMA. Malaga, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Germ cell tumors
Targeted therapy
Testicular tumors

ABSTRACT

Germ cell tumors (GCTs) are the most common type of solid tumor amongst patients between 15 and 35 years of age. They are also one of the types of tumor with the highest cure rate, due to their high sensitivity to cisplatin based chemotherapy. Nonetheless, around 15–20% of metastatic patients will not have curative options after a relapse on the first and second line. This proves that new therapeutic options for these refractory GCTs patients need to be developed. This article offers a bibliographic review of all studies using targeted treatment or immunotherapy for refractory GCTs patients.

1. Introduction

Germ cell tumors (GCTs) are the most common type of solid tumor amongst adolescents and young adults (15–35 y.o.). They are also one of the malignant tumor types with the highest cure rate, as only 3–5% of patients die due to the tumor (Sturgeon et al., 2011; Tandstad et al., 2009; Gandaglia et al., 2014). The cure rate of disseminated testicular carcinoma after a cisplatin based first line treatment is 70–75%, while, after a relapse, the second line (first salvage treatment) of conventional-dose chemotherapy (CDQT) may achieve a complete remission on 40–50% of patients (Einhorn, 1997; Loehrer et al., 1998; Motzer et al., 1992). With high-dose chemotherapy combined with a stem cell transplant (HDCT-ASCT) the cure rate may reach 60% (Einhorn et al., 2007; Feldman et al., 2010a). A randomized clinical trial is currently taking place in order to establish the best out of these two salvage therapies (Standard-Dose Combination Chemotherapy or High-Dose Combination Chemotherapy and Stem Cell Transplant in Treating Patients with Relapsed or Refractory Germ Cell Tumors, 2019).

Patients who relapse after the second line treatment show very poor results, without a curative option when surgical resection is not possible (Murphy et al., 1993). Despite the high response rate to first and second line treatment, 15–20% of all metastatic patients do not receive therapeutic curative options. Hence the importance of the development of targeted treatments for this group of patients. So far, the best therapeutic option is the combination of gemcitabine, oxaliplatin and paclitaxel (GOP), which achieves an objective response rate of 51% and combined with the resection of residual mass may achieve around 11% of progression free survival (PFS) for two years (Bokemeyer et al.,

2007). The response rate to other lines of treatment ranges between 20 and 40%, with an overall median survival rate (OS) of 6–8 months.

Targeted treatment therapies mean a paradigm shift for the treatment of multiple solid tumors, allowing for the selection of the population who may benefit from these agents. For GCTs, this aim is harder to achieve, due to the low number of patients who relapse and the diversity of the population, including several histological subtypes; therefore the cooperation between multiple healthcare centers is essential. So far, the available data reveal the possible results of some targeted treatments in highly selected refractory GCT patients (Sánchez-Muñoz et al., 2012). Here is an updated review containing all targeted treatments/immunotherapy.

2. EGFR family

The epidermal growth factor receptor family (EGFR) consists of four members: HER1 or EGFR, HER2, HER3 and HER4. The EGFR family proteins consist of three domains: a tyrosine kinase intracellular domain, a transmembrane domain and an extracellular domain where the ligand binds to become active (with the exception of HER2, which has no known ligand and becomes active when it forms a heterodimer with other EGFR family members). The activation of these receptors eventually leads to the activation of a cascade of intracellular pathways with genes involved in cell proliferation, differentiation, angiogenesis, migration and survival. The immunohistochemical (IHC) expression varies between 28 and 65% in GCTs, whereas the gene amplification is around 5% (Wang et al., 2009; Durán et al., 2010; Madani et al., 2003; Moroni et al., 2001).

* Corresponding author at: Department of Medical Oncology, Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Campus Teatinos s/n, 29010, Malaga, Spain.
E-mail address: eaibac@uma.es (E. Alba).

¹ These authors have contributed equally to this work.



Anexo 2

Genes analizados con el modelo PanCancer



Genes housekeeping (n = 40)



PANEL DE GENES DE LA VÍA PANCANCER

Gen	Notch	Wnt	HedgeHog	Modificación cromatina	Regulación transcripcional	Reparación daño ADN	TGF-B	MAPK	JAK-STAT	PI3K	RAS	Ciclo celular, apoptosis
ABL1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
ACAD9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ACVR1B	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
ACVR1C	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
ACVR2A	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
AGK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AKT1	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
AKT2	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
AKT3	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
ALK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ALKBH2	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
ALKBH3	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
AMER1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AMH	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
AMMECR1L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ANGPT1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
APC	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
APH1B	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Gen	Notch	Wnt	HedgeHog	Modificación cromatina	Regulación transcripcional	Reparación daño ADN	TGF-B	MAPK	JAK-STAT	PI3K	RAS	Ciclo celular, apoptosis
AR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ARID1A	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
ARID1B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ARID2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ARNT2	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
ASXL1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ATM	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
ATR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ATRX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AXIN1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AXIN2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B2M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
BAIAP3	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
BAMBI	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
BAP1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BAX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
BCL2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
BCL2A1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
BCL2L1	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
BCOR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BDNF	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
BID	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
BIRC3	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
BIRC7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Gen	Notch	Wnt	HedgeHog	Modificación cromatina	Regulación transcripcional	Reparación daño ADN	TGF-B	MAPK	JAK-STAT	PI3K	RAS	Ciclo celular, apoptosis
BMP2	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
BMP4	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
BMP5	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
BMP6	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
BMP7	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
BMP8A	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
BMPR1B	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
BNIP3	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
BRAF	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
BRCA1	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
BRCA2	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
BRIP1	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
C10orf76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C19orf40	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
CACNA1C	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
CACNA1D	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
CACNA1E	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
CACNA1G	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
CACNA1H	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
CACNA2D1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
CACNA2D2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
CACNA2D3	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
CACNA2D4	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
CACNB2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
CACNB3	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Gen	Notch	Wnt	HedgeHog	Modificación cromatina	Regulación transcripcional	Reparación daño ADN	TGF-B	MAPK	JAK-STAT	PI3K	RAS	Ciclo celular, apoptosis
CACNB4	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
CACNG1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
CACNG4	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
CACNG6	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
CALML3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CALML5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CALML6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CAMK2B	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CAPN2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
CARD11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CASP10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
CASP12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
CASP3	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
CASP7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
CASP8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
CASP9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
CBL	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
CBLC	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
CC2D1B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCNA1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
CCNA2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
CCNB1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
CCNB3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
CCND1	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
CCND2	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+

Gen	Notch	Wnt	HedgeHog	Modificación cromatina	Regulación transcripcional	Reparación daño ADN	TGF-B	MAPK	JAK-STAT	PI3K	RAS	Ciclo celular, apoptosis
CCND3	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
CCNE1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
CCNE2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
CCNO	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
CCR7	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
CD14	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
CD19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
CD40	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
CDC14A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
CDC14B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
CDC25A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
CDC25B	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
CDC25C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
CDC6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
CDC7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
CDH1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CDK2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
CDK4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
CDK6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
CDKN1A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
CDKN1B	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
CDKN1C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
CDKN2A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
CDKN2B	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
CDKN2C	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+

Gen	Modificación cromatina			Regulación transcripcional	Reparación daño ADN		TGF-B	MAPK	JAK-STAT	PI3K	RAS	Ciclo celular, apoptosis
	Notch	Wnt	HedgeHog									
CDKN2D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
CEBPA	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
CEBPE	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
CHAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
CHEK1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
CHEK2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
CHUK	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
CIC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CLCF1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
CNOT10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CNOT4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CNTFR	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
COG7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
COL11A1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
COL11A2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
COL1A1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
COL1A2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
COL24A1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
COL27A1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
COL2A1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
COL3A1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
COL4A3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
COL4A4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
COL4A5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
COL4A6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

Gen	Notch	Wnt	HedgeHog	Modificación cromatina	Regulación transcripcional	Reparación daño ADN	TGF-B	MAPK	JAK-STAT	PI3K	RAS	Ciclo celular, apoptosis
COL5A1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
COL5A2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
COL6A6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
COMP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
CREB3L1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
CREB3L3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
CREB3L4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
CREB5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
CREBBP	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+
CRLF2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
CSF1R	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
CSF2	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
CSF3	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
CSF3R	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
CTNNB1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CUL1	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
CXXC4	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CYLD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DAXX	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
DDB2	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
DDIT3	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
DDIT4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
DDX50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DHX16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DKK1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Gen	Notch	Wnt	HedgeHog	Modificación cromatina	Regulación transcripcional	Reparación daño ADN	TGF-B	MAPK	JAK-STAT	PI3K	RAS	Ciclo celular, apoptosis
DKK2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DKK4	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DLL1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DLL3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DLL4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DNAJC14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DNMT1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DNMT3A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DTX1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DTX3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DTX4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DUSP10	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
DUSP2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
DUSP4	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
DUSP5	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
DUSP6	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
DUSP8	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
E2F1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
E2F5	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
EDC3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EFNA1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
EFNA2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
EFNA3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
EFNA5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
EGF	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-

Gen	Notch	Wnt	HedgeHog	Modificación cromatina	Regulación transcripcional	Reparación daño ADN	TGF-B	MAPK	JAK-STAT	PI3K	RAS	Ciclo celular, apoptosis
EGFR	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
EIF2B4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EIF4EBP1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
ENDOG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
EP300	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+
EPHA2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
EPO	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
EPOR	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
ERBB2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ERCC2	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
ERCC3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ERCC6	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
ETS2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
ETV1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
ETV4	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
ETV7	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
EYA1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
EZH2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FANCA	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
FANCB	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
FANCC	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
FANCE	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
FANCF	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
FANCG	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
FANCL	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Gen	Notch	Wnt	HedgeHog	Modificación cromatina	Regulación transcripcional	Reparación daño ADN	TGF-B	MAPK	JAK-STAT	PI3K	RAS	Ciclo celular, apoptosis
FAS	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
FASLG	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
FBXW7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FCF1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FEN1	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
FGF1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
FGF10	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
FGF11	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
FGF12	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
FGF13	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
FGF14	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
FGF16	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
FGF17	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
FGF18	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
FGF19	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
FGF2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
FGF20	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
FGF21	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
FGF22	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
FGF23	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
FGF3	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
FGF4	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
FGF5	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
FGF6	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
FGF7	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-

Gen	Notch	Wnt	HedgeHog	Modificación cromatina	Regulación transcripcional	Reparación daño ADN	TGF-B	MAPK	JAK-STAT	PI3K	RAS	Ciclo celular, apoptosis
FGF8	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
FGF9	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
FGFR1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
FGFR2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
FGFR3	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
FGFR4	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
FIGF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
FLNA	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
FLNC	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
FLT1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
FLT3	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
FN1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
FOS	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
FOSL1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FOXL2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FOXO4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
FST	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
FTSJ2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FUBP1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FUT8	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
FZD10	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FZD2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FZD3	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FZD7	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FZD8	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Gen	Notch	Wnt	HedgeHog	Modificación cromatina	Regulación transcripcional	Reparación daño ADN	TGF-B	MAPK	JAK-STAT	PI3K	RAS	Ciclo celular, apoptosis
FZD9	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GADD45A	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
GADD45B	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
GADD45G	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
GAS1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GATA1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GATA2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GATA3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GDF6	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
GHR	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
GLI1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLI3	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GNA11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GNAQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GNAS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GNG12	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
GNG4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
GNG7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
GNGT1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
GPATCH3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GPC4	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GRB2	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
GRIA3	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
GRIN1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
GRIN2A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

Gen	Notch	Wnt	HedgeHog	Modificación cromatina	Regulación transcripcional	Reparación daño ADN	TGF-B	MAPK	JAK-STAT	PI3K	RAS	Ciclo celular, apoptosis
GRIN2B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
GSK3B	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
GTF2H3	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
GZMB	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
H2AFX	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
H3F3A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
H3F3C	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
HDAC1	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
HDAC10	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
HDAC11	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
HDAC2	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
HDAC3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HDAC4	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
HDAC5	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
HDAC6	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
HELLS	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
HES1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HES5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HGF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
HHEX	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
HHIP	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HIST1H3B	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
HIST1H3G	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
HIST1H3H	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
HMGA1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Gen	Modificación cromatina			Regulación transcripcional	Reparación daño ADN		TGF-B	MAPK	JAK-STAT	PI3K	RAS	Ciclo celular, apoptosis
	Notch	Wnt	HedgeHog									
HMGA2	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
HNF1A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HOXA10	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
HOXA11	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
HOXA9	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
HPGD	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
HRAS	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
HSP90B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
HSPA1A	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
HSPA2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
HSPA6	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
HSPB1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
IBSP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
ID1	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
ID2	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
ID4	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
IDH1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IDH2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IFNA17	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
IFNA2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
IFNA7	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
IFNG	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
IGF1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
IGF1R	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
IGFBP3	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

Gen	Notch	Wnt	HedgeHog	Modificación cromatina	Regulación transcripcional	Reparación daño ADN	TGF-B	MAPK	JAK-STAT	PI3K	RAS	Ciclo celular, apoptosis
IKKBK	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
IKBKG	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
IL10	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
IL11	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
IL11RA	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
IL12A	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
IL12B	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
IL12RB2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
IL13	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
IL13RA2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
IL15	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
IL19	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
IL1A	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
IL1B	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
IL1R1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
IL1R2	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
IL1RAP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
IL20RA	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
IL20RB	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
IL22RA1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
IL22RA2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
IL23A	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
IL23R	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
IL24	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
IL2RA	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-

Gen	Notch	Wnt	HedgeHog	Modificación cromatina	Regulación transcripcional	Reparación daño			JAK-STAT	PI3K	RAS	Ciclo celular, apoptosis
						ADN	TGF-B	MAPK				
IL2RB	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-
IL3	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
IL3RA	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
IL5RA	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
IL6	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-
IL6R	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
IL7	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
IL7R	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
IL8	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
INHBA	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
INHBB	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
IRAK2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
IRAK3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
IRS1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
ITGA2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
ITGA3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
ITGA6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
ITGA7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
ITGA8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
ITGA9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
ITGB3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
ITGB4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
ITGB6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
ITGB7	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
ITGB8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

Gen	Notch	Wnt	HedgeHog	Modificación cromatina	Regulación transcripcional	Reparación daño ADN	TGF-B	MAPK	JAK-STAT	PI3K	RAS	Ciclo celular, apoptosis
JAG1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JAG2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JAK1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
JAK2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
JAK3	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
JUN	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
KAT2B	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KDM5C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KDM6A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
KIT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
KITLG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
KLF4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KMT2C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KMT2D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KRAS	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
LAMA1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LAMA3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LAMA5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LAMB3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LAMB4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LAMC2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LAMC3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
LAT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
LEF1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LEFTY1	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

Gen	Notch	Wnt	HedgeHog	Modificación cromatina	Regulación transcripcional	Reparación daño ADN	TGF-B	MAPK	JAK-STAT	PI3K	RAS	Ciclo celular, apoptosis
LEFTY2	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
LEP	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
LEPR	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
LFNG	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LIF	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
LIFR	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
LIG4	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
LRP2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LTBP1	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
MAD2L2	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
MAML2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MAP2K1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
MAP2K2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
MAP2K4	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
MAP2K6	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
MAP3K1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
MAP3K12	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
MAP3K13	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
MAP3K14	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
MAP3K5	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
MAP3K8	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
MAPK1	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
MAPK10	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
MAPK12	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
MAPK3	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-

Gen	Notch	Wnt	HedgeHog	Modificación cromatina	Regulación transcripcional	Reparación daño ADN	TGF-B	MAPK	JAK-STAT	PI3K	RAS	Ciclo celular, apoptosis
MAPK8	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
MAPK8IP1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
MAPK8IP2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
MAPK9	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
MAPT	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
MCM2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
MCM4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
MCM5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
MCM7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
MDC1	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
MDM2	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
MECOM	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
MED12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MEN1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
MET	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
MFNG	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MGMT	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
MLF1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
MLH1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MLLT3	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
MLLT4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
MMP3	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
MMP7	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MMP9	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
MNAT1	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Gen	Notch	Wnt	HedgeHog	Modificación cromatina	Regulación transcripcional	Reparación daño ADN	TGF-B	MAPK	JAK-STAT	PI3K	RAS	Ciclo celular, apoptosis
MPL	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
MPO	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
MRPS5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MSH2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MSH6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MTMR14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MTOR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
MUTYH	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
MYB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
MYC	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+
MYCN	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
MYD88	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
NASP	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
NBN	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
NCOR1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
NF1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
NF2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NFATC1	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
NFE2L2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NFKB1	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+
NFKBIA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
NFKBIZ	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
NGF	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
NGFR	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
NKD1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Gen	Notch	Wnt	HedgeHog	Modificación cromatina	Regulación transcripcional	Reparación daño ADN	TGF-B	MAPK	JAK-STAT	PI3K	RAS	Ciclo celular, apoptosis
NODAL	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
NOG	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
NOL7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NOS3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
NOTCH1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NOTCH2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NOTCH3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NPM1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NPM2	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
NR4A1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
NR4A3	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
NRAS	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
NSD1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
NTF3	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
NTHL1	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
NTRK1	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
NTRK2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
NUBP1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NUMBL	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NUPR1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
OSM	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
PAK3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
PAK7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
PAX3	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
PAX5	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

Gen	Notch	Wnt	HedgeHog	Modificación cromatina	Regulación transcripcional	Reparación daño ADN	TGF-B	MAPK	JAK-STAT	PI3K	RAS	Ciclo celular, apoptosis
PAX8	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
PBRM1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PBX1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
PBX3	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
PCK1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
PCNA	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
PDGFA	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-
PDGFB	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
PDGFC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
PDGFD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
PDGFRA	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
PDGFRB	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
PGF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
PHF6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PIAS1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PIK3CA	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
PIK3CB	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
PIK3CD	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
PIK3CG	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
PIK3R1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
PIK3R2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
PIK3R3	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
PIK3R4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PIK3R5	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
PIM1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

Gen	Notch	Wnt	HedgeHog	Modificación cromatina	Regulación transcripcional	Reparación daño ADN	TGF-B	MAPK	JAK-STAT	PI3K	RAS	Ciclo celular, apoptosis
PITX2	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
PKMYT1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
PLA1A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
PLA2G10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
PLA2G2A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
PLA2G3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
PLA2G4A	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
PLA2G4C	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
PLA2G4E	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
PLA2G4F	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
PLA2G5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
PLAT	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
PLAU	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
PLCB1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PLCB4	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PLCE1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
PLCG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
PLD1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
PML	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
POLB	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
POLD1	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
POLD4	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
POLE2	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
POLR2D	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
POLR2H	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Gen	Notch	Wnt	HedgeHog	Modificación cromatina	Regulación transcripcional	Reparación daño ADN	TGF-B	MAPK	JAK-STAT	PI3K	RAS	Ciclo celular, apoptosis
POLR2J	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
PPARG	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
PPARGC1A	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
PPP2CB	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
PPP2R1A	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
PPP2R2B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
PPP2R2C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
PPP3CA	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
PPP3CB	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
PPP3CC	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
PPP3R1	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
PPP3R2	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
PRDM1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PRKAA2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
PRKACA	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
PRKACB	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
PRKACG	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
PRKAR1B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
PRKAR2A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
PRKAR2B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
PRKCA	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
PRKCB	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
PRKCG	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
PRKDC	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
PRKX	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+

Gen	Notch	Wnt	HedgeHog	Modificación cromatina	Regulación transcripcional	Reparación daño ADN	TGF-B	MAPK	JAK-STAT	PI3K	RAS	Ciclo celular, apoptosis
PRL	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
PRLR	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
PRMT8	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
PROM1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
PRPF38A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PTCH1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PTCRA	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
PTEN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
PTPN11	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
PTPN5	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
PTPRR	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
PTTG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
RAC1	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
RAC2	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
RAC3	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
RAD21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
RAD50	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
RAD51	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
RAD52	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
RAF1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
RASA4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
RASAL1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
RASGRF1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
RASGRF2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
RASGRP1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-

Gen	Notch	Wnt	HedgeHog	Modificación cromatina	Regulación transcripcional	Reparación daño ADN	TGF-B	MAPK	JAK-STAT	PI3K	RAS	Ciclo celular, apoptosis
RASGRP2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
RB1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
RBM45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RBX1	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
RELA	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+
RELN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
RET	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RFC3	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
RFC4	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
RHOA	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
RIN1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
RNF43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RPA3	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
RPS27A	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
RPS6KA5	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
RPS6KA6	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
RRAS2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
RUNX1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
RUNX1T1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
RXRG	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
SAP130	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SETBP1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SETD2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SF3A3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SF3B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Gen	Notch	Wnt	HedgeHog	Modificación cromatina	Regulación transcripcional	Reparación daño ADN	TGF-B	MAPK	JAK-STAT	PI3K	RAS	Ciclo celular, apoptosis
SFN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
SFRP1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SFRP2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SFRP4	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SGK2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
SHC1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
SHC2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
SHC3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
SHC4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
SIN3A	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
SIRT4	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
SIX1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
SKP1	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
SKP2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
SLC4A1AP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SMAD2	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
SMAD3	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
SMAD4	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
SMAD9	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
SMARCA4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SMARCB1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SMC1A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
SMC1B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
SMC3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
SMO	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Gen	Modificación cromatina			Regulación transcripcional		Reparación daño ADN		Ciclo celular, apoptosis				
	Notch	Wnt	HedgeHog	TGF-B	MAPK	JAK-STAT	PI3K	RAS				
SOCS1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
SOCS2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
SOCS3	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
SOS1	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
SOS2	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
SOST	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SOX17	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SOX9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SP1	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
SPOP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SPP1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
SPRY1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
SPRY2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
SPRY4	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
SRSF2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SSX1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
STAG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
STAT1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
STAT3	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
STAT4	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
STK11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
STMN1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
SUV39H2	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
SYK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TBL1XR1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Gen	Notch	Wnt	HedgeHog	Modificación cromatina	Regulación transcripcional	Reparación daño ADN	TGF-B	MAPK	JAK-STAT	PI3K	RAS	Ciclo celular, apoptosis
TCF3	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
TCF7L1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TCL1B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TET2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TFDP1	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
TGFB1	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
TGFB2	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
TGFB3	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
TGFBR2	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
THBS1	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
THBS4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
THEM4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TIAM1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
TLK2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TLR2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TLR4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TLX1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
TMPRSS2	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
TMUB2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TNC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TNF	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
TNFAIP3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TNFRSF10A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
TNFRSF10B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
TNFRSF10C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Gen	Notch	Wnt	HedgeHog	Modificación cromatina	Regulación transcripcional	Reparación daño ADN	TGF-B	MAPK	JAK-STAT	PI3K	RAS	Ciclo celular, apoptosis
TNFRSF10D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
TNFSF10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
TNN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TNR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TP53	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+
TPO	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
TRAF7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TRIM39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TSC1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
TSHR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TSLP	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
TSPAN7	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
TTC31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TTK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
U2AF1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UBB	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
UBE2T	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
USP39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UTY	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
VEGFA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
VEGFC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
VHL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VPS33B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WEE1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
WHSC1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

Gen	Notch	Wnt	HedgeHog	Modificación cromatina	Regulación transcripcional	Reparación daño ADN	TGF-B	MAPK	JAK-STAT	PI3K	RAS	Ciclo celular, apoptosis
WHSC1L1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
WIF1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WNT10A	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WNT10B	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WNT11	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WNT16	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
WNT2	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WNT2B	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WNT3	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WNT4	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WNT5A	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WNT5B	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WNT6	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WNT7A	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WNT7B	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WT1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
XPA	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
XRCC4	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
ZAK	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
ZBTB16	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
ZBTB32	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
ZC3H14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ZIC2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ZKSCAN5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ZNF143	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Gen	Notch	Wnt	HedgeHog	Modificación cromatina	Regulación transcripcional	Reparación daño ADN	TGF-B	MAPK	JAK-STAT	PI3K	RAS	Ciclo celular, apoptosis
ZNF346	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ZNF384	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Anexo 3

Documento que acredita la aprobación del estudio por el Comité Coordinador de Ética de la Investigación Biomédica de Andalucía



Dra. Dña. Gloria Luque Fernández, Secretaria del CEI Provincial de Málaga

CERTIFICA:

Que en la sesión de CEI de fecha: 24/09/2015 ha evaluado la propuesta de D/Dña.: Emilio Alba Conejo, referido al Proyecto de Investigación: "Identificación de una firma de expresión génica mediante el Sistema de Análisis nCounter™ como marcador pronóstico de recaída en pacientes con tumores germinales testiculares estadio I".

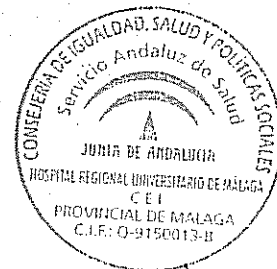
Este Comité lo considera ética y metodológicamente correcto.

Los datos de los pacientes deberán estar debidamente disociados.

La composición del CEI en esta sesión es la siguiente:

- | | |
|---|---|
| Dra. Ana Alonso Torres (UGC Neurociencias) | Dr. Pedro Valdivielso Felices (UGC Med. Interna) |
| Dra. Encarnación Blanco Reina (Farmacología Clínica) | D. José Vallejo Triano (Biblioteca) |
| Dra. Marta Camacho Caro (UGC Ginecología) | Dra. M ^a Carmen Vela Márquez (Farmacéutica Distrito) |
| Dña. Josefa Castro Barea (Gestión del Conocimiento) | |
| Dra. M ^a Angeles Gertrudis Díez (Médico Familia) | |
| Dr. Antonio E. Guzmán Guzmán (UGC Farmacia Hospitalaria) | |
| Dra. Aránzazu Linares Alarcón (UGC Farmacia Hospitalaria) | |
| Dr. Antonio López Téllez (Médico de Familia) | |
| Dña. Inmaculada Lupiáñez Pérez (Enfermera) | |
| Dra. Gloria Luque Fernández (Investigación) | |
| Dra. Cristobalina Mayorga Mayorga (Laboratorio) | |
| Dr. Francisco J. Mérida de la Torre (Laboratorio) | |
| Dr. Victor Navas López (UGC Pediatría) | |
| D. Antonio J. Núñez Montenegro (Subdirección Enfermería) | |
| D. Ramón Porras Sánchez (RRHH-Abogado) | |
| Dña. Virginia Salinas Pérez (UGC Neurociencias-Enfermera) | |
| Dra. M ^a Victoria de la Torre Prados (UGC UMI) | |
| Dra. M ^a José Torres Jaén (UGC Alergia) | |

Lo que firmo en Málaga, a 25 Septiembre 2015



Gloria Luque Fernández

Fdo.: Dra. Gloria Luque Fernández
Secretaria del CEI



Anexo 4

Modelo de consentimiento informado para este
proyecto de investigación

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Antes de proceder a la firma de este consentimiento informado, lea atentamente la información que a continuación se le facilita y realice las preguntas que considere oportunas.

Naturaleza:

Se solicita su consentimiento para la participación en el proyecto con título **“Identificación de una firma de expresión génica mediante el Sistema de Análisis nCounter™ como marcador pronóstico de recaída en pacientes con tumores germinales testiculares estadio I”**.

Importancia:

Los tumores de células germinales testiculares (TCG testiculares) tienen una importante relevancia a nivel social, al ser los tumores más frecuentes en varones jóvenes. Los TCGS testiculares estadio I tienen una tasa de recaída de entre un 15-20% de los pacientes en ausencia de tratamiento complementario, por tanto prácticamente el 80% de estos pacientes estarán curados tras la intervención quirúrgica. Entre las estrategias terapéuticas posteriores a dicha intervención se encuentran la vigilancia activa y la quimioterapia adyuvante en función de factores de riesgo del tumor. Sin embargo, estos factores no han sido validados de forma prospectiva, proporcionando información incompleta sobre la probabilidad de recaída, y hasta un 80% de los pacientes serán “sobretreadados” a partir de la indicación de la quimioterapia basada en estos factores, lo cual conlleva un coste económico y de toxicidades. De este modo, resulta de vital importancia distinguir a los pacientes que pueden beneficiarse del tratamiento con quimioterapia de aquellos que no lo necesitan. Nuestra hipótesis es que la variabilidad en la tasa de recaídas en pacientes diagnosticados de TCG testicular estadio I puede estar determinada por grupos de genes relacionados con el desarrollo de tumores. Ello podría clasificar a un grupo de pacientes donde la mejor opción es la vigilancia activa, frente a otro que sí se beneficiaría de una quimioterapia adyuvante.

De este modo, los resultados que se obtengan pueden dotar al oncólogo de nuevos criterios precisos que contribuyan a una mejora sustancial en la toma de decisiones clínicas. Todo ello puede suponer un cambio en la forma de entender y en el modo en que estos pacientes son tratados, al permitir el diseño de estrategias terapéuticas más individualizadas.

Implicaciones para el paciente:

La participación es totalmente voluntaria.

Todos los datos carácter personal, obtenidos en este estudio son confidenciales y se tratarán conforme a la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.

La información obtenida se utilizará exclusivamente para los fines específicos de este estudio.

CONSENTIMIENTO INFORMADO – CONSENTIMIENTO POR ESCRITO DEL PACIENTE

Yo, (Nombre y Apellidos):

He leído el documento informativo que acompaña a este consentimiento (Información al Paciente)

He podido hacer preguntas sobre el estudio **“Identificación de una firma de expresión génica mediante el Sistema de Análisis nCounter™ como marcador pronóstico de recaída en pacientes con tumores germinales testiculares estadio I”**.

He recibido suficiente información sobre el estudio. He hablado con el profesional sanitario informador:

.....

Comprendo que mi participación es voluntaria y soy libre de participar o no en el estudio.

Se me ha informado que todos los datos obtenidos en este estudio serán confidenciales y se tratarán conforme establece la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.

Se me ha informado de que la información obtenida sólo se utilizará para los fines específicos del estudio.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- ✓ Cuando quiera
- ✓ Sin tener que dar explicaciones
- ✓ Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el proyecto titulado

“Identificación de una firma de expresión génica mediante el Sistema de Análisis nCounter™ como marcador pronóstico de recaída en pacientes con tumores germinales testiculares estadio I”.

Firma del paciente
(o representante legal en su caso)

Firma del profesional
sanitario informador

Nombre y apellidos:.....

.....

Fecha:

Nombre y apellidos:

Fecha: