

TRABAJO ORIGINAL

Inestabilidad del cromosoma Y en el cáncer testicular.

Y chromosome instability in testicular cancer.

Bianchi, N.O.; Richard, Silvina M.; Pavicic, W.

Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE), Calle 526 entre 10 y 11, 1900 La Plata, Argentina

Publicado con autorización de *Mutation Research: Reviews in Mutation Research* Vol 612, #3, 2006, pp172-188, Bianchi et al.

Resumen

Aproximadamente 15-25% de los casos de infertilidad masculina son portadores de amplias deleciones de la región del factor de azoospermia (AZF -*Azoospermic Factor*). Asimismo, alrededor del 80% de los tumores de las células germinales testiculares (TCGT) finlandeses y alrededor del 23-25% de los TCGT de otras regiones geográficas son portadores de deleciones cortas e intersticiales del AZF. En casos de infertilidad, la deleción del AZF ocurre en las células germinales del probando y da origen a un mosaicismo de poblaciones de espermatozoides que comprenden espermatozoides con y sin deleciones. La fecundación de un ovocito por un espermatozoide con deleción del cromosoma Y producirá un varón infértil con deleción del AZF. En los tumores de células germinales testiculares, las deleciones del AZF se producen en las etapas iniciales de la embriogénesis y dan como resultado individuos con un mosaicismo de estirpes celulares con y sin deleciones del cromosoma Y. El carcinoma *in situ* (CIS) es una lesión precancerosa que algunos creen que puede desarrollarse en las gónadas de embriones masculinos antes de la novena semana de edad debido a la transformación de una célula germinal primordial totipotente. Si la célula transformada es portadora de deleciones del AZF, el carcinoma *in situ* resultante también tendrá deleciones del cromosoma Y. El CIS se diferenciará en seminoma o carcinoma embrionario y no seminomas en alrededor de 1×10^{-3} de los adultos jóvenes portadores de lesiones precancerosas de CIS; si la lesión de CIS tiene deleciones del AZF, las formas derivadas de cáncer testicular también evidenciarán estas deleciones. Las deleciones del AZF no cumplen ninguna función en el desarrollo de los cánceres testiculares. Por otra parte, son un marcador de inestabilidad del cromosoma Y y eventualmente de un patrón más generalizado de inestabilidad genómica asociada con la aparición de TCGT. Se han considerado factores genéticos tales como el mal funcionamiento de genes metabolizadores, genes reparadores del ADN, genes ligados al cromosoma Y o genes ligados al cromosoma X, como causas posibles de deleciones del AZF en el cáncer testicular. Sin embargo, aún resulta difícil identificar exactamente los genes involucrados. También se han identificado deleciones del AZF en linfomas no Hodgkinianos y en cánceres colorrectales, dos formas de neoplasias malignas que según se descubrió están asociadas con los TCGT.

©2005 Elsevier B.V. Todos los derechos reservados.

(Rev Argent Endocrinol Metab 43:194-214, 2006)

Dirección Postal: Dr. Bianchi, N.O. IMBICE Calle 526 entre 10 y 11, CC403, 1900 La Plata, Argentina.

Palabras clave: Cáncer testicular, deleciones del AZF, inestabilidad del cromosoma Y.

Key words: Testicular cancer, AZF region deletion, instability Y chromosome.

Abstract

Approximately 15–25% of male infertility cases carry extensive azoospermic factor (AZF) deletions. Moreover, about 80% of Finnish testicular germ cell tumors (TGCT) and about 23–25% of TGCTs from other geographic regions carry short and interstitial AZF deletions. In infertility cases the AZF deficiency occurs in the germ cells of the proband father giving rise to mosaic sperm populations comprising non-deleted and deleted sperms. Fertilization of an ovocyte by a Y deleted sperm will give rise to an AZF-deleted and infertile F1 male. In TGCTs the AZF deletions take place in the initial stages of embryogenesis producing individuals that are a mosaic of Y deleted and non-deleted cell lineages. Carcinoma in situ (CIS) is a premalignant lesion that some believe may develop in gonads of male embryos before the ninth week of age due to transformation of a totipotent primordial germ cell. If the transformed cell carries AZF deletions the resultant CIS will also have Y deletions. CIS will differentiate into seminoma or into embryonal carcinoma and non-seminomas in about 1×10^{-3} of the young adults carrying premalignant CIS outgrowths; if the CIS lesion has AZF deletions the derived forms of testicular cancer will also exhibit these deletions. AZF deletions play no role in the development of testicular cancers. On the other hand, they are a marker of Y chromosome instability and eventually of a more generalized pattern of genome instability associated with the appearance of TGCT. Genetic factors such as malfunction of metabolizing genes, DNA repairing genes, Y-linked or X-linked genes have been considered as possible causes of AZF deletions in testicular cancer. Yet, the exact identification of the genes involved remains elusive. AZF deletions have also been identified in non-Hodgkin lymphomas and in colorectal cancers, two forms of malignancy that have been found to be associated with TGCTs.

©2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

(Rev Argent Endocrinol Metab 43:194-214, 2006)

Contenido

1. Introducción
 2. Estructura del cromosoma Y humano
 3. Regiones del AZF y deleciones del AZF en infertilidad masculina
 4. Deleciones del AZF en casos finlandeses de cáncer testicular
 5. Deleciones del AZF en casos de cáncer testicular de otras regiones geográficas que no sean Finlandia
 6. Origen del mosaicismo de deleciones del AZF en casos de neoplasias malignas testiculares
 7. Causas de las deleciones del AZF
 8. Otras alteraciones genómicas en TCGT
 9. Deleciones del AZF en neoplasias malignas que no sean TCGT
 10. Consideraciones finales
- Agradecimientos
Bibliografía

1. Introducción

Las deleciones dentro de la región del AZF del cromosoma Y humano suelen asociarse con la infertilidad masculina. En promedio, estas deficiencias son la causa de infertilidad en aproximadamente 15-25% de los hombres infértiles. Asimismo, como la mayoría de los hombres portadores de estas deleciones tienen graves trastornos reproductivos, el cromosoma Y anormal no se puede transmitir hereditariamente de padres a hijos y, por lo tanto, estas microdeleciones específicas del cromosoma Y son eventos de nueva procedencia (*de novo*) que representan uno de los tipos más frecuentes de deleciones que ocurren en los seres humanos.

Últimamente, se ha informado que las deleciones del AZF también están asociadas con tumores de células germinales testiculares (TCGT) y otras neoplasias malignas; en estos casos las deficiencias del AZF pueden ocurrir en células tumorales y no tumorales, y en células no tumorales se sabe que preceden el desarrollo de cáncer ^[1]. El objetivo de esta reseña es resumir los datos sobre deleciones del AZF en neoplasias malignas y hacer hincapié en las similitudes y diferencias entre las deleciones del AZF en TCGT y en casos de infertilidad masculina. Por lo tanto, antes de realizar un análisis detallado de las características, el origen y las causas de las deleciones del

últimamente, se ha informado que las deleciones del AZF también están asociadas con tumores de células germinales testiculares (TCGT) y otras neoplasias malignas; en estos casos las deficiencias del AZF pueden ocurrir en células tumorales y no tumorales, y en células no tumorales se sabe que preceden el desarrollo de cáncer ^[1]. El objetivo de esta reseña es resumir los datos sobre deleciones del AZF en neoplasias malignas y hacer hincapié en las similitudes y diferencias entre las deleciones del AZF en TCGT y en casos de infertilidad masculina. Por lo tanto, antes de realizar un análisis detallado de las características, el origen y las causas de las deleciones del

AZF en tumores testiculares nos ocuparemos brevemente de la estructura del cromosoma Y humano y de las propiedades más relevantes de las deleciones del AZF en la infertilidad.

2. Estructura del cromosoma Y humano

El cromosoma Y humano es uno de los cromosomas más pequeños y representa el 2-3% (~60 Mb) del conjunto haploide. El 5% del cromosoma Y humano corresponde a dos regiones pseudoautosómicas (PAR) ubicadas a nivel distal en Yp (PAR1, ~4% o ~2,4 Mb de la extensión Y) e Yq (PAR2 ~1% o ~0,6 Mb de la extensión Y). En la meiosis, PAR1 y PAR2 se aparean e intercambian material con regiones homólogas del cromosoma X con una frecuencia de recombinación considerablemente más alta para PAR1 que para PAR2 debido a las diferencias de tamaño entre las dos regiones.

El 95% restante del cromosoma Y, delimitado por los márgenes internos de PAR1 y PAR2, es una región específica del cromosoma Y (YSR) en el sentido de que no se aparea ni se recombina con otros cromosomas del conjunto; debido a estas características, la YSR también se identifica con los nombres: "región del cromosoma Y no recombinante" (NRY) [2] o "región específica masculina del cromosoma Y" (YMS) [3]. Las regiones proximales de 8 y 14,5 Mb de Yp y Yq, respectivamente, son regiones euromáticas, mientras que los restantes ~34,5 Mb de la región específica del cromosoma Y, delimitada por el margen distal de la región euromática Yq y el inicio de PAR2, corresponde al bloque distal heterocromático masivo de Yq (Fig.1). Asimismo, Skaletsky y col. [3] han identificado un pequeño segmento de heterocromatina intersticial, formado por >3000 repeticiones en tándem de una secuencia básica de 125 bp (locus DYZ19) que mapea en Yq11.22 (Fig.1) e interrumpe el bloque euromático.

Los genes que mapean en PAR1 y 2 están indicados en la Tabla 1. Hasta el momento no se han descrito genes ni unidades de transcripción para el bloque heterocromático de YSR. Por otra parte, la región euromática de YSR comprende 156 unidades de transcripción que están localizadas dentro de tres tipos diferentes de secuencias de ADN identificadas como clases "X degenerada", "X transpuesta" y "amplicónica" [3].

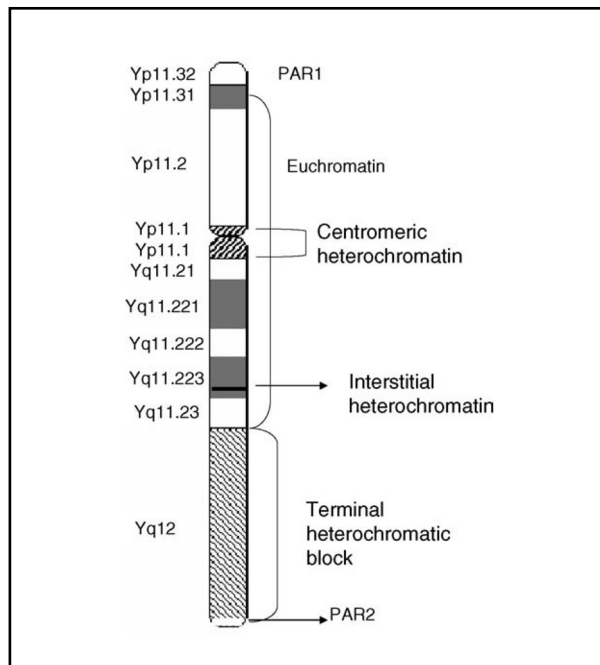


Fig. 1. Bandedo cromosómico de Giemsa del cromosoma Y. Localización cromosómica de PAR1, PAR2, euromatina, regiones de heterocromatina intersticial y terminal.

Las unidades de transcripción que corresponden a la clase de secuencias X transpuestas aparentemente evolucionaron 3-4 millones de años atrás, después de la divergencia de los hominoideos de los chimpancés, mediante una transposición masiva de un segmento de ADN X en el cromosoma Y seguida por una inversión del bloque insertado que impidió la recombinación con las regiones homólogas del cromosoma X. Debido a su origen relativamente reciente, las secuencias Y transpuestas siguen siendo 99% idénticas a los genes homólogos en Xq21, que es el segmento específico del cromosoma X originado en las secuencias ancestrales del cromosoma X transpuesto en el cromosoma Y [3]. Los genes clasificados como X transpuesta están indicados en la Tabla 1.

La clase de genes y pseudogenes X degenerados (Tabla 1) también evidencia homología con genes autosómicos o con genes X ubicados fuera de Xq21. Sin embargo, estas homologías oscilan entre 66% y 96%, lo que indica un proceso más antiguo de divergencia relacionada con el origen de los cromosomas X y Y a

Tabla 1. Clase de familias de genes y genes del cromosoma Y

Clases de genes Y	Símbolos del gen	Nombre del gen	N° de copias
PAR 1	CSFR2R α	GM-CSF receptor α subunit	1
	SHOX	Short stature homeobox-containing	1
	IL3RA	Interleukin-3 receptor α subunit	1
	ANT3	Ademine nucleotide translocase	1
	ASMTL	Acetylserotonine methyltransferase-like	1
	ASMT	Acetylserotonine methyltransferase	1
	XE7	X escapee 1	1
	PGPL	Pseudoautosomal GTP binding protein-like	1
	MIC2	Expression of XG and MIC2 on erithrocytes	1
	PAR2	IL9R	Interleukin 9 receptor
SYBL1		Synaptobrevin-like 1	1
HSPRY3		Human-sprouty 3	1
CXYorf1		CXYorf1 protein	
X transpuesto	TGIF2LY	TGFB-induced factor 2-like, Y-linked	1
	PCDH11Y	Protocadherin 11 Y	1
X degenerado	SRY	Sex determining region Y	1
	RPS4Y1	Ribosomal protein S4 Y isoform 1	1
	ZFY	Zinc finger Y	1
	AMELY	Amelogenin Y	1
	TBL1Y	Transducin (beta)like 1 protein Y	1
	PRKY	Protein kinase Y	1
	USP9Y	Ubiquitin specific protease 9 Y	1
	DBY	Dead box Y	1
	UTY	Ubiquitous TPR motif Y	1
	TMSB4Y	Thymosin (beta)4 Y	1
	NLGN4Y	Neuroigin 4 isoform Y	1
	CYorf15A	Chromosome Y open reading frame 15A	1
	Cyorf15B	Chromosome Y open reading frame 15B	1
	SMCY	SMC (mouse) homolog, Y	1
	E1F1AY	Translation initiation factor 1AY	1
	RPS4Y2	Ribosomal protein S4 Y isoform 2	
Amplicónica	TSPY	Testis specific protein Y	~35
	VCY	Variable charge Y	2
	XKRY	XK related Y	2
	CDY	Chromodomain Y	4
	HSFY	Heat shock transcription factor Y	2
	RBMV	RNA binding motif Y	6
	PRV	PTP-BL related Y	2
	BPY2	Basic protein Y 2	3
	DAZ	Deleted in azoospermia	4

partir de autosomas y a la posterior co-evolución independiente de autosomas y el par XY derivado^[3].

Las clases de cromosomas Y identificadas como amplicónicas comprenden largas unidades de repetición diseminadas a lo largo de la región eucromática de Yq y la región proximal de Yp. Estas repeticiones se extienden por decenas a cientos de kb y abarcan varias familias de secuencias estructuradas como palíndromos (P) y repeticiones inversas (IR). Hasta el momento se han descrito un total de ocho palíndromos (P1-8) y cinco repeticiones inversas (IR1-5) (Fig.2). Una de las peculiaridades adiciona-

les de estos palíndromos y repeticiones inversas es la presencia de largas extensiones (>50 kb) lo que demuestra una notable similitud de base (hasta 99,9%) entre los dos brazos de un determinado palíndromo o de una determinada repetición inversa, o incluso entre palíndromos y repeticiones inversas ubicados en diferentes regiones amplicónicas^[3, 4]. Incluidos dentro de los segmentos amplicónicos hay 9 familias de genes multicopia con expresión específica de testículo y 2 a ~35 copias de genes por familia de gen repetido. Las diferentes copias de genes de la misma familia también muestran una no-

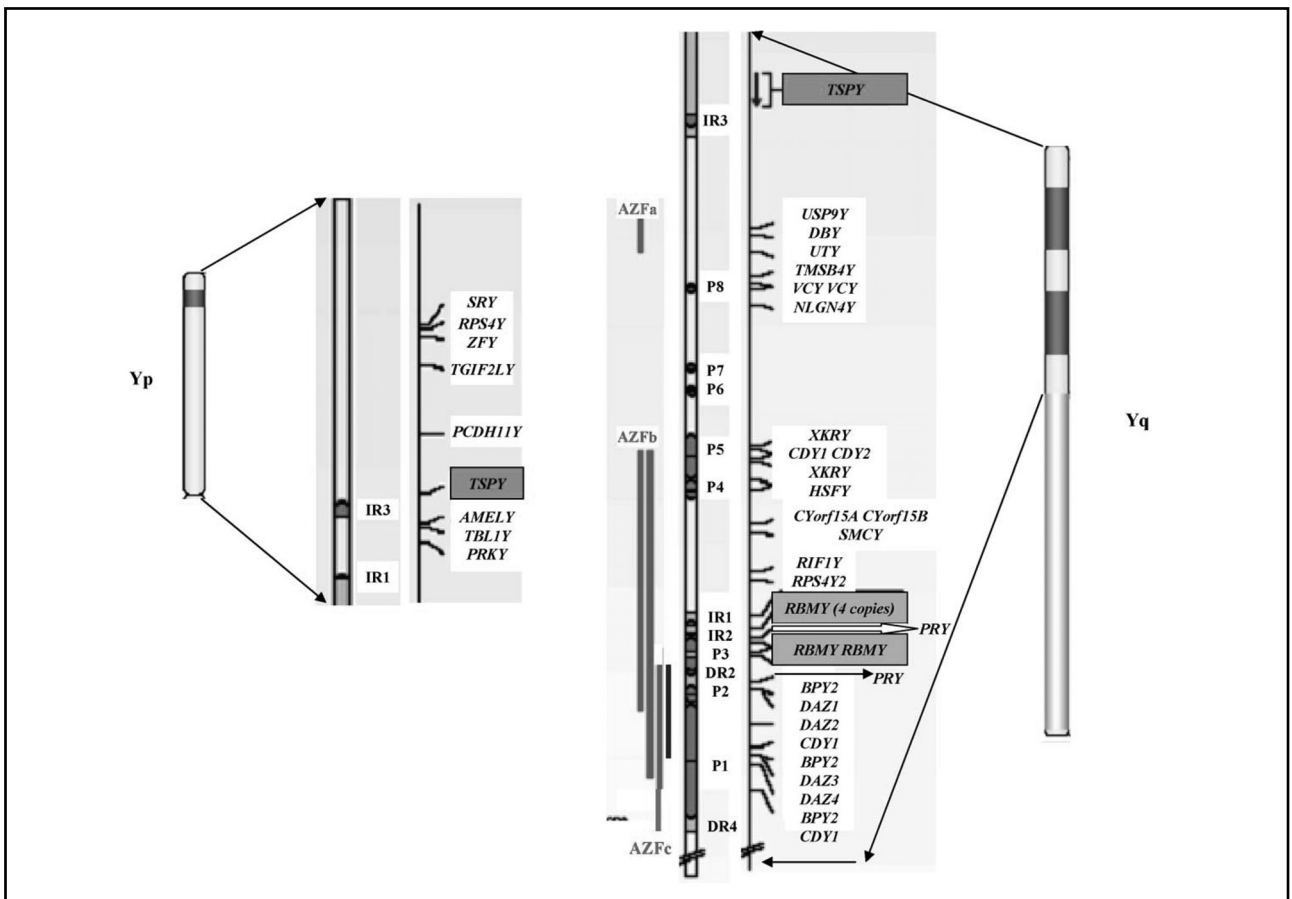


Figura 2. La expansión y detalles de las IP y los P de las regiones eucromáticas Yp y Yq indican la ubicación de las repeticiones inversas y los palíndromos más relevantes, respectivamente. Los acrónimos identifican genes y familias de genes (véanse los nombres completos en la Tabla 2). Los recuadros grises representan la ubicación de dos familias de genes multicopia (TSPY y RBMY, respectivamente). La barra vertical corta superior a la derecha del dominio eucromático Yq indica la extensión de las deleciones AZFa completas. Debajo, las dos barras verticales más largas y externas ilustran la extensión de la deleción AZFb de 6,23 Mb; la tercera barra vertical muestra la región ocupada por las deleciones AZFc; la barra vertical más interna marca la extensión de la deleción AZFc gr/gr. Los genes dentro de la extensión de las barras son totalmente eliminados por el correspondiente.

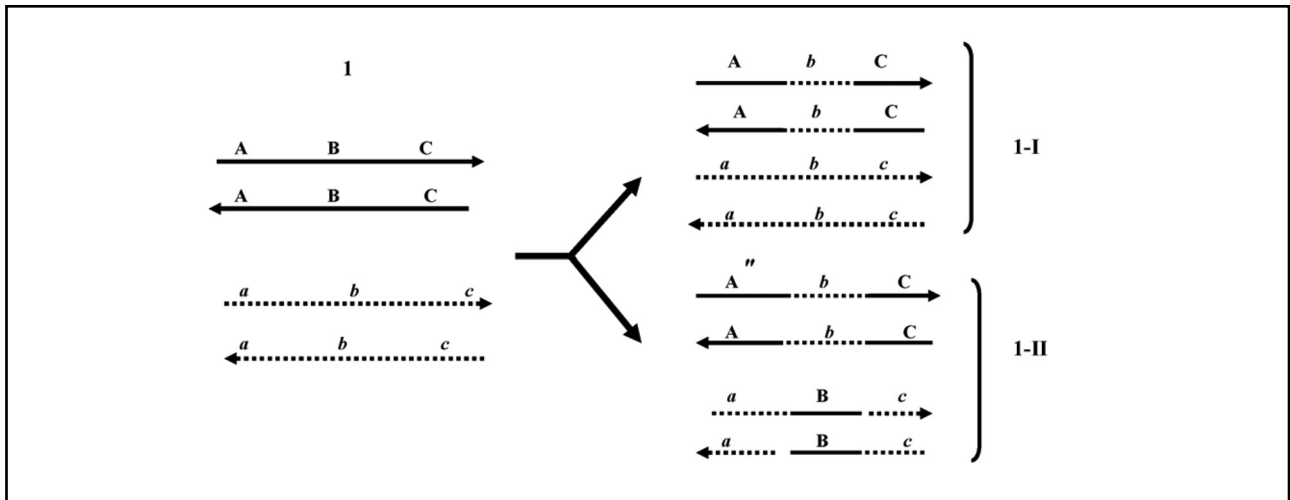


Fig. 3. Estructura inicial de dos segmentos homólogos de ADN de doble cadena (1). Estructura de dos segmentos homólogos de ADN de doble cadena después de la recombinación homóloga y la conversión de genes (1-I) o después de un entrecruzamiento normal (1-II). Las etapas entre 1 y 1-I incluyen la formación de estructuras de Holliday y heterodúplex (no ilustradas).

del cromosoma Y, se ha estimado que deben participar en la conversión de genes por lo menos 600 nucleótidos por varón recién nacido para mantener un equilibrio constante entre las nuevas mutaciones que inducen divergencias entre los brazos de P e IR y la conversión de genes que homogeniza las diferencias mutacionales^[5].

La heterocromatina centromérica está formada por secuencias de ADN repetitivas alfoides, está desprovista de genes, y puede ser considerada como una cuarta clase de región específica del cromosoma Y; la estructura y las variantes de esta familia alfoide han sido descritas detalladamente en la literatura^[8, 9].

Además de P, IR y la heterocromatina centromérica, el cromosoma Y humano también alberga otras clases de repeticiones en el ADN como la secuencia *Alu* y las secuencias retrovirales^[10, 11], ordenamientos intersticiales en tándem de repeticiones cortas y largas, y mini y microsátelites.

3. Regiones del AZF y deleciones del AZF en infertilidad masculina

El 10% al 15% de las parejas en edad reproductiva padecen alguna forma de infertilidad y alrededor de

la mitad de los casos son atribuibles a infertilidad masculina. Asimismo, 1-55% de los hombres infértiles han demostrado presentar microdeleciones de los segmentos eucromáticos Yq conocidos por albergar regiones designadas como factores de azoospermia (AZF)^[12-20]. La gran variación entre laboratorios en la frecuencia de microdeleciones de Yq en casos de infertilidad masculina muy probablemente dependa de la metodología empleada para detectar deleciones y en el tipo de pacientes seleccionados para el análisis del cromosoma Y^[19, 21]; por consiguiente, se puede aceptar la cifra de 15-25% como promedio razonable para la asociación de la infertilidad masculina con las deleciones de Yq^[11].

Las deleciones de Yq citogenéticamente visibles asociadas con la infertilidad masculina fueron detectadas hace aproximadamente 30 años por Tiepolo y Zuffardi^[22], que fueron los primeros en proponer la existencia de factores ligados al cromosoma Y que controlan la espermatogénesis. Estudios posteriores determinaron que las deleciones asociadas con la infertilidad se producían en el intervalo Yq11.21-23 e involucraban una o más de tres regiones bien definidas designadas como AZFa, AZFb y AZFc, y la mayoría de los genes dentro de estas regiones pertenecen a la clase amplicónica de genes^[3, 4, 19] (Tabla 2, Fig. 2). Utilizando un total de nueve reacciones en cadena por la

polimerasa de amplificación múltiple (PCR multiplex) que involucran un total de 42 sitios etiquetados por su secuencia (STS, por sus siglas en inglés) específicos del cromosoma Y, Kent-First y col. ^[19] realizaron un fino mapeo de las deleciones del AZF en 248 casos de infertilidad masculina y en una población control que comprendía 920 hombre fértiles. Entre los individuos que presentaban deleciones, los autores detectaron un pequeño grupo de individuos con oligozoospermia leve en las que las deficiencias de Yq se extendían a través de una región relativamente corta correspondiente al segmento proximal de la región AZFc; este segmento fue identificado como una nueva región de AZF o AZFd ^[19].

Ahora se han determinado con exactitud las posiciones de los puntos de ruptura de las deleciones para las deficiencias de AZF. Dos grupos independientes ^[11, 23] han informado que en los extremos proximal y distal de la región AZFa hay dos secuencias retrovirales muy conservadas (94% similitud de base) de la clase HERV15. La recombinación homóloga entre estas dos repeticiones directas provirales seguida de la deleción del fragmento de ADN incluido produce la pérdida de un segmento de ~0,8 Mb que contiene genes *USP9Y* (X degenerados) y *DBY* (amplicónicos) (Fig. 2). La deleción de estos dos genes da origen al síndrome de sólo células de Sertoli tipo I; por otra parte, las deleciones parciales de AZFa con pérdida de *USP9Y* y presencia de *DBY* presentan oligozoospermia leve ^[24].

El tipo de deleciones conocido como deleciones del AZFb incluye tres tipos de deficiencias que eliminan segmentos de 6,23; 7,03 y 7,66 Mb de largo. Estas amplias deleciones eliminan todo el intervalo AZFb más una parte variable de la región AZFc proximal que corresponde aproximadamente al intervalo AZFd en el estudio de Kent-First y col. ^[19] (Fig. 2). La cantidad de genes y secuencias transcriptas eliminados asciende a 32 para las deleciones de 6,23 Mb y a 42 para las de 7,03-7,66 Mb; los individuos portadores de pérdida de esos genes son azoospermicos ^[25]. En la mayoría de los casos, las deleciones del AZFb/d implican la recombinación homóloga entre secuencias repetidas en P1 (punto de ruptura proximal) y P5 (puntos de ruptura distales) y la posterior pérdida del fragmento entremedio de ellos ^[25]. Sin embargo, algunos casos de deficiencias de AZFb/d son el resultado de mecanismos ajenos a la recom-

binación homóloga ^[25, 26].

La deleción de la región AZFc completa es la forma más frecuente de microdeleciones del cromosoma Y en casos idiopáticos de infertilidad masculina ^[19, 27, 28]. El mapeo de los puntos de ruptura de deleciones del AZFc muestra que estas deficiencias ocurren por recombinación homóloga entre las repeticiones directas D2 (proximal) y D4 (distal) (Fig. 2) ^[4]. Los fragmentos de deleción de AZFc se extienden ~3,5 Mb, lo que implica la pérdida de genes que pertenecen a cinco familias de genes amplicónicos (*RBMY1*, *PRY*, *BPY2*, *DAZ*, *CDY*), pseudogenes, y unidades de transcripción múltiples ^[4]. Las deleciones completas de AZFc suelen asociarse con oligozoospermia severa ^[4, 19, 27, 28].

Repping y col. han descrito dos deleciones parciales de AZFc que afectan 1,6 Mb (forma gr/gr) y 1,8 Mb (forma b1/b3) de la mitad proximal de la región AZFc [29, 30] (Fig. 2). Estas dos formas de deleciones parciales de AZFc poseen varias peculiaridades interesantes. Ambas formas se deben a inversión de un segmento del cromosoma Y seguida de recombinación homóloga de repeticiones que mapean dentro de la región AZFc con la posterior deleción del fragmento invertido. Asimismo, estas deleciones parciales producen la pérdida de varias, pero no todas, las copias de las familias de genes amplicónicos *RBMY*, *BPY2*, *DAZ*, *CDY*, *PRY*, y también reducen, pero sin suprimir, la cantidad de copias de varias unidades de transcripción. Así, las deleciones gr/gr y b1/b3 producen infertilidad leve o incluso ocurren en alrededor de 1,2-1,9% de los individuos con recuentos de espermatozoides normales ^[30, 31]. Se ha descrito que la mayoría de los casos portadores de estas deleciones incompletas provienen de un número limitado de ancestros en los que la deleción ocurrió por primera vez varios miles de años atrás y fue luego transmitida por el ancestro a sucesivas generaciones masculinas ^[29, 30].

4. Deleciones del AZF en casos finlandeses de cáncer testicular

Los estudios iniciales sobre deleciones del AZF en TCGT correspondieron a una serie de 17 cánceres de origen finlandés diagnosticados como seminoma (9 casos), teratoma o teratocarcinoma (4 ca-

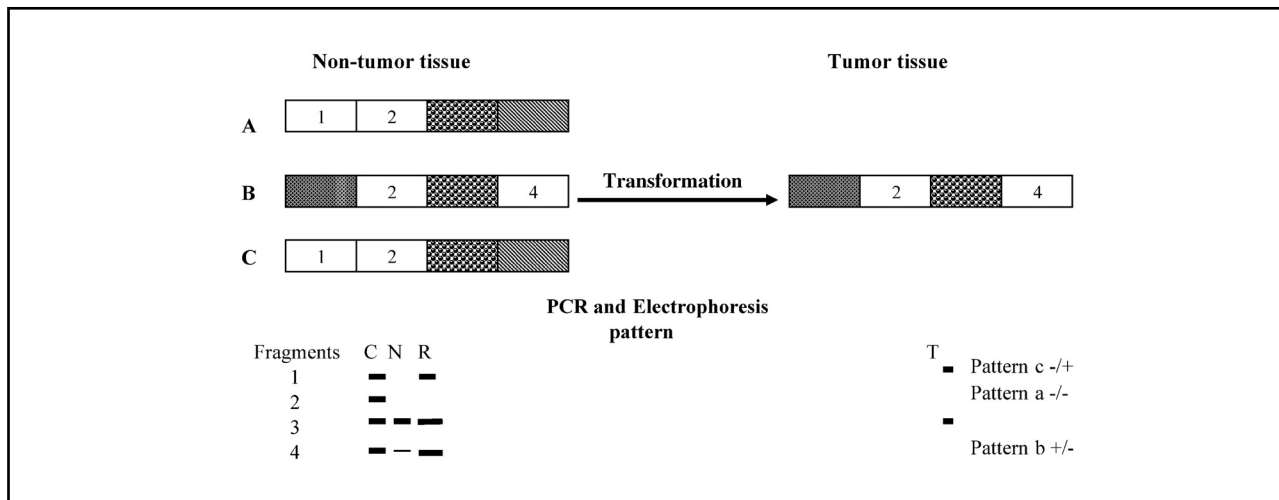


Fig. 4. Una muestra de tejido no tumoral que comprende 3 estirpes (A-C) con deleciones variables (recuadros vacíos) en cuatro loci AZF (1-4). Después de la amplificación primaria de PCR y electroforesis, un ADN control externo muestra los cuatro fragmentos correspondientes a amplificaciones en cada locus (extremo inferior izquierdo). La muestra no tumoral muestra deleción del fragmento 1 debido a baja cantidad de ADN blanco (estirpe sin deleciones B) en la mezcla de PCR; falta de fragmento 2 debido a deleción completa en las tres estirpes; fragmento 3 normal y un fragmento 4 delgado debido a la deleción parcial de las estirpes. La PCR secundaria induce la aparición de fragmento 1 y aumento de fragmento 4. La transformación monoclonal de la estirpe B da origen a una electroforesis (extremo inferior derecho) con presencia de fragmento 1 (patrón (c) o del/+) y 3 y deleción de fragmentos 2 (patrón (a) o del/del) y 4 (patrón (b) o +/del) (reproducido de [1]).

sos), carcinoma embrionario (2 casos) y forma testicular de linfoma no Hodgkiniano (2 casos). La detección de deleciones del AZF fue realizada utilizando cuatro reacciones de PCR multiplex que en total brindan información sobre 17 YSR que corresponden a las regiones AZFa-d (Tabla 2, loci en negrita). Dado que las deleciones del AZF se identifican como la ausencia de un segmento específico en una reacción de PCR, se tomaron varias precauciones para evitar los falsos negativos [1]. Se realizó un análisis de la deleción en tejidos malignos y en tejidos no tumorales representados por sangre (14 casos), testículos (5 casos), y epidídimo (2 casos). Asimismo, también se realizó una detección sistemática de deficiencias de AZF en muestras de sangre de padres de 11 casos con neoplasias malignas testiculares y en 42 controles finlandeses con fertilidad certificada [1]. Todos los fragmentos marcados como deleción en las reacciones de PCR primarias fueron evaluados también por reacciones de reamplificación de PCR utilizando como blanco de la PCR 0,5-0,8 μ l de la reacción de PCR primaria. Los análisis de detección de deleciones fueron

realizados antes de los procedimientos de radioterapia o quimioterapia.

Ninguna de las muestras control y ninguno de los padres de probandos infértiles tenían deleciones del AZF. Por otra parte, 15 de los 17 casos de TCGT (88,2%) presentaban deleciones del AZF en uno o más loci. En total se evaluaron 289 loci para detectar deleciones (17 loci evaluados por 17 casos estudiados) y 44 (15,23%) de estos loci tenían deleciones [1]. Comparando la existencia de deleciones en muestras no tumorales y muestras de tumor obtenidas de un mismo individuo fue posible identificar tres patrones de deleciones que habitualmente coexisten en diferentes loci de AZF del mismo cromosoma Y (Tabla 2, Fig. 4); estos patrones fueron: (a) deleción en tejidos no tumorales y tumorales (del/del), (b) presencia de fragmento de ADN en muestras no tumorales con deleción de fragmento en tejidos malignos (+/del), y (c) deleción en muestras no tumorales con aparición del fragmento en células malignas (del/+) [1]. De los 44 loci con deleciones, 9 (20,4%) tenían el patrón (a) del/del, 21 (47,7%) correspondían al patrón (b) +/del y 14

(31,8%) presentaban el patrón (c) del/+ (Tabla 2).

El análisis de las deleciones en los pacientes con cáncer testicular mostró algunas diferencias notables con las deleciones de los casos de infertilidad. Las deleciones en las neoplasias malignas testiculares y en los tejidos no tumorales de pacientes con neoplasias malignas testiculares están diseminadas a lo largo de diferentes regiones de AZF y son mucho más cortas (unos cientos de bp) que las deleciones de los casos de infertilidad. Dada la corta extensión de los fragmentos de ADN con deleciones, la pérdida de genes se limita a algunas copias de familias de genes multicopia. Por lo tanto, aunque los estudios de población indican una asociación entre el cáncer testicular y la subfertilidad moderada ^[32, 33] a niveles individuales, no se prevé que ocurran casos severos de infertilidad debidos a las microdeleciones del cromosoma Y en pacientes con tumor testicular. En este sentido, es interesante mencionar que Kent-First y col. ^[19] detectaron cortas deleciones intersticiales en las regiones AZF de 0,87% de los hombres con cantidad normal de espermatozoides.

El patrón (c) de deleciones (del/+) fue bastante singular ya que parecía difícil explicar cómo se puede originar una población de células cancerosas que presentan un determinado fragmento AZF a partir de la transformación de células monoclonales de una estirpe celular que carece del fragmento. Para dar cuenta de este hallazgo se propuso que: (i) las deleciones del AZF en tejidos no tumorales precedían la aparición de neoplasias malignas testiculares, (ii) los tejidos no tumorales eran un mosaico con dos o más estirpes celulares que mostraban deleciones en diferentes loci, (iii) la relación de loci del cromosoma Y con deleciones/sin deleciones determinaba la presencia o ausencia de un determinado fragmento AZF al final de una reacción PCR, (iv) la transformación maligna de una célula a partir de una de las estirpes del mosaico seguida por la expansión de la población de la célula transformada puede explicar la aparición del patrón de deleción (a), (b) o (c) por el mecanismo ilustrado en la figura 4 ^[1]. En el caso particular del patrón (c) se supone que la falta aparente de un determinado fragmento AZF en células no tumorales se debe a la preponderancia extrema de estirpes con deleciones por sobre las estirpes sin deleciones; la aparición de es-

te fragmento en células tumorales se debería a la transformación monoclonal de una célula que pertenece a la pequeña población de células portadoras del fragmento (Fig. 4).

Varios loci de AZF que aparecen con deleciones en las reacciones de PCR primarias mostraron la presencia del fragmento en las reamplificaciones de PCR (Tabla 2). Asimismo, el patrón de deleciones del AZF detectado con las reacciones de PCR primarias fue similar en diferentes tejidos no tumorales obtenidos de un mismo individuo, pero en muchos casos exhibió variaciones interindividuales en los patrones de deleción observados después de la reamplificación de PCR. Estos hallazgos avalan aún más la hipótesis del mosaicismo de AZF ^[1].

5. Deleciones del AZF en casos de cáncer testicular de otras regiones geográficas que no sean Finlandia

Debido a efectos fundacionales, causas históricas, demográficas, culturales y políticas, la población de Finlandia posee las características de una población aislada y sujeta a endogamia con al menos cuatro peculiaridades diferentes resultantes de este fenómeno ^[34, 35]. Primero, 36 trastornos monogénicos poco frecuentes (32 autosómicos recesivos, 2 autosómicos dominantes y 2 ligados al cromosoma X) están sobrerrepresentados en Finlandia y conforman el grupo de síndromes de Enfermedades Heredadas Finlandesas (FDH, por sus siglas en inglés) ^[35, 37]. En cambio, otros síndromes monogénicos, como la fibrosis quística y la fenilcetonuria, que son relativamente frecuentes en otras poblaciones geográficas, presentan muy baja frecuencia en Finlandia ^[35]. Asimismo, algunas enfermedades multifactoriales, por ejemplo la diabetes mellitus insulino-dependiente ^[35, 38], y la cardiopatía coronaria ^[35, 39] tienen alta prevalencia en Finlandia. El hallazgo de marcadores de ADN ligados al cromosoma Y que definen haplogrupos Y con marcada especificidad finlandesa ^[40-43] y la alta frecuencia de una deleción específica del cromosoma Y denominada *DYS7C* ^[44] en hombres normales finlandeses identifican un pequeño grupo de estirpes Y que han sido agrupadas bajo el nombre de "Herencia Y Finlandesa" (FYH) ^[45]. Por consiguiente, el estudio de

la incidencia de deleciones del AZF en tumores testiculares de donantes que habitan otras regiones geográficas que no sean Finlandia es muy interesante para determinar si las deleciones del AZF tienen una prevalencia marcada o incluso son específicas de la población finlandesa o si también se encuentran en otros grupos étnicos.

Últimamente, Richard y col. ^[45] analizaron la incidencia de deleciones del AZF en muestras no tumorales/tumorales apareadas de 35 casos de TCGT noruegos y 5 casos argentinos empleando la misma metodología descrita para los casos finlandeses. Además de los datos publicados por Richard y col. ^[45] esta reseña brinda información sobre la frecuencia de las deleciones del AZF en un total de 46 loci de AZF que incluyen los 17 loci previamente evaluados por Bianchi y col. ^[1] y Richard y col. ^[45]. Asimismo, presentamos información sobre muestras tumorales y no tumorales obtenidas de 9 casos nuevos argentinos y de 36 nuevas muestras de neoplasia maligna de Noruega (Tabla 2). Los diagnósticos anatomopatológicos de los TCGT noruegos y argentinos fueron: CIS (3 casos); seminoma (45 casos); carcinoma embrionario (16 casos); no seminoma (5 casos); seminoma / no-seminoma (5 casos), tumor de saco vitelino (5 casos); coriocarcinoma (1 caso); teratoma (5 casos).

La frecuencia de los casos que presentan deleciones en los 49 individuos (35 noruegos y 14 argentinos, Tabla 2) en los que se realizó el análisis de detección en tejidos no tumorales y tumorales fue 26,5% (13 de 49). Asimismo, en las 36 muestras noruegas en las que el estudio se limitó a tejidos tumorales, la prevalencia de deleciones fue 25%. Ambas cifras son significativamente más bajas ($P < 0,01$) que la frecuencia de 88,2% detectada en finlandeses. Sobre un total de 3910 loci AZF analizados (46 loci analizados en 85 casos de TCGT), 220 (5,6%) presentaban deleciones; 142 de estos loci con deleciones correspondían a casos en los cuales el análisis se realizó en muestras no tumorales y tumorales; los restantes 58 loci con deleciones correspondieron a detecciones limitadas a las muestras tumorales. La frecuencia de patrones del/del (a), +/del (b) y del/+ (c) fue 13/142 (9,1%), 85/142 (59%) y 44/142 (30,9%), respectivamente. Las diferencias en la frecuencia de los patrones de deleción (a-c) entre tumores testiculares finlandeses y noruegos/argentinos no fueron estadísticamente significativas. Al igual que lo establecido para las series fin-

landesas, las deleciones en las series noruegas/argentinas fueron también intersticiales, con longitudes de aproximadamente 1 kb o más cortas.

Un seminoma/tumor no seminoma noruego (Tt52, Tabla 2) tratado con orquidectomía desarrolló un seminoma secundario/no seminoma en el resto de los testículos. El tumor primario no presentaba deleciones mientras que el secundario tenía deleciones en múltiples loci (Tabla 2). Asimismo, el caso 51 mostró patrones de deleción variables entre el seminoma primario y una metástasis pulmonar (Tabla 2). Estos hallazgos avalan aún más la hipótesis del mosaicismo, dado que la explicación más factible para las diferencias entre cánceres primarios y secundarios es suponer que se originan a partir de la transformación celular monoclonal de células pertenecientes a diferentes estirpes.

El uso de 46 en lugar de 17 loci para la detección de deleciones del AZF tuvo como objetivo determinar si el aumento en el número de regiones analizadas revelaba nuevos casos de deleciones. Eso no ocurrió (Tabla 2); por consiguiente, el uso de 46 STS sirvió para una mejor definición de las extensiones de fragmentos con deleciones pero no para la individualización de nuevos casos de inestabilidad del cromosoma Y. la tabla 2 también muestra que algunos loci presentan mayor frecuencia de deleción que otros: los loci sY97, sY102, sY119, sY132, sY141, sY255, sY158, y sY160 nunca presentaban deleciones; los loci sY86, sY182, sY121, sY124, sY127, sY128, sY130, sY133, sY145, sY155, sY239, sY202, y sY114 presentaban deleciones con frecuencias que oscilaban entre 21% y 42%, mientras que otros loci tienen una incidencia de deleciones que varía entre 2,6% y 18,4% (Tabla 2).

Recientemente, Nathanson y col. ^[31] descubrieron que la deleción incompleta de AZFc del tipo gr/gr (véase arriba) se produce en 3,3% de una población de pacientes de EE.UU./Reino Unido con TCGT (467 casos analizados) en comparación con una frecuencia de 1,2% en una población control (911 casos) del mismo origen geográfico (EE.UU. / Reino Unido). En consecuencia, estos hallazgos ilustran que algunos cánceres testiculares están asociados con el mismo tipo de deleciones detectadas en casos leves de infertilidad y en hombres infértiles ^[29, 30].

Freydelun-Larsen y col. ^[46] y Lutke-Holzick y col. ^[47] realizaron una detección sistemática de delecio-

nes del AZF en muestras de sangre de 160 casos daneses y 112 casos de de TCGT holandeses, respectivamente, y no hallaron deleciones. Pese al número importante de muestras analizadas deberíamos tener precaución antes de descartar definitivamente la presencia de deleciones del AZF en poblaciones danesas/holandesas. En análisis de detección de deleciones limitados a muestras de sangre u otros tejidos no tumorales, se pasa por alto el patrón (b) (+/del) y la identificación de deleciones se limita a los patrones (a) (del/del) y (c) (del/+) que combinados, representan aproximadamente 10% de los casos de deleciones del AZF (Tabla 2). En la serie danesa el número de loci evaluados fue 9 en 103 casos y 17 en los restantes 57 casos, y ninguno de los loci analizados correspondía a los que mostraban alta frecuencia de deleciones en la Tabla 2. De hecho, sólo cuatro loci evaluados por Freydelund-Larsen y col.^[46] y por Richard y col.^[45] presentaban baja frecuencia de deleciones (Tabla 2, loci marcados con una "x"). La mayoría de los 20 fragmentos de AZF analizados en la serie holandesa también fueron utilizados por Richard y col.^[45] y varios de ellos mostraron altas frecuencias de deleción (Tabla 2, loci marcados con asterisco "**"). Sin embargo, Lutke-Hozik y col.^[47] utilizaron ocho veces más ADN blanco que Bianchi y col.^[1] en las mezclas de PCR, y esto quizás pueda haber causado algunos falso positivos.

Los datos precedentes indican que las deleciones del AZF en los cánceres testiculares ocurren en la población de Finlandia y también en la de otras regiones geográficas. No obstante, la diferencia significativa en la incidencia de la inestabilidad del cromosoma Y entre las neoplasias malignas testiculares en la población de Finlandia en comparación con la de Noruega/Argentina, Estados Unidos/Reino Unido o eventualmente los casos dinamarqueses/holandeses implica que las deleciones del AZF en los tumores testiculares finlandeses pueden estar incluidas dentro del grupo de características de FYH^[45].

La prevalencia de cáncer testicular en los finlandeses no muestra diferencias con la frecuencia informada por Noruega y otros países del norte de Europa^[48, 49]. Así, la alta prevalencia de deleciones del AZF en neoplasias malignas testiculares finlandesas parecer ser una característica independiente de la etiología del cáncer testicular.

6. Origen del mosaicismo de deleciones del AZF en casos de neoplasias malignas testiculares

El hallazgo de mosaicismos de deleciones del AZF en tejidos no tumorales tan diversos como sangre, epidídimo y testículos sólo se puede explicar suponiendo que las deficiencias del AZF ocurrieron en las primeras etapas de la embriogénesis y fueron transmitidas a células somáticas y germinales durante el desarrollo embrionario.

Las células germinales en la gónada indiferenciada derivan de un pequeño grupo de células germinales primordiales del progenitor que aparecen inicialmente en la región epiblastica gástrula y posteriormente migran desde el epiblasto a la gónada embrión^[50]. Durante las etapas de epiblasto y migración, las células germinales primordiales son totipotentes; en adelante, una vez ubicadas en la gónada, pierden pluripotencia y se transforman en las células germinales diferenciadas de la gónada adulta^[50].

Las dos categorías histopatológicas de TCGT son seminomas y no seminomas. En la mayoría de los casos, estas dos formas de TCGT derivan del carcinoma *in situ*, una enfermedad precancerosa que algunos sospechan que es posible que se desarrolle dentro de los túbulos seminíferos antes de finalizada la novena semana de vida humana intrauterina debido a la transformación monoclonal y la proliferación no invasiva de una célula germinal primordial totipotente^[51]. La aparición de capacidades invasivas induce a las células del carcinoma *in situ* a expandirse fuera del tubo seminífero y a diferenciarse en dos formas malignas posibles: (i) seminomas o (ii) carcinomas embrionarios que posteriormente pueden transformarse en coriocarcinomas, carcinomas del saco vitelino o los subtipos teratoma del cáncer no seminoma (Fig. 5). Los carcinomas *in situ*, seminomas y carcinomas embrionarios están formados por células que tienen la misma totipotencia que las células germinales primordiales, mientras que el teratoma, los carcinomas del saco vitelino y los coriocarcinomas están formados por células diferenciadas que representan las tres capas embrionarias^[52, y referencias incluidas en esta bibliografía].

Se hallaron deleciones del AZF en todas las formas histopatológicas de neoplasias malignas testiculares y también en lesiones precancerosas de CIS^[1, 45] (Tabla 2). Así, a la luz de las consideraciones he-

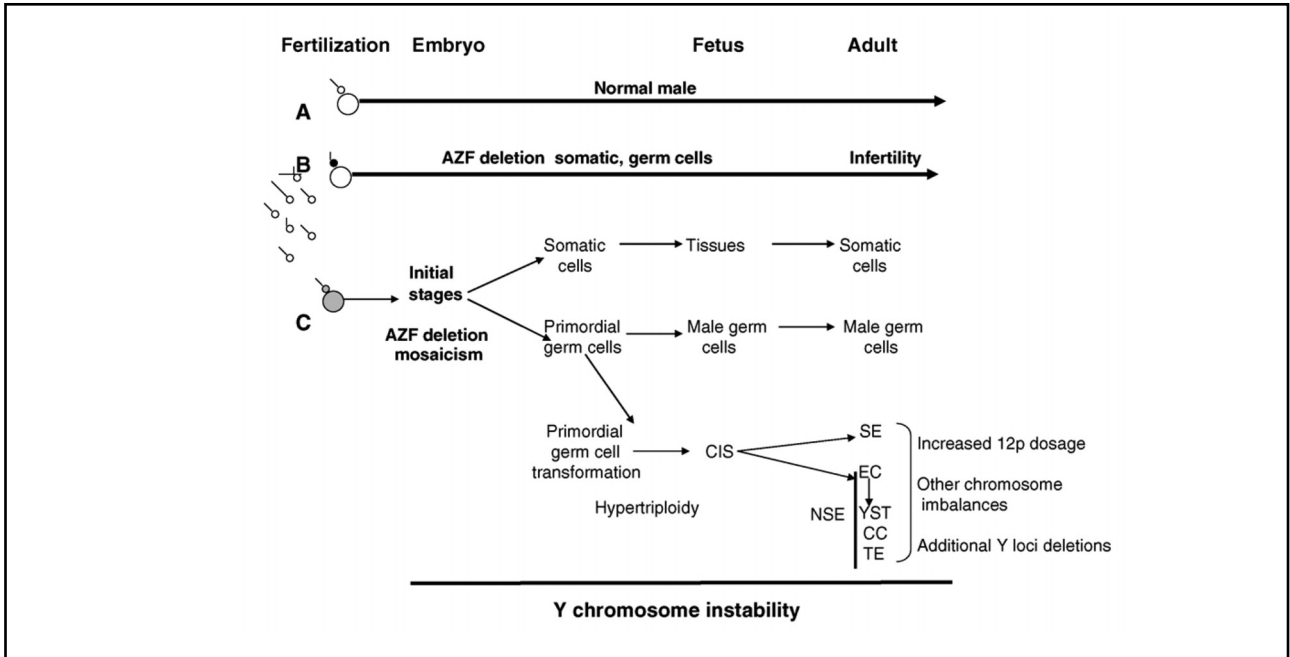


Fig. 5. (A) La fecundación por dos gametos normales produce individuos normales. (B) la fecundación por un espermatozoide portador de amplias deleciones del AZF (gameto negro) da origen a un hombre infértil que es portador de amplias deleciones del AZF en todas las células somáticas y germinales. (C) Debido a factores indeterminados (gametos grises) algunos embriones son portadores de inestabilidad del cromosoma Y y desarrollan un mosaicismo de deleciones del AZF en las primeras etapas del desarrollo embrionario. Este mosaicismo de deleciones se transmite a células no tumorales (flechas de conexión). La transformación monoclonal de una célula germinal primordial con deleciones promueve el desarrollo de un carcinoma *in situ* precanceroso hipertriploide (CIS) con deficiencias del AZF (flecha de conexión). La diferenciación de CIS en seminoma o, si no, en carcinoma embrionario (EC) y no seminomas (NSE) comprende las formas histopatológicas: tumores del saco vitelino (YST), coriocarcinoma (CC) y teratoma (TE). Las flechas de conexión indican la transmisión de deleciones del AZF durante la diferenciación de TCGT. El desarrollo de SE, EC y NSE está asociado con un aumento de la dosis de 12p. La condición hipertriploide persiste en SE pero cambia a aneuploide moderada si el CIS se transforma en EC y NSE.

chas en los párrafos anteriores podemos inferir que la transformación monoclonal de una célula germinal primordial con deleción del AZF produce una lesión de CIS portadora de deficiencias de AZF que son posteriormente transmitidas a los seminomas, carcinomas *in situ* y no seminomas que derivan del CIS. Asimismo, dado que la inestabilidad del cromosoma Y persiste durante el proceso de carcinogénesis, el desarrollo de seminomas y no seminomas está asociado con el agregado de nuevos loci con deleción del AZF a aquellas deleciones ya existentes en la lesión de CIS del progenitor (Fig. 5).

Las deleciones del AZF ocurren como linaje único en todos los tejidos de casos de infertilidad severa debido a las deficiencias del AZF. Dado que los progenitores de estos pacientes no presentan deleciones

en sus células somáticas, debemos concluir que los hombres infértiles son el resultado de la fecundación de un ovocito normal por un espermatozoide con deleción del AZF existente en el semen del probando (Fig. 5). Por lo tanto, los casos de infertilidad masculina debidos a deleciones del cromosoma Y también son el resultado de un mosaicismo de deleciones del AZF que en lugar de ocurrir en las etapas iniciales del embrión se producen en las células germinales del probando. Aproximadamente 15-16% de las parejas reproductoras presentan alguna forma de alteración reproductora; la mitad de estos casos se debe a la infertilidad masculina [53] y alrededor del 15-25% de estos casos, o ~1,2-2% de una población masculina media podría ser portadora de deleciones del AZF [19, 21]. De hecho, es-

tas son cifras estimativas, mientras que las evaluaciones directas de la frecuencia de las deleciones del AZF en poblaciones masculinas con recuento de espermatozoides normal arrojaron frecuencias que oscilaban entre 0,87%^[19] y 1,2-1,9%^[30,31]. Por lo tanto, como primera aproximación, es posible suponer que el semen de la mayoría de los hombres fértiles podría ser un mosaico de espermatozoides normales y con deleción del AZF, que la frecuencia promedio de los espermatozoides con deleción del AZF en el semen es 0,87%-1,9%, y que esta cifra es la probabilidad promedio de que un hombre normal engendre un hijo infértil. Por otra parte, la prevalencia de cáncer testicular oscila entre 2,6 (Lituania) y $15,2 \times 10^{-5}$ (Dinamarca) con un promedio de $4,5 \times 10^{-5}$ para las poblaciones de otras regiones geográficas, incluida Finlandia^[49]. Teniendo en cuenta que la frecuencia de deleciones del AZF en TCGT es de alrededor de 88% en el caso de Finlandia y de 23-25% en el caso de otras regiones geográficas, debemos estimar la frecuencia de aparición de inestabilidad del cromosoma Y y el mosaicismo de deleciones del AZF en la embriogénesis temprana en $3,8 \times 10^{-5}$ para los finlandeses y en 1×10^{-5} para las poblaciones de otras regiones geográficas.

7. Causas de las deleciones del AZF

Las repeticiones inversas y los palíndromos largos y cortos presentan una alta incidencia de inestabilidad espontánea^[54-57]. Los fragmentos AZF con deleciones en los TCGT están ubicados dentro de los palíndromos y las repeticiones inversas que forman la clase amplicónica de secuencias; sin embargo, en la actualidad no se dispone de información sobre la estructura y eventual índice de inestabilidad espontánea de los fragmentos cortos con deleciones en los cánceres testiculares. Por lo tanto, resulta difícil evaluar la función que cumple la inestabilidad del cromosoma Y, esporádica, dependiente de la secuencia, en la etiología de las deleciones asociadas con TCGT.

Dado que las deleciones del AZF en las neoplasias malignas testiculares son parte del síndrome FYH, es claro que los factores genéticos son probablemente una causa importante, al menos para los finlandeses, en la génesis de las deficiencias del AZF

en tumores testiculares. Asimismo, la alta incidencia de aparición de TCGT en los testículos contralaterales de casos con neoplasias malignas testiculares^[58, 59] y el alto riesgo de desarrollar tumores testiculares en hermanos masculinos de casos con TCGT también resalta la relevancia de los factores genéticos en la etiología del cáncer testicular^[60, 61]. Sin embargo, como no se hallaron deleciones del AZF en casos familiares de TCGT, se llegó a la conclusión de que los factores genéticos que inducen la inestabilidad del cromosoma Y probablemente difieren de los involucrados en la etiología del cáncer testicular^[45].

Los posibles factores genéticos que favorecen la aparición de inestabilidad del cromosoma Y en casos de riesgo de desarrollo de neoplasias malignas testiculares pueden ocurrir en el cromosoma Y, el cromosoma X o los autosomas.

Los genes y marcadores de ADN ubicados en la parte no recombinante del cromosoma Y están totalmente ligados y son transmitidos como un único supergen o haplogrupo del ancestro (F0) a las sucesivas generaciones masculinas (F1/EFn). Así, las mutaciones recientes son la única fuente de variabilidad entre el cromosoma Y del ancestro y el cromosoma Y de sus descendientes. En consecuencia, si una mutación del gen Y que induce inestabilidad del cromosoma Y deleciones se produce originariamente en un individuo, todos los descendientes masculinos de ese individuo presentarán inestabilidad del cromosoma Y y pertenecerán al mismo haplogrupo. Se ha descrito un proceso de esta clase para algunas formas de deleciones parciales de AZFc (gr/gr, b/b) que ocurren en hombres normales, en individuos con bajos recuentos de espermatozoides y también en el 3% de los casos de TCGT^[28-31, 62]. Richard y col.^[45] analizaron una serie finlandesa de tumores testiculares e informaron que las deleciones del AZF no existían en los padres de individuos con TCGT que mostraban deleciones y que los casos con deleción del AZF no estaban preferentemente asociados con un determinado haplogrupo. Por consiguiente, no hallaron evidencia que avalara la existencia de las estirpes de Y portadoras de gen/es que aumentan la deleción del AZF.

Rapley y col.^[63] estudiaron 134 familias caracterizadas por la presencia de dos o más parientes con TCGT en la genealogía y hallaron evidencia de un gen de predisposición al tumor testicular que mapea

en Xq27 que se transmitiría a los casos de cáncer testicular a través del gameto femenino. Hasta el momento no hay ninguna publicación sobre las genealogías de casos de TCGT con delección del AZF. Sin embargo, la ausencia de delecciones del AZF en seis probandos con TCGT de Noruega, pertenecientes a familias con dos o más casos de cáncer testicular ^[45] es un argumento contra una posible correlación entre la inestabilidad del cromosoma Y y los genes ligados al cromosoma X.

Durante los últimos 50 años ha habido un aumento continuo en la frecuencia del cáncer testicular en la mayoría de los países industrializados de occidente ^[64, 66] y se ha afirmado que los responsables de este aumento son factores ambientales, principalmente compuestos carcinogénicos. Czene y col. ^[67] analizaron la influencia de factores genéticos y ambientales sobre la predisposición a desarrollar cáncer y hallaron que sobre una serie de 15 neoplasias malignas estudiadas, los TCGT ocupaban el tercer lugar con respecto a la ponderación (25%) de los factores genéticos (los tumores de la tiroides con 58% y los tumores de otras glándulas endocrinas con 28% de ponderación ocupan el primer y segundo lugar, respectivamente). Asimismo, el cáncer testicular, con una ponderación de 17%, era el primero en la serie con respecto a la influencia de las causas ambientales ^[67].

La predisposición a transformaciones celulares malignas debido a compuestos carcinogénicos depende de tres causas concurrentes: (i) dosis interna de compuesto que daña el ADN, (ii) la capacidad de los genes metabolizadores para activar o desactivar los compuestos carcinogénicos y (iii) la eficiencia de los genes reparadores para reparar totalmente el daño al ADN.

Se ha evaluado para varios genes la posible correlación entre los genotipos metabolizadores y el cáncer testicular. Los genes del citocromo P4501A2 (*CYP1A2*, 8p24) y n-acetiltransferasa 2 (*NAT2*, 16p13-14) codifican enzimas específicas involucradas en el metabolismo de muchos compuestos carcinogénicos procarcinogénicos. Estos dos genes muestran diferentes alelos que dan origen a genotipos de metabolismo rápido, intermedio y lento. Los genotipos acetiladores lentos *NAT2* tienen una menor incidencia en los cánceres colorrectales, alta incidencia en el cáncer de vejiga ^[68] y una predisposi-

ción media a desarrollar TCGT. Por otra parte, los metabolizadores lentos *CYP1A2* presentan una asociación significativa con el cáncer testicular ^[69]. El gen *GSTM1* (2q34) produce la enzima glutation-S-transferasa clase μ . Aproximadamente el 40% de los individuos de poblaciones occidentales son homocigóticos para una delección que produce una deficiencia de la mayor parte del gen *GSTM1* ^[70] y un fenotipo nulo para enzimas que muestra un aumento de la asociación con el cáncer colorrectal, adenoma hipofisario, y adenocarcinoma pulmonar en fumadores empedernidos ^[68] pero ninguna asociación con el cáncer testicular ^[71]. El *GSTT1* (22q11.2) codifica la enzima glutation-S-transferasa clase μ y también muestra genotipos nulo/nulo y fenotipos nulos para enzimas en ~20% de las poblaciones occidentales ^[70]. Pavicic, W. (manuscrito en preparación) estudió la constitución del genotipo de *NAT2*, *GSTM1* y *GSTT1* en una serie de cánceres testiculares con delecciones y sin delecciones del AZF y no hallaron correlación entre los genotipos metabolizadores y la aparición de delecciones.

Los genes de reparación de los errores de replicación de bases (MMR, siglas en inglés de "mismatch repair") comprenden una familia de genes que codifican proteínas que corrigen los errores de replicación del ADN. El malfuncionamiento de estos genes, por lo general manifestado como inestabilidad microsatelital (MI), induce una alta predisposición a desarrollar cáncer colorrectal sin poliposis hereditario (HNPCC) y otros tumores ^[72]. En tumores testiculares, Lothe y col. ^[73] no hallaron evidencia de inestabilidad microsatelital mientras que Huddart y col. ^[74] y Velasco y col. ^[75] detectaron inestabilidad microsatelital de alto grado (MI-H) en el 25% de los TCGT (H o de alto grado = aparición en tejidos tumorales de dos o más alelos no heredados utilizando un panel de cinco a siete microsatélites [MS]) ^[76]. Bianchi y col. ^[1] y Richard ^[77] emplearon un panel de seis microsatélites autosómicos y seis microsatélites específicos del cromosoma Y para evaluar la presencia de inestabilidad microsatelital en 35 casos noruegos y 17 casos finlandeses de TCGT. No se detectó inestabilidad microsatelital por marcadores autosómicos ni por marcadores específicos del cromosoma Y en los casos noruegos. Por otra parte, los casos de tumores finlandeses presentaron 12% de MI-H del cromosoma Y y 12% de MI-L del cromosoma Y (L o

de bajo grado = una inestabilidad microsateletal con un panel de 5-7 microsátélites evaluados). El análisis comparativo de MI entre TCGT con deleciones y sin deleciones no mostró diferencias significativas ^[1, 77].

8. Otras alteraciones genómicas en los TCGT

La transformación de una célula germinal primordial normal diploide en una lesión precancerosa de CIS suele estar acompañada por una aneuploidización profunda del cromosoma que produce genomas hipertriploides que persisten durante la diferenciación de CIS en seminomas (Fig. 5). Por otra parte, la diferenciación de CIS en carcinoma embrionario y no seminomas por lo general da como resultado ploidías cromosómicas más bajas ^[52, 78, 79]. Además de aneuploidía, la mayoría de los TCGT muestran diversos desequilibrios genómicos específicos. El más frecuente (80-100% de los casos de seminoma y no seminoma) es la presencia de un aumento de la dosis de 12p debido a i12p u otros tipos de reordenamientos del 12p ^[80, 81]. Dado que el desequilibrio del 12p está prácticamente ausente en las lesiones de CIS se ha propuesto que la transformación del CIS precanceroso en no seminomas y seminomas malignos depende de la aparición de aumento de la dosis de 12p ^[82] (Fig. 5). Otros desequilibrios de dosis que se producen en más del 40% de los cánceres testiculares involucran las regiones cromosómicas 2p, 3q, 3p, 11q, 18q y 18q ^[73]. El análisis de la correlación entre las deleciones del AZF y el desequilibrio de la dosis de 12p mostró que la inestabilidad del cromosoma Y estaba presente en casos con y sin alteraciones del cromosoma 12p ^[1].

Richard (datos no publicados) analizó 67 casos de TCGT finlandeses (17), noruegos (36) y argentinos (14) para detectar deleciones de los genes *AMELY* (Yp11.2) y *AMELX* (Xp22.2), *SRY* (Yp11.3), *ZFY* (Yp11.3), y *ZFX* (Xp22.11). La deleción de estos genes fue específica para tejidos tumorales; por lo tanto, tres casos (4,4%) mostraron pérdida de *SRY* y *ZFY*, un caso (1,5%) mostró pérdida de *AMELX* pero no de *AMELY*, y un caso (1,5%) tenía el gen *ZFY* pero carecía del gen *ZFX* en tejidos tumorales, lo que confirma la existencia de inestabilidad del cromosoma X e inestabilidad del cromosoma Y en otras regiones que no sean la del *AZF*.

9. Deleciones del AZF en neoplasias malignas que no sean TCGT

Dos cánceres de la serie finlandesa analizados para detectar deleciones del AZF fueron formas testiculares de linfoma no-hodgkiniano ^[1]. Asimismo, Travis y col. ^[83] analizaron el riesgo específico del sitio de desarrollar una segunda neoplasia maligna en aproximadamente 29.000 casos de TCGT que sobrevivieron durante 1 año o más, y hallaron que el linfoma no-hodgkiniano y el cáncer colorrectal se encontraban entre las neoplasias malignas que ocurren con más frecuencia de la esperada. Por consiguiente, se analizaron los linfomas no-hodgkinianos y los cánceres colorrectales para detectar deleciones del AZF ^[1, 84].

Se detectó inestabilidad del cromosoma Y en 55,6% de los 27 casos de linfomas no hodgkinianos finlandeses ^[84]. En los 10 casos en los que se realizó el estudio en muestras malignas (ganglios linfáticos) y no malignas (sangre), se detectaron deleciones del AZF en la sangre en cuatro casos y en los ganglios linfáticos en cinco casos ^[84]. Asimismo, no se detectaron deleciones del AZF en 30 casos argentinos de linfoma no hodgkiniano en los que el análisis de detección de deleciones se limitó a muestras de ganglios linfáticos (Richard, datos no publicados).

Cinco casos de HNPCC portadores heterocigóticos de mutaciones *MLH1* fueron evaluados para detectar deleciones del AZF en tejidos tumorales y no tumorales ^[1]. Uno de los cinco casos analizados mostró deleciones del AZF en tejidos no tumorales (patrón (c) o del/+).

Los datos precedentes indican que la inestabilidad del cromosoma Y existe en otras neoplasias malignas que no sea el TCGT y confirma que por lo menos en el caso de los linfomas no hodgkinianos, las deleciones del AZF son parte del síndrome FYH.

10. Consideraciones finales

Aproximadamente 12% de los cánceres testiculares de finlandeses y 75% de los cánceres testiculares de otras poblaciones geográficas no presentan deleciones del AZF. Por lo tanto, es posible concluir que las deleciones del AZF son un marcador de inestabilidad del cromosoma Y pero no un factor etiológico de aparición de TCGT.

Las deleciones del AZF en cánceres testiculares aparecen en las etapas iniciales de la embriogénesis. Kent-First y col. ^[19] informaron que 0,87% de los hombres normales presentan deleciones cortas intersticiales del AZFc/d y Nathanson y col. ^[31] hallaron deleciones gr/gr del AZFc en 1,2% de los hombres normales. En consecuencia, es posible suponer que estos portadores de deleciones del AZF también podrían ser portadores de CIS con alto riesgo de desarrollar tumores testiculares. Es interesante mencionar que la frecuencia de lesiones de CIS hallada post-mortem en los testículos de una serie de 1388 hombres jóvenes supuestamente normales fue 0,43%, una cifra que coincide con el riesgo de por vida de desarrollar cáncer testicular en las poblaciones europeas ^[85].

A partir de toda la información obtenida hasta el momento, es posible proponer una cadena de eventos que llevan al desarrollo del cáncer testicular y al mosaicismo de deleciones del AZF: (i) debido a factores genéticos no determinados o a factores ambientales algunos embriones pueden presentar inestabilidad del cromosoma Y que en varios casos sería parte de un fenómeno más general de inestabilidad genómica; las deleciones mosaico del AZF son marcadores de inestabilidad del cromosoma Y, (ii) 20-30% de los embriones portadores de inestabilidad del cromosoma Y pueden sufrir transformaciones de una célula germinal primordial y desarrollar lesiones precancerosas hipertriploides intratubulares de CIS durante la vida intrauterina, (iii) si la célula transformada tiene deleciones del AZF la alteración de CIS también será portadora de estas deleciones; en adultos jóvenes el CIS con deleción del cromosoma Y puede diferenciarse en seminomas con deleción del cromosoma Y o en no seminomas o carcinomas embrionarios con deleción de Y como consecuencia del desequilibrio en la dosis de 12p (y posiblemente de otras regiones cromosómicas), (iv) los antecedentes de inestabilidad genómica que induce cáncer testicular también aumentarían el riesgo de desarrollar un cáncer testicular secundario y otros tipos de cánceres secundarios (por ej. leucemia, linfomas no hodgkinianos, cáncer colorrectal) en sujetos que hayan sobrevivido a TCGT primarios, (v) las deleciones del AZF ocurrirían en cánceres colorrectales y linfomas no hodgkinianos primarios en casos en los que la inestabilidad del cromosoma Y es par-

te de un síndrome más general de inestabilidad genómica que induce estas neoplasias malignas.

Varias de las afirmaciones anteriores son suposiciones. Sin embargo, forman parte de una posible cadena de eventos interconectados que podrían servir para identificar áreas de futuras investigaciones. Así, por ejemplo, sería importante determinar si las deleciones cortas del AZF asociadas con el cáncer involucran palíndromos cortos o regiones repetitivas cortas con predisposición a inestabilidad espontánea. Asimismo, sabemos que existen factores genéticos que cumplen una función en el origen del mosaicismo de deleciones del AZF en etapas tempranas del embrión, pero hasta el momento ha sido difícil identificar estos factores. Últimamente, mediante el empleo de técnicas de microarray se ha comparado el nivel de expresión de cientos de genes en todas las formas histopatológicas de cáncer testicular con la tasa de expresión en tejidos testiculares normales ^[86, 87]. Estos análisis permitieron identificar grupos de genes que aparecen sistemáticamente sobreexpresados y subexpresados en todas las formas de TCGT y también genes que siguen un programa variable de expresión que tiene una buena correspondencia con las formas histopatológicas de cáncer testicular ^[87]. Dos ejemplos interesantes de estos genes de programa de expresión variable son TSPY, una familia de 30-35 copias de genes ligados al cromosoma Y asociados con gonadoblastomas, y glipican 3 (GPC3), un gen ligado al cromosoma X localizado cerca de la región que se supone que alberga un gen con predisposición a TCGT; estos dos genes aparecen sistemáticamente sobreexpresados en el CIS y se vuelven marcadamente subexpresados en seminomas, carcinomas embrionarios y no seminomas ^[87], Richard y Skotheim, datos no publicados). En el futuro, el análisis de la expresión génica en TCGT con y sin deleciones del AZF tal vez sirva para identificar grupos de genes que muestran transcripción diferencial en tumores con inestabilidad del cromosoma Y.

Agradecimientos

Esta investigación fue subvencionada con el subsidio PICT 12520/02 de la ANPCyT, Argentina. Agradecemos al Dr. G. Cabasutti del Servicio de Urología, Hospital General San Martín, La Plata, Argentina por proporcionar muestras tumorales y no tumora-

les de casos argentinos de TCGT. Agradecemos a R. Lothe y R. Skotheim por los datos sobre la expresión

de los genes ligados al cromosoma Y y ligados al cromosoma X en los casos noruegos de TCGT.

Bibliografía

1. **N.O. Bianchi, S.M. Richard, P. Peltomaki, y col.** Mosaic AZF deletions and susceptibility to testicular tumors, *Mutat. Res.* 503 (2002) 51–62.
2. **B.T. Lahn, D.C. Page,** Functional coherence of the human Y chromosome, *Science* 278 (1997) 675–680.
3. **H. Skaletsky, T. Kuroda-Kawaguchi, P.J. Minx, y col.,** The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes, *Nature* 423 (2003) 825–837.
4. **T. Kuroda-Kawaguchi, H. Skaletsky, L.G. Brown, y col.,** The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men, *Nat. Genet.* 29 (2001) 279–286.
5. **S. Rozen, H. Skaletsky, J.D. Marszalek, y col.,** Abundant gene conversion between arms of palindromes in human and ape Y chromosomes, *Nature* 423 (2003) 873–876.
6. **B. Padhukasahasram, P. Marjoram, M. Nordborg,** Estimating the rate of gene conversion on human chromosome 21, *Am. J. Hum. Genet.* 75 (2004) 386–397.
7. **A.J. Jeffreys, C.A. May,** Intense and highly localized gene conversion activity in human meiotic crossover hot spots, *Nat. Genet.* 36 (2004) 114–115.
8. **F.R. Santos, M. Hutz, C.E.A. Coimbra, y col.,** Further evidence for the existence of a major founder Y chromosome haplotype in Amerindians, *Braz. J. Genet.* 18 (1995) 669–672.
9. **F.R. Santos, L. Rodríguez-Delfin, S.D.J. Pena, y col.,** North and South Amerindians may have the same major founder Y chromosome, *Am. J. Hum. Genet.* 58 (1996) 1369–1370.
10. **P.A. Callinan, D.J. Hedges, A.H. Salem, y col.,** Comprehensive analysis of Alu-associated diversity on the human sex chromosomes, *Gene* 37 (2003) 103–110.
11. **C. Sun, H. Skaletsky, S. Rozen, y col.,** Deletion of azoospermia factor a (AZFa) region of human Y chromosome caused by recombination between HERV15 proviruses, *Hum. Mol. Genet.* 9 (2000) 2291–2296.
12. **R. Reijo, T.Y. Lee, P. Salo, y col.,** Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene, *Nat. Genet.* 10 (1995) 383–393.
13. **P.H. Vogt, A. Edelmann, S. Kirsch, y col.,** Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11, *Hum. Mol. Genet.* 5 (1996) 933–943.
14. **L. Stuppia, G. Calabrese, P. Franchi, y col.,** Widening of a Y chromosome interval-6 deletion transmitted from a father to his infertile son accounts for an oligozoospermia critical region distal to the RBM1 and DAZ genes, *Am. J. Hum. Genet.* 59 (1996) 1393–1395.
15. **L. Stuppia, V. Gatta, G. Mastroprimiano, y col.,** Clustering of Y chromosome deletions in subinterval E of interval 6 supports the existence of an oligozoospermia critical region outside the DAZ gene, *J. Med. Genet.* 34 (1997) 881–883.
16. **L. Stuppia, V. Gatta, G. Calabrese, y col.,** A quarter of men with idiopathic oligozoospermia display chromosomal abnormalities and microdeletions of different types in interval 6 of Yq11, *Hum. Genet.* 102 (1998) 566–570.
17. **J.L. Pryor, M. Kent-First, A. Muallem, y col.,** Microdeletions of the Y chromosome of infertile men, *N. Engl. J. Med.* 336 (1997) 534–539.
18. **C. Foresta, A. Ferlin, A. Garolla, y col.,** High frequency of well-defined Y-chromosome deletions in idiopathic Sertoli cell-only syndrome, *Hum. Reprod.* 13 (1998) 302–307.
19. **M. Kent-First, A. Muallem, J. Shultz, y col.,** Defining regions of the Y-chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y-chromosome microdeletion detection, *Mol. Reprod. Dev.* 53 (1999) 27–41.
20. **I. Seifer, S. Amat, P. Delgado-Viscogliosi, y col.,** Screening for microdeletions on the long arm of

- chromosome Yin 53 infertile men, *Int. J. Androl.* 22 (1999) 148–154.
21. **K. McElreavey, C. Krausz**, Sex chromosome genetics 99: male infertility and the Y chromosome, *Am. J. Hum. Genet.* 64 (1999) 928–933.
 22. **L. Tiepolo, O. Zuffardi**, Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm, *Hum. Genet.* 34 (1976) 119–124.
 23. **C. Kamp, P. Hirschmann, H. Voss, y col.**, Two long homologous retroviral sequence blocks in proximal Yq11 cause AZFa microdeletions as a result of intrachromosomal recombination events, *Hum. Mol. Genet.* 9 (2000) 2563–2572.
 24. **C.A. Sargent, C.A. Boucher, S. Kirsch, y col.**, The critical region of overlap defining the AZFa male infertility interval of proximal Yq contains three transcribed sequences, *J. Med. Genet.* 36 (1999) 670–677.
 25. **S. Repping, H. Skaletsky, J. Lange, y col.**, Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure, *Am. J. Hum. Genet.* 71 (2002) 906–922.
 26. **A. Ferlin, E. Moro, A. Rossi, y col.**, The human Y chromosome's azoospermia factor b (AZFb) region: sequence, structure, and deletion analysis in infertile men, *J. Med. Genet.* 40 (2003) 18–24.
 27. **M. Aho, K. Harkönen, A.M. Suikkari, y col.**, Y-chromosomal microdeletions among infertile Finnish men, *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 80 (2001) 652–656.
 28. **C. Krausz, E. Rajpert-De Meyts, L. Frydelund-Larsen, y col.**, Double-blind Y chromosome microdeletion analysis in men with known sperm parameters and reproductive hormone profiles: microdeletions are specific for spermatogenic failure, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 (2001) 2638–2642.
 29. **S. Repping, H. Skaletsky, L. Brown, y col.**, Polymorphism for a 1.6-Mb deletion of the Y chromosome persists through balance between recurrent mutation and haploid selection, *Nat. Genet.* 35 (2003) 247–251.
 30. **S. Repping, S.K.M. van Daalen, C.M. Korver, y col.**, A family of human Y chromosomes has dispersed throughout northern Eurasia despite a 1.8-Mb deletion in the azoospermia factor c region, *Genomics* 83 (2004) 1046–1052.
 31. **K.L. Nathanson, P.A. Kanetsky, R. Hawes, y col.**, International Testicular Cancer Linkage Consortium, The Y deletion gr/gr confers susceptibility to testicular germ cell cancer, *Congress of The American Society of Human Genetics* (2004)..
 32. **R. Jacobsen, E. Bostofte, G. Engholm, y col.**, Fertility and offspring sex ratio of men who develop testicular cancer: a record linkage study, *Hum. Reprod.* 15 (2000) 1958–1961.
 33. **H. Moller, N.E. Skakkebaek**, Risk of testicular cancer in subfertile men: case-control study, *Br. Med. J.* 318 (1999) 559–562.
 34. **A. de la Chapelle**, Disease gene mapping in isolated human populations: the example of Finland, *J. Med. Genet.* 30 (1993) 857–865.
 35. **R. Norio**, The Finnish Disease Heritage I: characteristics, causes, background, *Hum. Genet.* 112 (2003) 441–456.
 36. **R. Norio**, The Finnish Disease Heritage II: population prehistory and genetic roots of Finns, *Hum. Genet.* 112 (2003) 457–469.
 37. **R. Norio**, The Finnish Disease Heritage III: the individual diseases, *Hum. Genet.* 12 (2003) 470–526.
 38. **T. Podar, A. Solntsev, M. Karvonen, y col.**, Increasing incidence of childhood-onset type I diabetes in 3 Baltic countries and Finland 1983–1998, *Diabetologia* 44 (Suppl. 3) (2001) B17–B20.
 39. **A.F. Vuorio, K. Aalto-Setälä, U.M. Koivisto, y col.** Finnish F-H group, *Ann. Med.* 33 (2001) 410–421.
 40. **R.A. Kittles, M. Perola, L. Peltonen, y col.**, Dual origins of Finns revealed by Y chromosome haplotype variation, *Am. J. Hum. Genet.* 62 (1998) 1171–1179.
 41. **P. Lahermo, M.L. Savontaus, P. Sistonen, y col.**, Y chromosomal polymorphisms reveal founding lineages in the Finns and the Saami, *Eur. J. Hum. Genet.* 7 (1999) 447–458.
 42. **M. Raitio, K. Lindroos, M. Laukkanen, y col.**, Y chromosomal SNPs in Finno-Ugric-speaking populations analyzed by minisequencing on microarrays, *Genome Res.* 11 (2001) 471–482.
 43. **Chromosome Consortium**, A nomenclature system for the tree of human Y-chromosomal bina-

- ry haplogroups, *Genome Res.* 12 (2002) 339–348.
44. **M.A. Jobling, V. Samara, A. Pandya, y col.,** Recurrent duplication and deletion polymorphisms on the long arm of the Y chromosome in normal males, *Hum. Mol. Genet.* 5 (1996) 1767–1775.
 45. **S.M. Richard, N.O. Bianchi, M.S. Bianchi, y col.,** Ethnic variation in the prevalence of AZF deletions in testicular cancer, *Mutat. Res.* 554 (2004) 45–51.
 46. **L. Freydelun-Larsen, P.H. Vogt, H. Leffers, y col.,** No AZF deletion in 160 patients with testicular germ cell neoplasia, *Mol. Hum. Reprod.* 9 (2003) 517–521.
 47. **M.F. Lutke-Holzik, K. Storm, R.H. Sijmons, y col.,** Absence of constitutional Y chromosome AZF deletions in patients with testicular germ cell tumors, *Urology* 65 (2005) 196–201.
 48. **H.O. Adami, R. Bergstrom, M. Mohner, y col.,** Testicular cancer in nine northern European countries, *Int. J. Cancer* 59 (1994) 33–38.
 49. **L. Richiardi, R. Bellocco, H.O. Adami, y col.,** Testicular cancer incidence in eight northern European countries: secular and recent trends, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13 (2004) 2157–2166.
 50. **A. McLaren,** Germ and somatic cell lineages in the developing gonad, *Mol. Cell. Endocrinol.* 163 (2000) 3–9.
 51. **N. Jorgensen, E. Rajpert-De Meyts, N. Graem, y col.,** Expression of immunohistochemical markers for testicular carcinoma in situ by normal human fetal germ cells, *Lab. Invest.* 72 (1995) 223–231.
 52. **R.I. Skotheim, R.A. Lothe,** The testicular germ cell tumour genome, *APMIS* III (2003) 136–151.
 53. **M.G. Hull, C.M. Glazener, N.J. Kelly, y col.,** Desai, Population study of causes, treatment, and outcome of infertility, *Br. Med. J.* 291 (1985) 1693–1697.
 54. **A. Collick, J. Drew, J. Penberth, y col.,** Reik, Instability of long inverted repeats within mouse transgenes, *EMBO J.* 15 (1996) 1163–1171.
 55. **D.A. Gordenin, M.A. Resnick,** Yeast ARMs (DNA at-risk motifs) can reveal sources of genome instability, *Mutat. Res.* 400 (1998) 45–58.
 56. **E. Akgün, J. Zahn, S. Baumes, y col.,** Palindrome resolution and recombination in the mammalian germ line, *Mol. Cell. Biol.* 17 (1997) 5559–5570.
 57. **S. Lewis, E. Akgün, M. Jasin,** Palindromic, DNA and genome stability. Further studies, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 870 (1999) 45–57.
 58. **B.M. Colls, V.J. Harvey, L. Shalton, y col.,** Bilateral germ cell testicular tumors in New Zealand: experience in Auckland and Christchurch, *J. Clin. Oncol.* 7 (1996) 2061–2065.
 59. **D.J.A. Sonneveld, H. Schraffordt Koops, D.T. Sleijfer, y col.,** Bilateral testicular tumors in patients with initial stage I disease: prevalence and prognosis: a single centre 30 years' experience, *Eur. J. Cancer* 34 (1998) 1363–1367.
 60. **D.J. Sonneveld, D.T. Sleijfer, H. Schrafford Koops, y col.,** Familial testicular cancer in a single-centre population, *Eur. J. Cancer* 35 (1999) 1368–1373.
 61. **R.T.D. Oliver,** Current opinion in cancer 2000, *Curr. Opin. Oncol.* 12 (2000) 249–254.
 62. **Y. Kuroki, T. Iwamoto, J. Lee, y col.,** Spermatogenic ability is different among males in different Y chromosome lineages, *J. Hum. Genet.* 44 (1999) 289–292.
 63. **E.A. Rapley, G.P. Crockford, D. Hamoudi, y col.,** Localization to Xq27 of a susceptibility gene for testicular germ-cell tumors, *Nat. Genet.* 24 (2000) 197–200.
 64. **R. Bergström, H.O. Adami, M. Mohner, y col.,** Increase in testicular cancer incidence in six European countries: a birth cohort phenomenon, *H. Natl. Cancer Inst.* 88 (1996) 727–733.
 65. **S.S. Devesa, W.J. Blot, B.J. Stone, y col.,** Recent cancer trends in the United States, *J. Natl. Cancer Inst.* 87 (1995) 175–182.
 66. **A. Ekbohm, O. Akre,** Increasing incidence of testicular cancer birth cohort effects, *APMIS* 106 (1998) 225–229.
 67. **K. Czene, P. Lichtenstein, K. Hemminki,** Environmental and heritable causes of cancer among 9.6 million individuals in the Swedish Family-Cancer Database, *Int. J. Cancer* 99 (2002) 260–266.
 68. **D.W. Nebert, R.A. McKinnon, A. Puga,** Human drug-metabolizing enzyme polymorphisms: effects on risk of toxicity and cancer, *DNA Cell Biol.* 15 (1996) 273–280.
 69. **K. Vistisen, S. Loft, J.H. Olsen, y col.,** Low CYP1A2 activity associated with testicular cancer,

- Carcinogenesis 25 (2004) 923–929.
70. **S. Garte, L. Gaspari, A.K. Alexandrie, y col.,** Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 10 (2001) 1239–1248.
 71. **K. Vistisen, H. Prieme, H. Okkels, y col.,** Genotype and phenotype of glutathione S-transferase mu in testicular cancer patients, *Pharmacogenetics* 7 (1997) 21–25.
 72. **P. Peltomäki,** Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer, *J. Clin. Oncol.* 21 (2003) 1174–1179.
 73. **R.A. Lothe, P. Peltomäki, N. Tommerup, y col.,** Molecular genetic changes in human male germ cell tumors, *Lab. Invest.* 73 (1995) 606–614.
 74. **R.A. Huddart, R. Wooster, A. Horwich, y col.,** Microsatellite instability in human testicular germ-cell tumours, *Br. J. Cancer* 72 (1995) 642–645.
 75. **A. Velasco, E. Riquelme, M. Schultz, y col.,** Mismatch repair gene expression and genetic instability in testicular germ cell tumor, *Cancer Biol. Ther.* 3 (2004) 977–982.
 76. **R.C. Boland, S.N. Thibodeau, S.R. Hamilton, y col.,** in: *Proceedings of the National Cancer Institute Workshop on the Microsatellite Instability for Cancer Detection and Familial Predisposition: Development of International Criteria for the Determination of Microsatellite Instability in Colorectal Cancer*, *Cancer Res.* 58 (1998) 5248–5257.
 77. **S.M. Richard,** Análisis de inestabilidad genómica en tumores de testículo humano, *Doctoral Thesis*, 2004, pp. 1–94.
 78. **S.D. Fossa, J.M. Nesland, E.O. Petwersen, y col.,** DNA ploidy in primary testicular cancer, *Br. J. Cancer* 64 (1991) 948–952.
 79. **W.E. de Graaff, J.W. Oosterhuis, B. de Jong, y col.,** Ploidy of testicular carcinoma in situ, *Lab. Invest.* 66 (1992) 166–168.
 80. **P. Peltomäki, R.A. Lothe, A.L. Borresen, y col.,** Chromosome 12 in human testicular cancer: dosage changes and their parental origin, *Cancer Genet. Cytogenet.* 64 (1992) 21–26.
 81. **E. Rodríguez, S. Mathew, V. Reuter, y col.,** Cytogenetic analysis of 124 prospectively ascertained male germ-cell tumors, *Cancer Res.* 52 (1992) 2285–2291.
 82. **C. Rosenberg, R.J. Van Gurp, E. Geelen, y col.,** Overrepresentation of the short arm of chromosome 12 is related to invasive growth of human testicular seminomas and nonseminomas, *Oncogene* 19 (2000) 5858–5862.
 83. **L.B. Travis, R.E. Curtis, H. Storm, y col.,** Risk of second malignant neoplasms among long-term survivors of testicular cancer, *J. Natl. Cancer Inst.* 89 (1997) 1429–1439.
 84. **S.M. Richard, S. Knuutila, P. Peltomäki, y col.,** Y chromosome instability in lymphoproliferative disorders, *Mutat. Res.* 525 (2003) 103–107.
 85. **J. Linke, V. Loy, K.P. Dieckmann,** Prevalence of testicular intraepithelial neoplasia in healthy males, *J. Urol.* 173 (2005) 1577–1579.
 86. **R.I. Skotheim, V.M. Abeler, J.M. Nesland, y col.,** Lothe, Candidate genes for testicular cancer evaluated by in situ protein expression analyses on tissue microarrays, *Neoplasia* 5 (2003) 397–404.
 87. **R.I. Skotheim, G.E. Lind, O. Monni, y col.,** Differentiation of human embryonal carcinoma, in vitro and in vivo, reveals expression profiles relevant to normal development, *Cancer Res.* 65 (2005) 5588–5598.