

## **Estudio preliminar de prevalencia de deleciones parciales de la región AZFc del cromosoma Y como factor de riesgo de cáncer testicular de células germinales en pacientes chilenos.**

*Preliminary study of the prevalence of partial deletions of the AZFc region of the Y chromosome as a risk factor for testicular germ cell cancer in Chilean patients.*

**Autores:** Andrés Benítez-Filselcker<sup>1</sup>, Diego González Pellegrino<sup>2</sup>, Anna Arias-Medling<sup>3</sup>, Cristóbal Ávila<sup>1</sup>, Nicolás Sáez Cortez<sup>4</sup>, Pedro Luengo<sup>5</sup>, Cecilia Lardone<sup>6</sup>, Marina Diaz-Fontdevila<sup>7</sup>, Mauricio Ebensperger<sup>8</sup>, Juan Carlos Román<sup>9</sup>, Cristián Palma<sup>10</sup>, Andrea Castro<sup>11</sup>.

1. Residente de Urología, Universidad de Chile, Santiago, Chile; 2. Urólogo, Hospital Clínico San Borja Arriarán, Santiago, Chile, 3. Tecnólogo Médico, MSc, Instituto de Investigaciones Materno Infantil, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. 4. Urólogo-Andrólogo Red Salud - Hospital San José. 5. 6. Bioquímica, PhD, Profesora Asistente U. Chile, Instituto de Investigaciones Materno Infantil, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. 7. Bioquímica, PhD, Profesora Adjunta U. Chile, Instituto de Investigaciones Materno Infantil, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. 8. Urólogo, MSc. Profesor Asistente U Chile, Hospital Clínico San Borja Arriarán, Santiago, Chile, 9. Urólogo, Instituto Nacional del Cáncer. 10. Urólogo-Andrólogo, Hospital Clínico Universidad de Chile. 11. Bióloga, MSc, Profesora Asociada U Chile, Instituto de Investigaciones Materno Infantil, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

### **Resumen:**

**Introducción:** El cáncer testicular de células germinales (TTCG) es la neoplasia maligna más frecuente en hombres jóvenes. Su etiología es multifactorial y el componente genético familiar aumenta el riesgo 6–10 veces. Variantes en genes reguladores de la diferenciación germinal y del cromosoma Y, especialmente en la región AZFc, se asocian a seminoma e infertilidad. En Chile, pese a la alta incidencia de TTCG, se desconoce la prevalencia de estas deleciones. **Material y Métodos:** En este estudio preliminar se analizó la frecuencia de Delp-AZFc en 92 pacientes con TTCG y 145 controles normozoospermicos sin infertilidad, criptorquidia ni cáncer testicular. Las deleciones se detectaron mediante PCR con partidores sY1291 (*gr/gr*), sY1191 (*b2/b3*), sY1161 y sY1197 (*b1/b3*). Todos los participantes otorgaron consentimiento informado aprobado por comités de ética institucionales. **Resultados:** La histología tumoral correspondió a seminoma (29%), no seminoma (34%), mixto (18%) y carcinoma intratubular (2%); 19,5 % fue bilateral (tres sincrónicos). La prevalencia de Delp-AZFc fue 4,3 % en casos y 2,1 % en controles ( $p \geq 0,05$ ). En tumores bilaterales fue 5,6 %, sin diferencias significativas respecto de controles ni por tipo de deleción (*gr/gr*, *b2/b3*). **Conclusiones:** No se observaron asociaciones significativas entre Delp-AZFc y TTCG o su bilateralidad. Estos resultados preliminares corresponden a la primera cohorte chilena en curso ( $n \approx 130$  casos proyectados) y servirán para definir el valor predictivo de AZFc como biomarcador de susceptibilidad tumoral.

**Palabras clave:** cáncer testicular, células germinales, deleción parcial\_AZFc, cromosoma Y, susceptibilidad genética.

## Abstract

**Introduction:** Testicular germ cell tumor (TGCT) is the most common malignant neoplasm in young men. Its etiology is multifactorial, and familial genetic factors increase risk by 6–10-fold. Variants in genes regulating germ cell differentiation and Y-chromosome deletions, particularly within the AZFc region, have been associated with seminoma and infertility. In Chile, despite a high TGCT incidence, the prevalence of these deletions remains unknown. **Material and methods:** In this preliminary study, we analyzed the frequency of partial AZFc deletions (Delp-AZFc) in 92 TGCT patients and 145 normozoospermic controls without infertility, cryptorchidism, or testicular cancer. Deletions were detected by PCR using diagnostic primers sY1291 (gr/gr), sY1191 (b2/b3), sY1161, and sY1197 (b1/b3). All participants provided informed consent under institutional ethics committee approval. **Results:** Tumor histology included seminoma (29%), non-seminoma (34%), mixed (18%), and intratubular carcinoma (2%); 19.5% were bilateral (three synchronous). The prevalence of Delp-AZFc was 4.3% in cases and 2.1% in controls ( $p \geq 0.05$ ). Among bilateral tumors, Delp-AZFc frequency was 5.6%, with no significant differences compared with controls or by deletion subtype (gr/gr, b2/b3). **Conclusions:** No significant associations were found between Delp-AZFc and TGCT or its bilaterality. These preliminary findings represent the first Chilean cohort under study ( $n \approx 130$  cases projected) and will help determine the predictive value of AZFc as a biomarker of tumor susceptibility.

**Keywords:** testicular cancer, germ cells, partial AZFc deletion, Y chromosome, genetic susceptibility.

## Introducción

El cáncer testicular es la neoplasia maligna más común en hombres jóvenes, especialmente entre los 15 y 44 años, con una incidencia creciente a nivel mundial (1–3). En Chile, presenta una de las tasas más altas de Sudamérica, alcanzando 11 por 100.000 habitantes mayores de 15 años, con variaciones regionales (4–6). En estadísticas del Complejo Asistencial Barros Luco Trudeau, 92% de los tumores testiculares fueron unilaterales y 8% bilaterales (64% asincrónicos, 36% sincrónicos), siendo 97,1% tumores de células germinales: seminoma (57%), no seminoma (28%) y mixto (14%) (4).

El tratamiento estándar es la orquiectomía inmediata, seguida de quimio y/o radioterapia según extensión tumoral, pudiendo la quimioterapia afectar transitoriamente la espermatogénesis con azoospermia reversible en 2 a 5 años en la mayoría de los casos (7,8). Entre los principales factores de riesgo destacan la criptorquidia, la infertilidad, la etnicidad y los antecedentes familiares de cáncer testicular (9,10). Estas condiciones, junto a la falla espermatogénica primaria, se consideran manifestaciones del síndrome de disgenesia testicular, de base genética y/o ambiental (11).

Estudios del cromosoma Y en población europea han asociado delecciones del brazo

largo (Yq) tanto a infertilidad como a TTCG (12,13). Las microdeleciones del cromosoma Y (MDY) son la causa genética más frecuente de infertilidad secretora de origen primario (14). La región no recombinante MSY contiene secuencias amplicónicas altamente homólogas propensas a recombinaciones que originan deleciones AZF (15–17).

Dentro de estas, la deleción gr/gr se ha asociado a mayor riesgo de falla espermatogénica primaria (18) y TTCG (12,13). Dicha deleción comprende la eliminación de copias de genes testículo-específicos como DAZ, CDY1, BPY2 y PRY (20). Respecto a otros tipos de deleciones parciales (b2/b3 y b1/b3) existe menor o casi nula información sobre su relevancia.

Si bien estudios en poblaciones europeas confirman la asociación entre deleciones parciales AZFc y TTCG (12,13,21,22) no existen antecedentes en población chilena. Por ello, este estudio busca analizar la incidencia de Delp-AZFc y su posible rol como biomarcador de riesgo de TTCG, caracterizando por tipo y lateralidad tumoral en una cohorte inicial de 92 pacientes, con proyección a 130 casos para análisis ampliado que incorporará análisis de antecedentes familiares, criptorquidia e infertilidad previos a la neoplasia.

**Hipótesis de trabajo:** Las deleciones parciales gr/gr del cromosoma Y presentan una mayor incidencia en hombres chilenos con historia de tumor testicular de células germinales comparado a hombres chilenos normozoospermicos sanos.

#### **Objetivos específicos;**

- 1) Determinar la presencia de deleciones parciales de AZFc en pacientes chilenos con antecedentes de TTCG (casos) en DNA obtenido de sangre periférica respecto de 145 controles normozoospermicos previamente estudiados.
- 2) Determinar posibles diferencias de prevalencia de las deleciones parciales de AZFc de acuerdo a la lateralidad tumoral y tipos histológicos tumorales observados entre los casos.

#### **Material y Métodos**

##### Sujetos:

Los pacientes con cáncer testicular de células germinales (TTCG) fueron reclutados en el

Laboratorio de Andrología Clínica y la Unidad de Andrología Molecular y Reproductiva (IDIMI), a partir de consultas por criopreservación espermática, análisis seminales, y desde el Hospital Clínico San Borja Arriarán (HCSBA) y el Instituto Nacional del Cáncer (INC), donde recibían o habían recibido tratamiento por TTCG. Un porcentaje menor fue derivado directamente por su médico tratante a la UAMR para su incorporación al estudio (Tabla 1).

**Tabla 1. Procedencia de los pacientes con TTCG**

Recinto	N° Casos (porcentaje)
IDIMI	48 (52,2%)
HCSBA	27 (31,5%)
HPH	1 (1,1%)
HCUCH	4 (4,4%)
INC	6 (6,5%)
HSVT	2 (2,2%)
HPSB	1 (1,1%)
FALP	1 (1,1%)

IDIMI: Instituto de Investigaciones Materno Infantil; HCSBA: Hospital Clínico San Borja Arriarán; HPH: Hospital Padre Hurtado; HCUCH: Hospital Clínico Universidad de Chile (J.J. Aguirre); INC: Instituto Nacional del Cáncer; HSVT: Hospital San Vicente de Tagua Tagua; HPSB: Hospital Parroquial de San Bernardo; FALP: Fundación Arturo López Pérez.

Todos los participantes firmaron consentimiento informado aprobado por el Comité Ético de Investigación en Seres Humanos (CEISH) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, el Comité Ético Científico del Servicio de Salud Metropolitano Central (CEC-SSMC) y los comités científicos del HCSBA e INC.

Cada paciente completó un cuestionario en línea y proporcionó antecedentes clínicos relevantes: informe histopatológico, marcadores tumorales pre y postoperatorios, tomografía computarizada (TAC) e información adicional necesaria para la etapificación tumoral (AJCC, 8ª edición). Asimismo, se recopilaban datos de exámenes seminales realizados antes de la orquitectomía o de la quimioterapia.

El grupo control incluyó 145 hombres normozoospermicos previamente estudiados,

definidos según criterios de la OMS (2021), sin antecedentes de infertilidad, criptorquidia, testículo en ascensor, cáncer o enfermedades crónicas.

#### Detección de Delp-AZFc:

Las deleciones parciales de AZFc se determinaron mediante PCR (simple y múltiple) con *sequence-tagged sites* (STS) específicos de la región AZFc. La ausencia de amplificación de los marcadores sY1291 (*gr/gr*), sY1191 (*b2/b3*) y sY1161-sY1197 (*b1/b3*) definió los distintos tipos de Delp-AZFc (20, 23). Los controles fueron analizados con la misma metodología y marcadores validados.

#### Análisis estadístico:

Los datos fueron procesados con SPSS v30. Se evaluaron proporciones mediante la prueba de Chi-cuadrado, comparando la frecuencia total de Delp-AZFc y de sus subtipos (*gr/gr*, *b1/b3*, *b2/b3*) entre casos y controles, así como su relación con variables histológicas, de lateralidad y fertilidad

### **Resultados**

Se analizaron 92 pacientes en el grupo TTCG y 145 en el grupo control. La media de edad al momento del primer (en los bilaterales) o único diagnóstico de TTCG, fue de  $29 \pm 8$  años de edad (media  $\pm$  DE), y en los controles de  $27 \pm 9$  años de edad al momento de reclutar. Entre los Casos pesquizamos antecedentes de infertilidad previa en el 29% de los pacientes (12/40) y/o un 34% de recuento seminal de espermatozoides  $\leq 5 \cdot 10^6$  millones/ml (16/47), por lo que se realizó el estudio estándar de MDY, sin observar resultados positivos de deleciones clásicas del cromosoma Y, y procediendo al estudio de Delp-AZFc.

Respecto a la histopatología tumoral, dichos informes fueron recabados en el 80% (n=74) de los pacientes. El 20% (n=18) restante tenía historia clínica de orquiectomía por TTCG, pero no contaba con informe histopatológico o tenía solo biopsia testicular con NGCIS (n=2). Las histologías tumorales obtenidas de los informes de anatomía patológica fueron: seminoma (n=27), no seminoma (n=31, 15 mixtos), mixto (n=17) o carcinoma intratubular (GCNIS, n=2), y donde 19,5% (18/92) fue bilateral (3 sincrónicos).

La prevalencia de delp-AZFc en los casos se muestra en la Tabla 2. No observamos diferencias significativas entre casos y controles ( $P \geq 0,05$ ,  $\chi^2$ ), ya sea en el total de las Delp-AZFc (2,1% versus 4,6%) o al separar por los tipos *gr/gr* y *b2/b3* observados (5,6% versus 0,7%) o *b2/b3* (1,1% versus 1,4%).

**Tabla 2. Deleciones parciales de AZFc en Pacientes con diagnóstico de tumor testicular de células germinales**

DelP-AZFc	Casos (n=92)	Controles (n=145)
b2/b3	1 (1,1%)	2 (1,4%)
gr/gr	3(3,3%)	1 (0,7%)
Total	4 (4,3%)	3 (2,1%)

En el grupo de Casos con TTCG bilateral (Tabla 3) observamos un paciente con DelP-AZFc (gr/gr), lo que tampoco mostró diferencia estadística respecto del grupo control, tanto en el total de las DelP-AZFc (5,6% versus 2,1%) como en las deleciones gr/gr (5,6% versus 0,7%). Cabe destacar que este paciente tenía historia de TTCG bilateral asincrónico con historia previa de fertilidad, y sin historia de familiares de primer grado con cáncer testicular. La neoplasia asincrónica tuvo una diferencia de 6 años entre cada orquiectomía. El tipo histológico tumoral en ambos testículos fue de seminoma clásico puro, etapificación: pT1b (ambos primarios) ycTX ycN0 cM0 S0 → en remisión (continúa vigilancia) y sin historia andrológica relevante, como criptorquidia o testículo en ascensor.

Entre los 2 casos con TTCG unilateral y deleción gr/gr, la histología tumoral correspondió a no seminomas mixtos: 1) carcinoma embrionario (45%) / teratoma maduro (45%) / tumor de saco vitelino (10%) y 2) teratoma y carcimoma embrionario etapa III. Los pacientes no mostraron antecedentes andrológicos relevantes o historia familiar de TTCG en familiares de primer grado.

El paciente con TTCG unilateral que presentó deleción b2/b3 tampoco tenía historia de infertilidad o antecedentes andrológicos relevantes y había presentado un seminoma clásico puro unilateral de etapa IS (pT1b N0 M0 S1).

**Tabla 3. Deleciones parciales de AZFc en pacientes con diagnóstico de tumor testicular de células germinales clasificados según lateralidad/temporalidad**

DelP-AZFc	Controles (n=145)	Casos (n=92)			
		Bilaterales (n=18)	Bilaterales asincrónicos (n=15)	Bilaterales sincrónicos (n=3)	unilaterales (n=74)
gr/gr	3 (2,1%)	1 (5,6%)	1 (6,7%)	0	3 (4%)
b2/b3	1 (0,7%)	1 (5,6%)	1 (6,7%)	0	2 (2,7%)
Sin del_Y	2 (1,4%)	0	0	0	1 (1,4%)
	142 (97,9%)	17 (94%)	14 (93%)	3 (100%)	71

## Discusión y conclusiones

El TTCG es una neoplasia maligna en alza y es más frecuente en hombres en edad reproductiva (1-6). Su etiología es multifactorial y asociada a múltiples factores ambientales y genéticos, Diversos estudios sugieren la participación de variantes de genes reguladores de la diferenciación germinal y de la región AZFc del cromosoma Y. La delección gr/gr es uno de los polimorfismos de relevancia en Europa y Chile debido a su amplia asociación al deterioro espermatoagénico (20, 23, 24).

Estudios en población europea han demostrado la relación entre la delección gr/gr y el riesgo de TTCG, en sujetos con patrón seminal normal, con o sin historia familiar de TTCG (12, 13, 21, 22), representando un factor de riesgo de 4,1 veces para el desarrollo de seminoma, respecto de controles normozoospermicos, instando al seguimiento de familiares de pacientes con cáncer testicular y delección gr/gr (21, 22). En línea con lo anterior, en el presente estudio la mitad de los pacientes con delecciones gr/gr presentaba seminoma puro (2 gr/gr) o no seminoma (1 gr/gr y 1 b2/b3) sin antecedentes de infertilidad u otros asociados, tal como criptorquidia. Por lo tanto, sugerimos realizar el estudio de pacientes con TTCG de histología conocida y de grupos lo suficientemente homogéneos y bien caracterizados. Cabe destacar que en relación al posible riesgo de criptorquidia el estudio de Giachini y cols. (18) evaluó el papel de la delección gr/gr en la etiopatogenia de la criptorquidia sin observar asociación.

Concluimos que realizar estudios detallados en pacientes chilenos con TTCG permitirá avanzar en el conocimiento genético de mayor susceptibilidad de nuestra población.

## Referencias

1. Baird DC et al. Testicular cancer: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician*. 2018;97(4):261–8.
2. Bray F et al. Trends in testicular cancer incidence and mortality in 22 European countries. *Int J Cancer*. 2006;118(11):3099–111.
3. Trabert B et al. International patterns and trends in testicular cancer incidence, 1973–2007. *Andrology*. 2015;3(1):4–12.
4. Rojas C et al. Cáncer de testículo: características e incidencia en el Hospital Barros Luco Trudeau 2002–2008. *Rev Chil Urol*. 2009;74:15–9.

5. Riveri R et al. Diez años de cáncer de testículo en la provincia de Ñuble (1995–2004). *Rev Chil Urol.* 2006;71:205–8.
6. Gorená M et al. Perfil clínico y epidemiológico del cáncer testicular en la IX región. *Rev Chil Urol.* 2003;68:78–82.
7. Smith ZL et al. Testicular cancer: epidemiology, diagnosis, and management. *Med Clin North Am.* 2018;102(2):251–64.
8. De Toni L et al. Testicular cancer: genes, environment, hormones. *Front Endocrinol.* 2019;10:408.
9. Looijenga L et al. Etiology and early pathogenesis of malignant testicular germ cell tumors. *Asian J Androl.* 2015;17(3):381–9.
10. Negri L et al. Cancer risk in male factor infertility. *Placenta.* 2008;29(Suppl B):178–83.
11. Skakkebaek NE et al. Testicular dysgenesis syndrome. *Horm Res Paediatr.* 2003;60(3):49–54.
12. Nathanson KL et al. The Y deletion gr/gr and susceptibility to testicular germ cell tumor. *Am J Hum Genet.* 2005;77(6):1034–43.
13. Linger R et al. A physical analysis of the Y chromosome shows no additional deletions, other than gr/gr, associated with TGCT. *Br J Cancer.* 2007;96(2):357–61.
14. Ferlin A et al. Molecular and clinical characterization of Y-chromosome microdeletions in infertile men: a 10-year experience in Italy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(3):762–70.
15. Skaletsky H et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature.* 2003;423(6942):825–37.

16. Lange J et al. Isodicentric Y chromosomes and sex disorders as byproducts of homologous recombination. *Cell*. 2009;138(5):855–69.
17. Castro A et al. Pseudoautosomal abnormalities in terminal AZFb+c deletions associated with isochromosomes Yp. *Hum Reprod*. 2017;32(2):465–75.
18. Giachini C et al. Partial AZFc deletions in infertile men with cryptorchidism. *Hum Reprod*. 2007;22(9):2398–403.
19. Kratz CP et al. Familial testicular germ cell tumours. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2010;24(3):503–13.
20. Repping S et al. Polymorphism for a 1.6-Mb deletion of the human Y chromosome. *Nat Genet*. 2003;35(3):247–51.
21. Moreno-Mendoza D et al. gr/gr deletion predisposes to testicular germ cell tumour independently from altered spermatogenesis: results from the largest European study. *Eur J Hum Genet*. 2019;27(10):1578–88.
22. Moreno-Mendoza D et al. Correction: gr/gr deletion predisposes to testicular germ cell tumour independently from altered spermatogenesis. *Eur J Hum Genet*. 2020;28(10):1476.
23. Lardone MC et al. Partial-AZFc deletions in Chilean men with primary spermatogenic impairment: gene dosage and Y-chromosome haplogroups. *J Assist Reprod Genet*. 2020;37(12):3109–19.
24. Kuroda-Kawaguchi T et al. The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and recurrent deletions in infertile men. *Nat Genet*. 2001;29(3):279–86.