

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina

División de Estudios de Postgrado e Investigación

Instituto Nacional de Cancerología

*El papel de XPA, ERCC1 y mtTFA en la supervivencia de pacientes
con tumores germinales de testículo tratados con cisplatino*

TESIS DE POSTGRADO

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN

ONCOLOGÍA MÉDICA

PRESENTA

Dr. Carlos Alberto Hernández Hernández

TUTOR

Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo

México DF a 27 de agosto del 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA.

Este trabajo de tesis esta dedicado a todos los que siempre han creído en mi esfuerzo, porque Dios no me doto con inteligencia pero lo hizo con fuerza de voluntad. Lo dedicó a mi padre Alberto por darme el ejemplo de siempre superarme con el estudio; a mi madre Gloria ya que sin su apoyo y su impulso nunca hubiera logrado nada en la vida; a mi esposa Olivia y mi hija Alondra (y por llegar en diciembre un hijo mas del fruto de nuestro amor) ya que con su amor incondicional he podido subir donde nadie creía, vencer las dificultades que la vida me ha puesto y luchar siempre por ser mejor cada día; a mis abuelos (Gudelia, Alicia, Félix y Leoncio) ya que con su recuerdo hace que me enorgullezca de mis orígenes; a mis tíos (Gustavo, Aurelia, Saula, Arturo, Reina, Felipe, Carmen, Mateo, Alicia, Leticia, Lucio, Evelio, Martha, Paulo etc., toda mi familia cercana y lejana) que con solo creer que puedo me han ayudado en lograr mis metas. A mis profesores Dra. Gallardo, Dr. Oscar Arrieta, Dr. Aguilar, Dr. Cedillo, Dr. Calderillo, Dr. Lara, Dra. Morales, Dra. Arce, Dr. Tlahuel, Dr. Castañeda, Dra. Delia Pérez, Dra. Cano, Dr. Zinser, sobre todo a mi tutor Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo que creyó en la propuesta inicial de trabajo y me dio una gran oportunidad en la vida. También no puedo olvidar a mis amigos Eli Omar Zavaleta, Zuilma, Karla Heredia, Claudia, Roberto Kuri, Alma Astorga, Marcela Ramírez, Miguel Álvarez, Pedro Figueroa, Andrés Morán, Felipe Sánchez, Omar Castillo, Rafael Morales, Daniel Mendoza y Jessica Reyes que siempre fueron para mi un ejemplo a seguir, un motivo mas para tratar de ser mejor que ellos cada día. En mi breve estancia en el Laboratorio de Investigación Básica conocí a un grupo diferente al gremio médico pero no menos importante ya que son el pilar de nuestras futuras aplicaciones en medicina por lo que les agradezco el haberme adoptado como uno mas de ellos, el haberme dado su apoyo incondicional, que me brindarán sus mejores deseos, que me ayudarán aunque fuera en la madrugada por lo que les agradezco Rodrigo, Diddier, Lisandro, Miguel, Eunice, Roxana (Bocha), Armando, Alex, Julieta, Marco, Clementina y Julia. Muchas Gracias a todos por creer en mi.

ÍNDICE

Resumen	1
Dedicatoria	2
Introducción	5
Pregunta de Investigación	10
Justificación	11
Objetivos	11
Hipótesis	12
Material y Métodos	14
Resultados	18
Discusión y conclusiones	22
Figuras	24
Referencias	32

Resumen

Antecedentes. El cáncer de células germinales (TCG) de testículo representa el 1% de todos los cánceres. El tratamiento de elección en estadios avanzados es la quimioterapia basada en cisplatino. Las proteínas reparadoras del ADN se han propuesto como una explicación a la sensibilidad de las células de los TCG al cisplatino, sensibilidad que se refleja en un incremento en la supervivencia de los pacientes tratados con este fármaco. Así mismo, la identificación de polimorfismos en los genes de reparación del ADN, principalmente de ERCC1, se ha relacionado con una disminución en la capacidad de reparación del ADN con una influencia directa en la supervivencia. En este trabajo se determinó la influencia de las proteínas reparadoras del ADN, las proteínas HMGB (mtTFA) y del polimorfismo *C8092A del gen ERCC1* con la supervivencia de pacientes con TCG tratados con cisplatino.

Material y métodos. Se realizó el cálculo de la muestra obteniéndose 47 pacientes. Se realizaron ensayos de inmunohistoquímica para detectar las proteínas ERCC1, XPA, mtTFA en laminillas de tejido neoplásico parafinado. Se determinó el polimorfismo C8092A del gen ERCC1 utilizando muestras de ADN aisladas de leucocitos de individuos sanos y tejido de TCG parafinado. **Resultados.** Se revisaron 450 expedientes de pacientes del año 2000-2003 de los cuales 58 cumplieron con los criterios de inclusión. La mediana de edad fue de 23 años. La frecuencia por estadificación fue del 40.3%, 7.5%, 32.8% y 38.8% para los estadios II, III y IV respectivamente. Las metástasis se presentaron más frecuentemente a nivel de retroperitoneo (89.7%), pulmón (34.5%), mediastino y ganglios (10.3%). Los pacientes eran de buen pronóstico en el 25.9%, pronóstico intermedio 36.2% y pobre pronóstico 37.9%. La mediana de supervivencia global fue de 60 meses. De la población estudiada, las muestras de 53 pacientes resultaron negativas para la proteína XPA y 4 fueron positivas ($p=0.041$) con una diferencia en la supervivencia. Las proteínas ERCC1 y mtTFA no influyeron en la supervivencia global en nuestro estudio. La frecuencia en la población mexicana del PM para el alelo C fue de 52.4% y para el alelo A 47.6%. **Conclusiones.** Es el primer estudio en evaluar las proteínas XPA, ERCC1 y mtTFA en pacientes con TCG tratados con cisplatino. Concluimos que la ausencia de la proteína XPA correlaciona con la sensibilidad a la quimioterapia basada en cisplatino en TCG y que esto conlleva a los pacientes a tener un mejor pronóstico en supervivencia. Las proteínas ERCC1 y mtTFA no se asociaron estadísticamente a la supervivencia. Por otro lado, no podemos tener conclusiones concretas acerca del polimorfismo C8092A del gen ERCC1 debido a que sólo se han genotipificado alrededor del 50% de las muestras totales.

INTRODUCCION

El cáncer de origen testicular representa el 1% de todos los cánceres en el hombre con una incidencia de 49.3/100 000 habitantes, y 8 890 nuevos casos en Estados Unidos de América. En México se presentaron 1 186 nuevos casos en el año 2002, con una incidencia de 2.4/100 000 habitantes. Además es la neoplasia más frecuente en menores de 45 años.^{1, 2} El 90% corresponde a tumores de células germinales (TCG)^{4, 5} los cuales, en forma convencional, se clasifican histológicamente como seminoma (TGS) y no seminoma (TGNS). Los principales factores de riesgo asociados a estos tumores son: niveles elevados de estrógenos *in utero*, familiares de primer grado de pacientes afectados (RR=6), criptorquidia (RR=10-40), virus de inmunodeficiencia humana (RR=1.8), testículo atrófico (RR=200). Las células del 100% de los TCG se caracterizan por la presencia del isocromosoma 12.⁵ Existen síndromes genéticos que se relacionan con los TCG siendo los más importantes el síndrome de Klinefelter, la disgenesia XY, y el síndrome de Down.

Los estadios I representan el 70% de todos los casos. El cuadro clínico se caracteriza principalmente por un incremento de volumen testicular (73%), dolor testicular (30%), ginecomastia, dolor lumbar (10%), infertilidad (5%) y sólo debutan con enfermedad metastásica un 10%. El diagnóstico se realiza con el reporte histopatológico (TGS y TGNS) y los marcadores tumorales: deshidrogenasa láctica (DHL), alfa feto proteína (AFP) y la fracción beta de la hormona gonadotropina coriónica humana (HGC-FB).⁶ Los estudios de gabinete utilizados para la estadificación son la tomografía computada (TC) abdominopélvica y telerradiografía de tórax. Existen varios sistemas de estadificación, los más utilizados son el sistema de Royal Marsden, el TNM (Tumor, Ganglios y Metástasis) por el Comité Americano de Cáncer. El tratamiento dependerá si se considera enfermedad temprana o avanzada. Sin embargo, el tratamiento inicial es la orquiectomía.

En 1997 se determinaron los factores pronósticos en estadios avanzados (II-IV) clasificándose como buen pronóstico, pronóstico intermedio y pobre pronóstico.⁷ (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación pronóstica del Grupo Colaborativo Internacional de Tumores de Células Germinales.⁷ Los TCG no seminomas se clasifican en buen pronóstico, pronóstico intermedio y pobre pronóstico. Los TCG seminomas solo se clasifican en buen pronóstico y pronóstico intermedio.

ESTADO DE RIESGO	NO SEMINOMA	SEMINOMA
PRONÓSTICO BUENO	Tumor testicular o retroperitoneal y metástasis viscerales pulmonares y AFP < 1000 ng/mL Fβ-HGC < 5000UI/L DHL < 1.5 veces su límite 56% de TGNS y SVG 5 años 92%	Cualquier sitio y metástasis pulmonares y AFP normal Cualquier determinación de Fβ-HGC y DHL 90% de TGS y SVG 5 años 86%
PRONÓSTICO INTERMEDIO	Tumor testicular o retroperitoneal y metástasis pulmonares y AFP 1000 -10,000 ng/mL Fβ-HGC 5000-50,000UI/L DHL 1.5-10 veces su límite 28% de TGNS y SVG 5 años 80%	Cualquier sitio y metástasis viscerales no pulmonares y AFP normal Cualquier determinación de Fβ-HGC y DHL 10% de TGS y SVG 5 años 72%
PRONÓSTICO POBRE	Tumor mediastinal o metástasis viscerales no pulmonares AFP > 10,000 ng/mL Fβ-HGC > 50,000UI/L DHL >10 veces su límite 16% de TGNS y SVG 5 años 48%	

El tratamiento en la enfermedad avanzada o metastásica es la quimioterapia, excepto en TGS estadios IIA-B en donde la radioterapia continúa teniendo un rol importante. Antes del tratamiento con quimioterapia el pronóstico de los pacientes era

deletéreo y a partir de 1970 con la introducción del cisplatino, específicamente en combinación con vincristina y bleomicina (PVB), la supervivencia a un año se incrementó al 95% y a 5 años entre 80-90%.⁸ En 1987 se comparó PVB versus bleomicina, etopósido y Platino (BEP) demostrándose un mejor perfil de toxicidad y supervivencia con BEP⁹ por lo que desde entonces se considera la terapia estándar en estadios II-IV. Sin embargo, a pesar del éxito obtenido con el cisplatino existe un 20-30% de pacientes que no responden por lo que se utilizan segundas líneas de tratamiento con respuestas globales del 23%.^{3, 8, 11, 12, 13}

Hasta el momento se desconoce el mecanismo exacto de quimiosensibilidad y quimioresistencia al cisplatino.¹⁴ El mecanismo de acción del cisplatino es su unión covalente al ADN ocasionando 3 tipos de daño: 1) monoadductos; 2) uniones entre la misma cadena; y 3) uniones entre cadenas del ADN. Estas uniones favorecen la ruptura de las cadenas y la apoptosis.^{15, 16, 17} (Fig. 1).

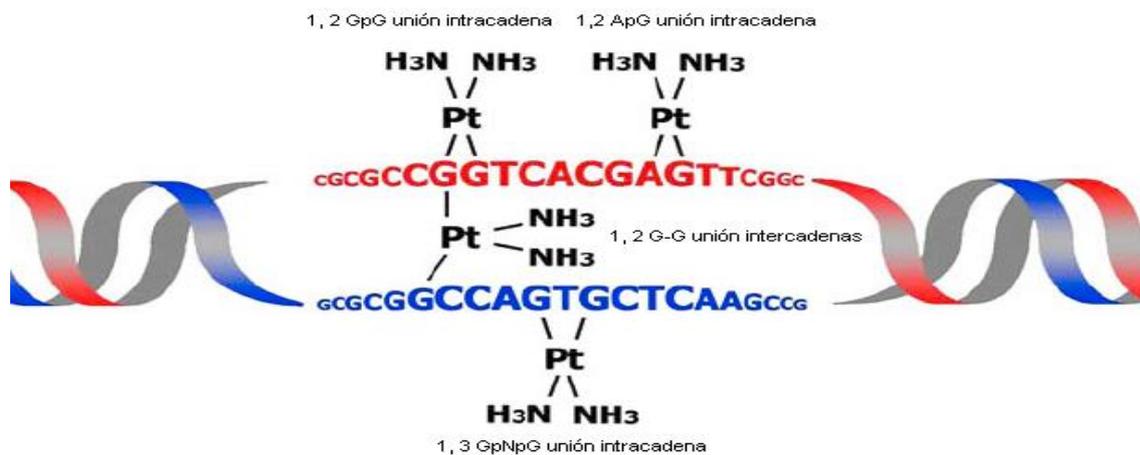


Figura 1. Tipos de uniones del Cisplatino-ADN. Intra cis G-G 65%, cis A-G 25%, cis GxG 5%. Inter cis G-C 5%.

Los principales mecanismos de resistencia asociada al cisplatino son: 1) incremento en la expulsión del fármaco de la célula tumoral por transportadores de membrana dependientes de ATP, como la glucoproteína p^{18, 19, 20, 21, 22} producto del gen de resistencia a multi-drogas (MDR-1), otros transportadores son proteínas relacionadas a la resistencia a multi-drogas (MRP-1 y 2) y proteínas relacionadas a resistencia pulmonar (LRP); 2) disminución de la entrada del fármaco (ej. pH ácido de las células tumorales);^{23, 24} 3) aumento en el metabolismo celular del fármaco

(incrementó de la glutatión-S-transferasa que conjuga al cisplatino);¹⁶ 4) alteración en los genes que regulan la apoptosis p53, Bcl-2, Bcl-X_L, BAX, RB, receptor Fas y ligando Fas (CD95 y CD95/L). Dichos mecanismos de resistencia no han sido corroborados en los estudios realizados en TCG.^{14, 25}

La sensibilidad de TCG al cisplatino está asociada con la disminución en la reparación del ADN. Se han encontrado más de 130 enzimas reparadoras que se encargan de la integridad del genoma.²⁶ Se pueden distinguir tres mecanismos de reparación por escisión: 1) reparación por escisión de bases (BER); 2) reparación por escisión de nucleótidos (NER); y reparación de bases mal apareadas (MMR).^{26, 27, 28}

La NER es la principal vía de reparación del daño al ADN ocasionado por el cisplatino. La NER consiste en: a) reconocimiento del daño del ADN a través de la proteína XPC que actúa como sensor del sitio dañado. La proteína XPA se une al ADN dañado ayudando al reclutamiento de otras proteínas NER; b) Delimitación del daño del ADN. La cadena de doble hélice se desenrolla alrededor del ADN dañado y la proteína de replicación A (RPA) se une al XPA sirviendo de soporte para la actividad del factor de transcripción IIH (TFIIH), formando una especie de burbuja, esta última es un complejo de proteínas donde dos de ellas, XPB y XPD, tienen actividad de helicasas (3'-5' y 5'-3' respectivamente) delimitando el daño del ADN; c) incisión de las cadenas dañadas. La endonucleasa XPG corta la cadena 5-6 nucleótidos hacia abajo del ADN dañado y es seguida por la incisión del complejo XPF-ERCC1 20-22 nucleótidos hacia arriba del ADN dañado; d) extracción del ADN dañado, el cual contiene 22-29 oligonucleótidos; e) complementación del ADN que sintetiza al oligonucleótido usando la cadena complementaria como un molde, involucrando la polimerasa delta y/o polimerasa épsilon.^{26, 29, 30, 31, 32, 33} (Fig. 2 A-H).

Los polimorfismos de los genes involucrados en la reparación del ADN se han asociado con susceptibilidad al cáncer y con la supervivencia en pacientes tratados con cisplatino. El gen más estudiado de la NER es el ERCC1. Este gen se encuentra localizado en el cromosoma 19q13.2 -q13.3. La región codificante de ERCC1 es de 1.1Kb de longitud, la cual comprende 10 exones.³⁵ Los polimorfismos del gen ERCC1 resultan en mutaciones silenciosas donde no se observan sustituciones de aminoácidos que interfieran con la función de la proteína³⁶

Los efectos funcionales de estos polimorfismos en ERCC1 no han sido completamente elucidados, sin embargo, algunas de las variantes alélicas se han asociado con un decremento en la capacidad de reparación del ADN y tienen una relación con la supervivencia en pacientes con cáncer de colon (polimorfismo

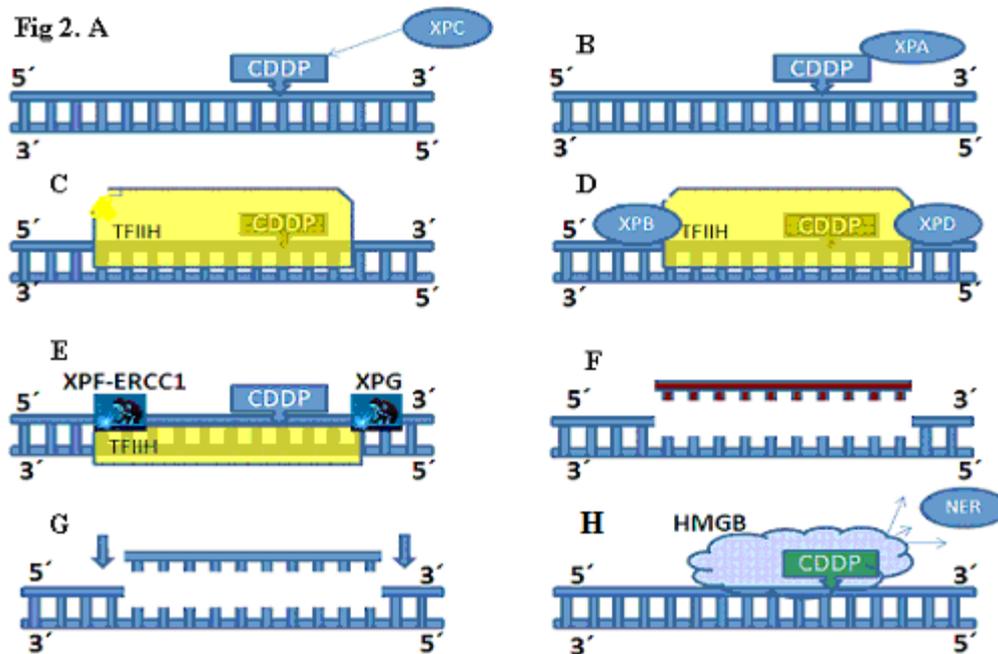


Figura 2- Vía de las proteínas reparadoras por escisión de nucleótidos: A) Reconocimiento del daño del ADN a través de la proteína XPC que actúa como sensor del sitio dañado. B) La proteína XPA se une al ADN dañado ayudando al reclutamiento de otras proteínas NER. C) Delimitación del daño del ADN. La proteína de replicación A (RPA) se une al XPA los cuales sirven de soporte para la actividad del factor de transcripción IIH (TFIIH) formando una especie de burbuja. D) Esta última se forma de un complejo de proteínas donde dos de ellas, XPB y XPD, tienen actividad de helicasa (3'-5' y 5'-3' respectivamente) delimitando el daño del ADN. E) Incisión de las cadenas dañadas. La endonucleasa XPG corta la cadena 5-6 nucleótidos hacia abajo del ADN dañado y es seguido por la incisión del complejo XPF-ERCC1 20-22 nucleótidos hacia arriba del ADN dañado. F) Extracción del ADN dañado el cual contiene 22-29 oligonucleótidos. G) Complementación del ADN que sintetiza al oligonucleótido usando la cadena complementaria como un molde, involucrando la polimerasa delta y/o polimerasa epsilon. H)

Köberle y colaboradores demostraron en cultivos de líneas celulares de TCG (833K y GCT27) que la proteína XPA y el ERCC1 se encuentran disminuidas un 25% comparado con cultivos celulares de otras neoplasias, los autores concluyeron que los niveles de estas proteínas no son suficientes para remover las uniones covalentes del

cisplatino del ADN y podría ser una razón que explique una mayor sensibilidad al cisplatino en cáncer testicular de origen germinal.^{39, 40}

Además de las proteínas reparadoras, existen proteínas conocidas como grupos de alta movilidad (HMG), las cuales son miembros de una clase de moléculas regulatorias de genes que juegan un papel importante en la transcripción, replicación, reparación del ADN y apoptosis por mencionar algunos ejemplos.⁴¹ Las HMG se clasifican en A, B y N, en base a la estructura del dominio de unión del ADN que poseen. Las HMGB se han relacionado directamente con la sensibilidad al cisplatino.^{41, 42} Lippard y colaboradores encontraron que las HMG estaban unidas al sitio del ADN dañado por cisplatino.⁴³ Los sitios de daño más importantes están localizados en el 1,2 intracatenario d(GpG) y d(ApG) (90%). Las HMGB y otras proteínas que contienen el dominio central B (B-box, que en testículo son el factor SRY y la proteína mtTFA) inhiben a la NER debido a que el complejo HMGB-ADN protege a los aductos del cisplatino de la reparación por un "mecanismo de escudo".^{41, 44, 45} (Fig. 2H). Esta afinidad de las HMGB al sitio de daño del ADN por el cisplatino sugiere que estas proteínas están involucradas en la sensibilidad de las células de TCG al fármaco.

Se han propuesto dos modelos de acción de las HMG, el primero menciona que la HMGB se une al ADN dañado y sirve como elemento de reconocimiento. El segundo, y más aceptado, plantea que las HMGB se unen al ADN dañado e impiden el acceso a las proteínas reparadoras.⁴⁶ Zamble y colaboradores demostraron en líneas celulares de carcinoma cervical (HeLa) que el tsHMG (isoforma nuclear de mtTFA) modulaba la citotoxicidad del cisplatino y que puede contribuir a la sensibilidad del cáncer testicular.⁴⁷

PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿Cuál es la influencia de las proteínas reparadoras XPA y ERCC1 así como de las proteínas HMGB en la supervivencia de pacientes con TCG tratados con cisplatino?

JUSTIFICACION

Las proteínas reparadoras del ADN se han propuesto como una explicación a la sensibilidad de las células de los TCG al cisplatino, sensibilidad que se refleja en un incremento en la supervivencia de los pacientes tratados con este fármaco. En pacientes con cáncer de ovario se observan niveles elevados de XPA y ERCC1 en correlación con resistencia clínica y supervivencia.⁴⁸ En cáncer pulmonar, se encontró una diferencia significativa en supervivencia entre pacientes tratados con cisplatino con ERCC1 negativo versus ERCC1 positivo.⁴⁹

Así mismo, la identificación de polimorfismos en los genes de reparación del ADN, principalmente de ERCC1, se ha relacionado con una disminución en la capacidad de reparación del ADN con una influencia directa en la supervivencia. En pacientes con cáncer de pulmón tratados con cisplatino se demostró que los genotipos A/C o C/A del polimorfismo en la región 3' no codificante C8092A de ERCC1 se encuentran asociados con una menor supervivencia comparados con el genotipo C/C.

38

En este trabajo se determinó la influencia de las proteínas reparadoras del ADN, las proteínas HMGB (mtTFA) y del polimorfismo *C8092A del gen ERCC1* con la supervivencia de pacientes con TCG tratados con cisplatino.

OBJETIVOS

PRIMARIO

Correlacionar las proteínas reparadoras del ADN, las proteínas HMGB y polimorfismo C8092A del gen ERCC1 con la supervivencia en pacientes con TCG tratados con cisplatino.

SECUNDARIOS

1. Determinar la frecuencia del polimorfismo *C8092A del gen ERCC1* en la población mexicana.
2. Determinar la frecuencia del polimorfismo C8092A del gen ERCC1 en los pacientes con TCG.
3. Evaluar mediante inmunohistoquímica la expresión de las proteínas XPA, ERCC1 y mtTFA en muestras archivadas de testículo de pacientes con TCG y controles
4. Correlacionar los genotipos del polimorfismo C8092A del gen ERCC1, la expresión de las proteínas reparadoras del ADN y las proteínas HMGB con la resistencia al cisplatino en pacientes con TCG.

HIPOTESIS

Los pacientes con TCG cuyas muestras de testículo presentan una menor expresión de las proteínas reparadoras del daño al ADN (XPA y ERCC1), y/o una sobre-expresión de la proteína mtTFA tienen mejor supervivencia que aquellos pacientes con mayor expresión de las proteínas XPA y ERCC1y/o una sub-expresión de la proteína mtTFA. Así mismo, los pacientes con el genotipo C/C del polimorfismo *C8092A del gen ERCC1* tendrán una mejor supervivencia que los otros genotipos.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se trata de un estudio retrospectivo, no cegado y no comparativo en el que se valoraron las proteínas reparadoras de ADN (XPA, ERCC1), las proteínas del grupo de alta movilidad (mtTFA) y el polimorfismo *C8092A del gen ERCC1* en muestras de testículo de pacientes con TCG.

POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se analizaron muestras de pacientes que acudieron al Instituto Nacional de Cancerología con el diagnóstico de TCG de testículo entre los años 2000-2003.

Criterios de inclusión

- Pacientes con TCG de testículo
- Estadios II, III y IV de la clasificación Royal Marsden
- Tratados con 3-4 ciclos de quimioterapia (Bleomicina, Etoposido y Platino)
- Mayores de 14 años y menores de 60 años.
- Karnofsky ≥ 60 y/o ECOG ≤ 2 .

Criterios de exclusión

- Pacientes tratados con quimioterapia previamente a su ingreso al INCan
- Tumores de células germinales extragonadales
- Pacientes que se aplicaron dos o menos ciclos de BEP
- Pacientes que se hubieran aplicado 3-4 ciclos pero que no tuvieron estudios de extensión (marcadores tumorales, tomografía axial computada) por abandono o cambio de hospital.
- Pacientes que no contaron con bloques de parafina en el Instituto Nacional de Cancerología
- Que desarrollaron cáncer (segundo primario) en testículo contralateral

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Cálculo de la muestra

Se realizó el cálculo de la muestra en base a la respuesta a quimioterapia esperada para los pacientes con polimorfismo CC (90%) y AA (50%), para obtener un poder del 80% y una significancia de $p=0.05$ (2 colas) (REFERENCIA)

$P_1=90$ y $P_2=50$; $Z_{\alpha/2}=1.96$, $\alpha=0.2$ y $Z_{\alpha}=0.84$, $p_M=95$, $q_M=50$, $d=40$

Utilizando la fórmula: $N = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_b)^2 (2) p_M q_M}{d^2}$

d^2

Obtuvimos un cálculo de 47 pacientes

MATERIAL Y METODOS

Obtención de muestras de TCG

Se solicitó la relación de pacientes valorados en forma inicial en el Instituto Nacional de Cancerología en el servicio de Urología de los años 2000-2003 que se diagnosticaron con cáncer de testículo de células germinales y tratados con orquiectomía (en caso de haberse operado fuera del Instituto, que se contara con bloques de parafina).

La estadificación se realizó de acuerdo a la clasificación Royal Marsden dependiendo de la primera y segunda consulta realizada en el servicio de Oncología Médica. Se consideraron sólo aquellos pacientes que contaran con historia clínica, pruebas de laboratorio donde se incluyeran biometría hemática, química sanguínea, electrolitos séricos, pruebas de funcionamiento hepático, tiempos de coagulación, marcadores tumorales (DHL, AFP, HGC-FB) y tomografía axial computarizada.

Determinación de la presencia de las proteínas de reparación XPA y ERCC1 mediante inmunohistoquímica

A partir de los bloques de parafina de pacientes con TCG se realizaron cortes seriados de 1 μ y se montaron en laminillas con silano. En estas laminillas se realizaron los ensayos de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia para las proteínas ERCC1, XPA, y mtTFA.

Inmunohistoquímica de muestras embebidas en bloques de parafina

Se desparafinaron las laminillas a una temperatura de 70°C durante 30 min, se colocaron en un rack a través del cual se llevó a cabo un tren de hidratación para el tejido. Las laminillas se introdujeron en xilol 5 min dos veces y después fueron introducidas en una serie de etanol en dos ocasiones (100%, 90%, 80%, 70%, 50% y 30%) 5 min cada una.

Se realizó un lavado con PBS 1x 10 min a 4°C. El paso siguiente fue la recuperación antigénica calentando en baño María (95-100°C) las laminillas con buffer de citratos durante 20 min. Después de este tiempo se lavaron con PBS 1x a 4°C. Para la inhibición de la peroxidasa endógena del tejido las laminillas se colocaron en

una cámara húmeda y se les adicionó peróxido al 0.3% diluido en agua, peróxido al 0.3% diluido en metanol y nuevamente peróxido al 0.3% en agua, cada una con incubaciones de 10 min a temperatura ambiente. Al término de estos pasos se realizaron dos lavados de 2 min con PBS 1x y posteriormente se realizaron dos bloqueos con albúmina de suero bovino (BSA) al 0.25% en PBS 1x durante 15 min.

Las laminillas fueron incubadas toda la noche a 4°C en una dilución 1:200, para esto se utilizaron anticuerpos monoclonales de ratón tanto para XPA como ERCC1 (AbCam) y policlonal de cabra para mt-TFA (Santa Cruz). Posteriormente las laminillas se lavaron dos veces con PBS 1x 2 min, se adicionó el anticuerpo secundario universal biotinilizado, y se incubó 30 min a temperatura ambiente; al terminar, se realizaron dos lavados con PBS 1x 2 min cada uno, después se adicionó la estreptavidina-HRP y se incubó 30 min a temperatura ambiente; nuevamente se lavó con PBS 1x durante 2 min. Para la detección de la unión del anticuerpo se agregó el cromógeno DAB (ácido diaminobenzóico) incubándolo 5 min a temperatura ambiente (DAKO); para la contraincubación se utilizó hematoxilina de Harris.

Determinación de la frecuencia del polimorfismo *C8092A del gen ERCC1* en la población mexicana

Obtención de muestras de ADN

Las muestras de ADN utilizadas en la genotipificación fueron aisladas de leucocitos y corresponden a individuos sanos que no están relacionados familiarmente y que forman parte del banco de ADN de población mexicana del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Los individuos respondieron un cuestionario que contenía preguntas acerca de su lugar de nacimiento, así como el de sus padres y abuelos, edad, género, factores de exposición, etc.

En el estudio se consideraron mexicanos a los individuos con padres y abuelos nacidos en México. De estas muestras se determinó la frecuencia genotípica del polimorfismo *C8092A del gen ERCC1* mediante la técnica de PCR y la digestión con enzimas de restricción específicas.

Amplificación del polimorfismo de *C8092A del gen ERCC1* mediante la técnica de PCR

Para determinar el polimorfismo de *C8092A del gen ERCC1*, se amplificó el fragmento del gen que incluye el codón 8092 con los siguientes primers:

Sentido: 5' TAG TTC CTC AGT TTC CCG 3'

Antisentido: 5' TGA GCC AAT TCA GCC ACT 3'

Para la reacción de PCR se utilizaron 100 ng de ADN genómico, 0.2mM de cada dNTP, 0.2 µM de cada primer, 1µl de buffer 10X sin MgCl₂ (Invitrogen), 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 unidades de DNA polimerasa Taq Platinum (cat. 10966-030 Invitrogen) y H₂O MQ estéril para completar un volumen de 10µl.

Los ciclos del PCR se llevaron a cabo en un termociclador PCR Sprint thermal Cycler de Thermo con las siguientes condiciones de reacción:

<i>Ciclos</i>	<i>Etapa</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Temperatura</i>
1	Desnaturalización	2 min	94°C
	Desnaturalización	30 seg	94°C
40	Alineamiento	30 seg	52°C
	Extensión	30 seg	72°C
1	Extensión final	5 min	72°C

Condiciones de reacción para la amplificación del ERCC1 C8092A

El producto de PCR corresponde a un fragmento de 255 pb, se verificó la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 3%.

Análisis del polimorfismo ERCC1 C8092A por RFLP's

Para identificar el polimorfismo se digirieron los productos del PCR con la enzima de restricción Mbo II(New England Biolabs), esta enzima reconoce el sitio 5'GAAGA(N)₈3' que se genera en el gen *ERCC1* por la transversión A:G en la posición 8092 del extremo 3' terminal.

Las condiciones para la restricción del fragmento fueron las siguientes: 2 µl de producto de PCR, 1 µl de buffer NEB2 (10X), y 0.25 U de enzima en 10 µl de reacción. La incubación se efectuó a 37°C durante 3 h.

Sitios de restricción y fragmentos

TGAGCCAATTCAGCCACTAGAGCCTGAACTGCCAGGGGAGGGACAGCCTGA

91 pb.

AGCCAGGGCAACTCCGGGATCCACCAA**GAAGAGGAAGAAG**/**CAGAGT**/CAGG

6 pb

AAAGCCGGATGCCAGAGACAGTGCCCCAAGAGGAGATGCCAGGGCCGCCAC

159 pb (sin digerir)

TGAATTCAGAGTCTGGGGAGGAGGCTCCACAGGCCGGGACAAGAAGCG**GA**

117 pb (digerido)

AGCAGCAGCAG/**CAGCAGCCTGTGTAGTCTGCCCCCGGGAAACTGAGGAACT**

41

A

Los sitios de corte de la enzima de restricción MbolI **GAAGA**

El sitio del polimorfismo **GAAGC** Cambia una C por una A y se genera el sitio.

/ Sitio en el que corta la enzima

El fragmento de ADN del genotipo homocigoto silvestre tiene dos sitios de restricción para la enzima por lo que se generan 3 fragmentos de 159 pb, 91 pb y 6 pb. En el homocigoto polimórfico se genera un sitio en el fragmento de 159 pb resultando dos fragmentos de 117 pb y 41 pb como puede verse en la secuencia. El análisis de los fragmentos se realizó mediante geles de agarosa al 3%.

Determinación de la frecuencia del polimorfismo C8092A del gen ERCC1 en la población con TCG.

De los bloques de parafina obtenidos de pacientes valorados en forma inicial en el Instituto Nacional de Cancerología en el servicio de Urología de los años 2000-2003 que se diagnosticaron con cáncer de TCG, y que fueron sometidos a orquiectomía, se realizaron 6 cortes de 10 μ para poder llevar a cabo la extracción de ADN e identificar la frecuencia del polimorfismo *C8092A del gen ERCC1* con los oligonucleótidos y las enzimas de restricción específicas utilizadas en la determinación de la frecuencia del mismo en la población mexicana.

Extracción de ADN de las muestras parafinadas

La extracción de ADN a partir de los cortes de las muestras incluidas en parafina se realizó mediante el siguiente protocolo. Se agregó 1 mL de octano y se agitó el tubo que contenía los cortes de cada muestra para después calentarlo a 50°C durante 10 min en un termoblock y centrifugarlo a 12 000 rpm durante 3 min a 40°C; posteriormente se eliminó el sobrenadante y se repitió el proceso dos veces. Una vez terminado, se adicionó 1 mL de etanol al 100% y se agitó el tubo manualmente, para centrifugarlo a 12 000 rpm durante 3 min a 25°C, se eliminó el sobrenadante y se repitieron estos dos últimos pasos una vez más pero esta vez con 500 μ L de etanol al 100%, posteriormente se adicionaron 500 μ L de etanol al 70% y se centrifugaron a 12,000 rpm durante 3 min a 25°C para finalmente eliminar el sobrenadante y repetir el proceso. El etanol del precipitado se evaporó calentando a 50°C en un termoblock y el pellet se resuspendió en 100 μ L de buffer de lisis (50mM de Tris HCL pH 8.5, 1mM de EDTA, 0.5% de Tween 20 y 200 μ g/mL de proteinasa K) para finalmente incubarlo a 55°C durante 3 h o a 37°C durante toda la noche. Posteriormente se inactivó la proteinasa K calentando durante 10 min a 90°C. Una vez inactiva, se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min y se guardó el sobrenadante a -20°C, que es la parte donde se encuentra el ADN. Para analizar la integridad del ADN de cada una de las muestras se corrió un gel de agarosa al 1%.

RESULTADOS

Se revisaron 450 expedientes de pacientes con el diagnóstico de cáncer de testículo en el Instituto Nacional de Cancerología en el período comprendido entre el 2 de enero del 2000 al 31 de diciembre del 2003, de los cuales 61 cumplieron con los criterios de inclusión. Se excluyeron 3 pacientes por las siguientes razones: 1 paciente recibió quimioterapia de primera línea con cisplatino, adriamicina y ciclofosfamida; 1 paciente recibió sólo dos ciclos de bleomicina, etopósido y platino; 1 paciente desarrolló un segundo primario.

La mediana de edad del grupo analizado fue de 23 años. La frecuencia según la estadificación del Royal Marsden fue del 40.3%, 7.5%, 32.8% y 38.8% con estadio II, III y IV respectivamente. El 79.3% de los pacientes correspondió a estirpes mixtas siendo los mayores porcentajes la combinación de senos endodérmicos, carcinoma embrionario y teratoma en un 13.8% seguido de carcinoma embrionario más teratoma y carcinoma embrionario más seminoma en un 10.3% cada uno. El 20.7% correspondió a una sola estirpe histológica predominando el seminoma con marcadores tumorales positivos en un 10.3% y con un 6% senos endodérmicos y carcinoma embrionario cada uno. Las metástasis se presentaron más frecuentemente a nivel de retroperitoneo (89.7%), seguido de pulmón (34.5%), mediastino y ganglios (10.3%).

Según el grupo pronóstico de nuestros pacientes correspondió a buen pronóstico el 25.9%, pronóstico intermedio 36.2% y pobre pronóstico 37.9%.

Se realizaron 58 inmunohistoquímicas para detectar proteínas reparadoras de ADN (XPA, ERCC1) y la proteína HMGB (mtTFA).

Se montaron los tejidos en microarreglos tisulares siendo un total de 12 muestras por laminilla. Se corrieron los anticuerpos por duplicado contando con su tejido control correspondiente. Las muestras se analizaron por 2 biólogas y se corroboraron los resultados con una especialista en Anatomía Patológica Oncológica. (Fig. 3-5).

Tabla 2. Características generales de los pacientes

Características generales	
Edad (mediana)	23 años
Tipos histológicos más frecuentes	Una sola estirpe 20.7% Más de una estirpe 79.3%
Vivos	60.3%
Muertos	39.7%
Sitios de metástasis más frecuente	Retroperitoneo 89.7% Pulmón 34.5% Mediastino y ganglios 10.3%

La mediana de supervivencia global fue de 60 meses. Hubo diferencia entre los grupos pronóstico muy notoria. El grupo de buen pronóstico vive, a 5 años, 93.3%, el de pronóstico intermedio 57.1% y el de pobre pronóstico 40.9%.

Al correlacionarse la supervivencia global de los pacientes con las proteínas de reparación se encontró una diferencia estadísticamente significativa con la ausencia de la proteína XPA (Gráfica 1). De la población estudiada 53 pacientes tuvieron ausente XPA y 4 la tuvieron presente ($p=0.041$)

La otra proteína de reparación ERCC1 y la proteína mtTFA no demostraron influir en la supervivencia global, sin embargo, hay que hacer notar que la ERCC1 no se encontró en la mayoría de los pacientes mientras que la proteína HMGB mtTFA se encontró en casi todos los pacientes pero localizada a nivel citoplasmático y ausente a nivel nuclear.

Por lo que respecta al polimorfismo del gen ERCC1 se realizaron 126 amplificaciones del banco de ADN de población mexicana del Instituto de Investigaciones Biomédicas (Fig. 6).

Posteriormente se procedió a la digestión de las muestras por medio de la técnica PCR. Figura 7-9. Los resultados de las 126 digestiones se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Frecuencia de los diferentes genotipos del polimorfismo C8092A del gen ERCC1 en una muestra de 129 individuos mexicanos

Total	C/C	C/A	A/A	Alelo C	Alelo A
126	34	64	28	52.4%	47.6%

La frecuencia del alelo C es menor a la reportada en las principales series a nivel mundial (Tabla 4), por otra parte la frecuencia del alelo A es mayor en nuestra población con respecto a la literatura internacional; sin embargo, los valores analizados en la literatura son de estudios en donde no se incluyó población abierta como en el nuestro; éstos son los primeros reportes según el genotipo y variante alélica del polimorfismo C8092A del gen ERCC1 en población mexicana.

Hasta el momento se han realizado 24 amplificaciones de las muestras de tejido neoplásico testicular incluidas en parafina. Está pendiente realizar 34 muestras más debido a que el material no ha sido satisfactorio (Fig. 10 y 11).

Tabla 4. Frecuencias del polimorfismo C8092A reportadas en diferentes poblaciones

Referencia	Grupo étnico	Población Estudiada	n Control	CC control	CA control	AA control	Frec C	Frec A
<i>Wrensch et al. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2000;9:843-847</i>	Caucásicos Americanos	Control	159	81	70	8	0.72	0.27
		Glioma	122	73	43	6	0.77	0.22
<i>Christiani et al. Clinical Cancer Reserch 2004;10:4939-4943</i>	Caucásicos Americanos	Cáncer de pulmón E-III-IV	128	68	30	30	0.64	0.35
<i>Wrensch et al. Neuro-Oncology 2005;7:495-507.</i>	Caucásicos Americanos	Control	508	267	212	29	0.73	0.26
		Tumores SNC (GBM/No GBM)	450	238	176	36	0.72	0.27
<i>Christiani et al. Clinical Cancer Reserch 2005;11:1534-1538</i>	Caucásicos Americanos	Cáncer de pulmón E-III-IV	214	118	82	14	0.74	0.25
<i>Shen et al. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2006;15:1614-9</i>	Caucásicos Americanos	Control grupo riesgo	156	84	62	10	0.73	0.26
		Cáncer de mama-ovario	152	86	55	11	0.74	0.25
<i>Cespedes et al. J Clin Oncol 2006;24:4333-4339</i>	Caucásicos Europeos	Cáncer de cabeza y cuello	103	55	41	7	0.73	0.26
		Población total	1992	1070	771	151	0.72	0.28
		Control	823	432	344	47	0.735	0.265
		Cáncer	1169	638	427	104	0.735	0.265

Se determinó el polimorfismo C8092A del gen ERCC1 en 24 muestras de pacientes con cáncer de TCG incluidas en parafina. Se encontraron 9 heterócigos (8092 C/A 37.5%), 10 homócigos silvestre (8092 C/C 41.6 %) y 5 homócigos polimórficos (8092 A/A 20.9%). Los agrupamos en no polimórficos (homócigos silvestre y heterócigos) y polimórficos (homócigos mutantes) obteniendo 19 (79.1%) versus 5 (20.1%) pacientes. La frecuencia del polimorfismo C8092A del gen ERCC1 en cáncer de TCG según la variante alélica fue del 60.4% para el alelo C y del 39.6 % para el alelo A. La comparación de la frecuencia del polimorfismo en la población obtenida del banco de ADN comparado con la obtenida en las muestras de cáncer de TCG se encuentra en la tabla 5.

Tabla 5. Comparación de la frecuencia alélica entre la población mundial, mexicana y cáncer de testículo.

	Total	C/C	C/A	A/A	Alelo C	Alelo A
Población mundial	1992	1070	771	151	72%	28%
Población mexicana	126	34	64	28	52.4%	47.6%
Cáncer testículo	24	10	9	5	60.4%	39.6%

Al correlacionarse los genotipos del polimorfismo C8092A del gen ERCC1 con la sobrevivencia de los pacientes con TCG no se encontró diferencia estadística entre los grupos, aunque si se observó una tendencia de los individuos con el genotipo C/C a presentar una menor supervivencia. Por lo que es necesario contar con el resto de muestras faltantes (34) para poder realizar un adecuado análisis estadístico (Gráfica 2).

En el análisis multivariado se encontró que los pacientes tienen mejor respuesta al tratamiento si existe respuesta a una línea de quimioterapia versus dos o más líneas; pertenecer al grupo de buen pronóstico; ser homócigo mutante del polimorfismo C8092A (A/A), tener inicialmente una AFP menor de 1000, HGC-FB menor de 5000, y DHL menor a 300.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los resultados encontrados en nuestro estudio contribuyen al entendimiento de la quimiosensibilidad al cisplatino en TCG. Se han realizado múltiples estudios con cisplatino y tumores sólidos, sin embargo, son pocos los que se evalúan en tumores germinales donde sólo en líneas celulares se había inferido el papel de las proteínas reparadoras del ADN. Este es el primer estudio en correlacionar dichas proteínas reparadoras (XPA, ERCC1) y las HMGB (mtTFA) con la supervivencia de los pacientes con tumores de células germinales de testículo. Anteriormente Köberle y colaboradores demostraron, en cultivos de líneas celulares de tumores germinales testicular (833K y GCT27), que la proteína XPA y la ERCC1 estaban disminuídas, de las dos proteínas la XPA es la que contaba con mayor peso estadístico relacionado en la reparación del ADN.

En este estudio demostramos una diferencia estadísticamente significativa en supervivencia en los pacientes cuyas muestras no expresaron la proteína reparadora XPA. Dicha proteína es la encargada de detectar el ADN dañado y a su vez reclutar a las otras proteínas pertenecientes a la vía de reparación NER, al estar ausente la XPA no se puede llevar acabo la cascada de reparación dando oportunidad a una mayor acción por parte del cisplatino en el ADN de las células tratadas. El estudio demostró que la detección tanto de la proteína ERCC1 como de mtTFA no tiene algún valor significativo en la supervivencia de pacientes con TCG

En este estudio concluimos que la ausencia de la proteína XPA correlaciona con la sensibilidad a la quimioterapia basada en cisplatino en TCG y que esto conlleva a los pacientes a tener un mejor pronóstico en supervivencia. En comparación con otros estudios, en los cuales la proteína ERCC1 y mtTFA se encuentran asociados a la sensibilidad de TCGT al cisplatino, en este estudio no se encontró una asociación estadísticamente significativa.

Por otro lado, aunque no podemos concluir acerca del papel del polimorfismo C8092A del gen ERCC1 debido a que sólo se han genotipificado alrededor del 50% de las nuestras totales, la tendencia hasta el momento muestra que tener el alelo no polimórfico (C) conlleva un mayor riesgo en mortalidad y de resistencia al tratamiento con cisplatino.

FIGURAS Y GRAFICAS

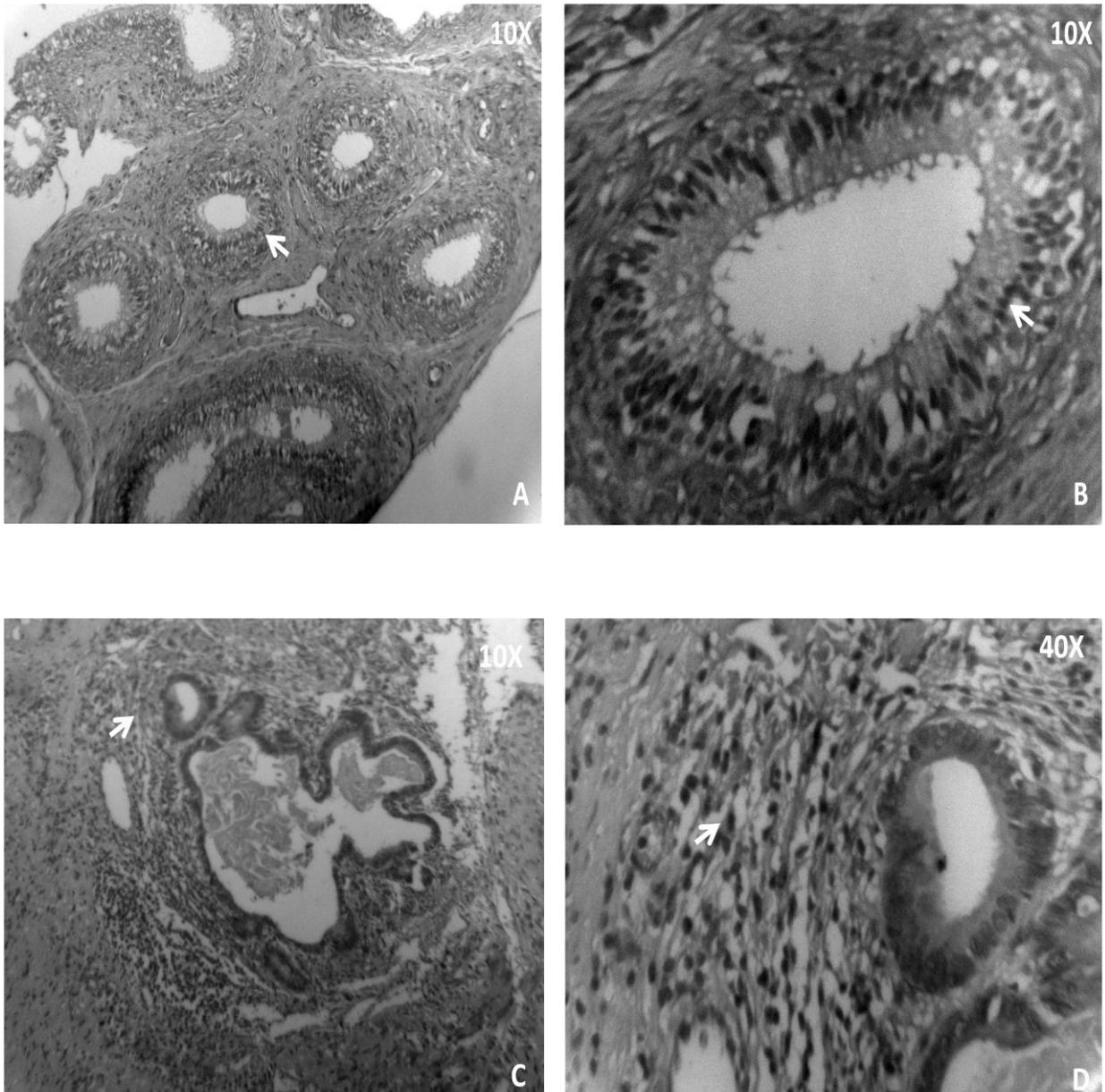


Figura 3. Inmunodetección nuclear de ERCC1. A) Testículo normal como control positivo en aumento original 100X y B) 400X. C) Tumor de células germinales de testículo (TCGT) 100X y 400X.

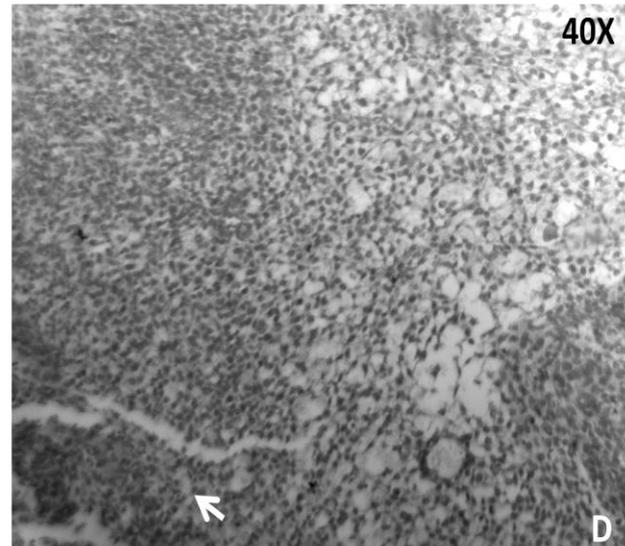
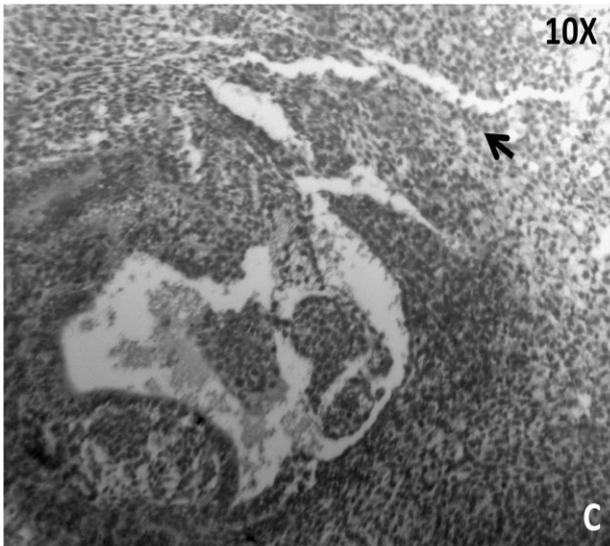
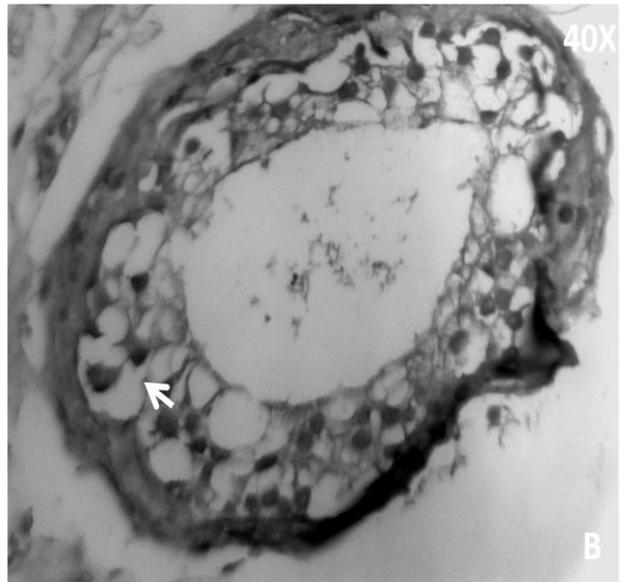
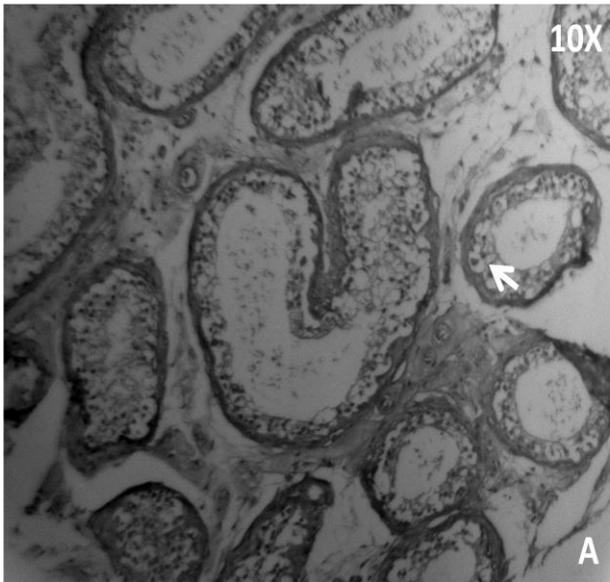


Figura 4- Inmunodetección nuclear de XPA. A) Testículo normal como control positivo en aumento original 100X y B) 400X. C) Tumor de células germinales de testículo (TCGT) 100X y 400X.

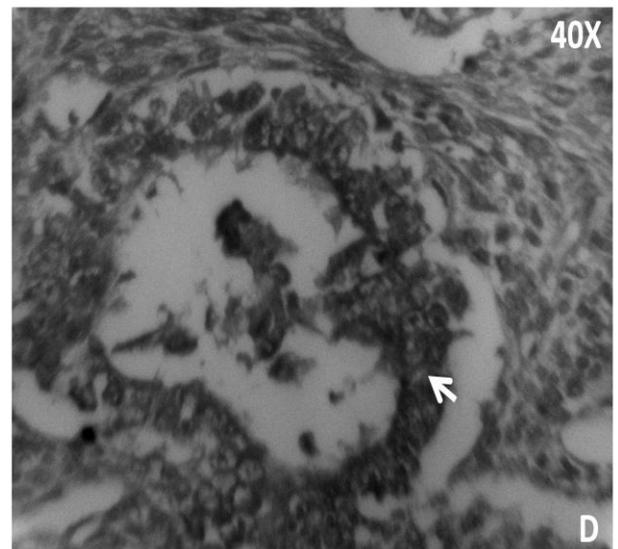
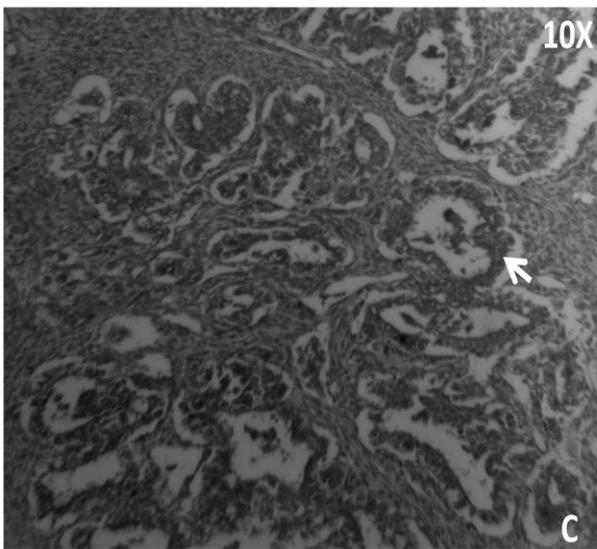
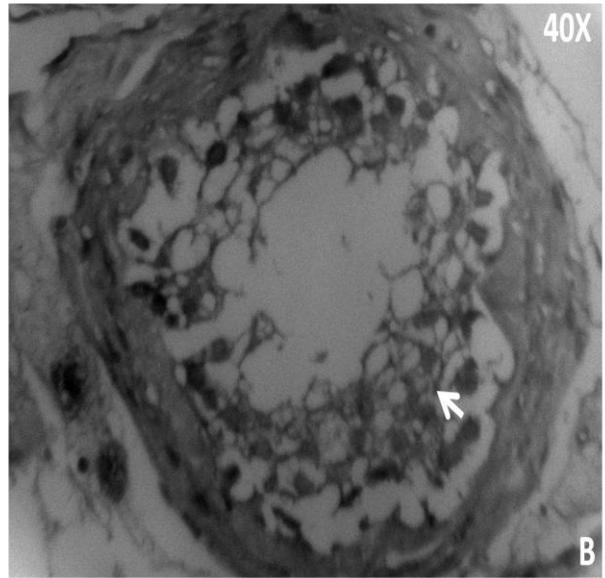
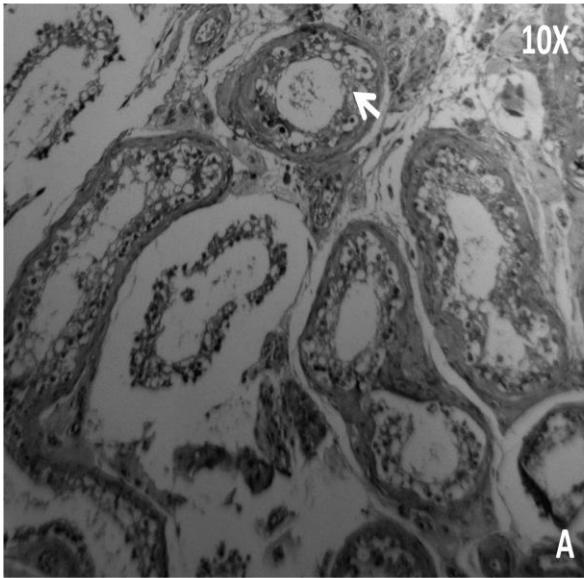


Figura 5. Inmunodetección citoplásmica de mt-TFA. A) Testículo normal como control positivo en aumento original 100X y B) 400X. C) Tumor de células germinales de testículo (TCGT) 100X y 400X.

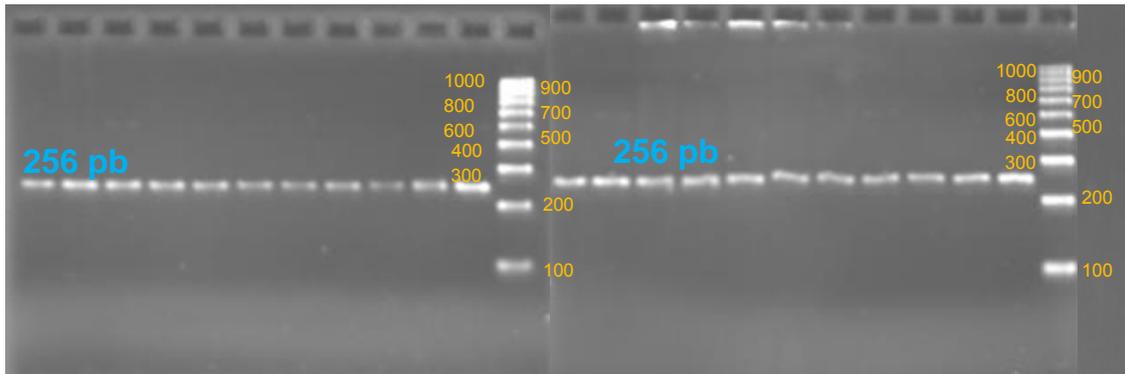


Figura 6- Amplificación del segmento de ADN localizado a 256 pb de sangre periférica.

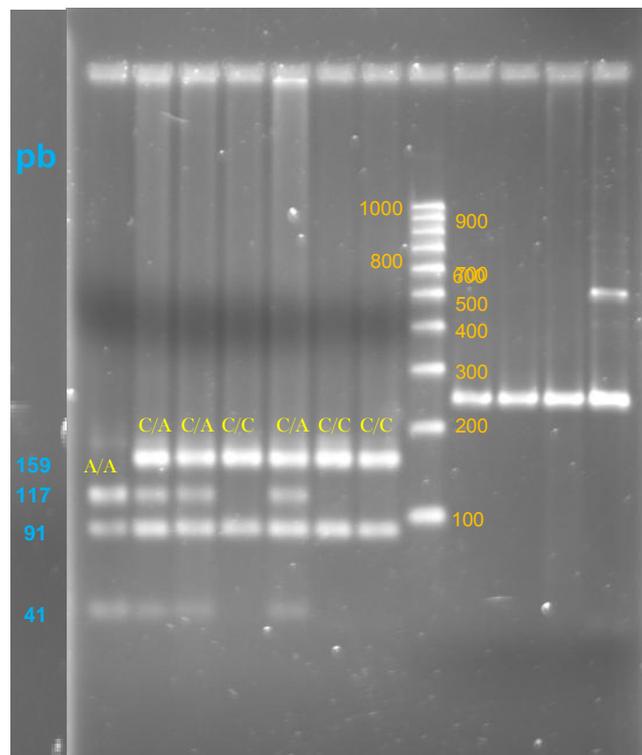


Figura 7- Digestión y Amplificación del Polimorfismo C8092A del gen ERCC1

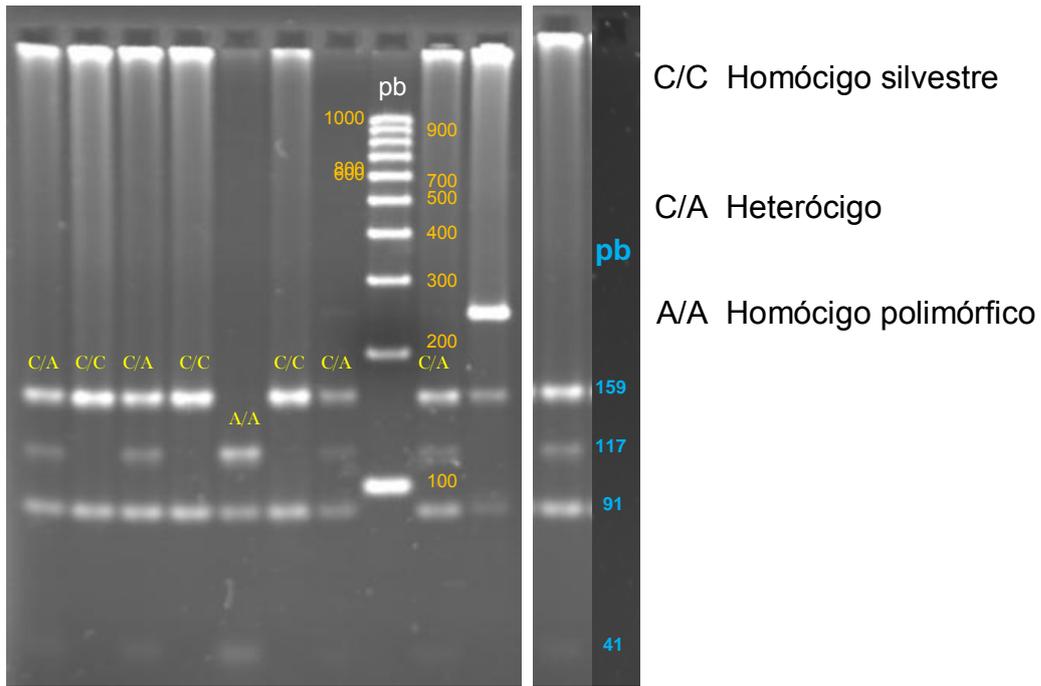


Figura 8. Digestión del segmento amplificado de ADN de sangre periférica. Amarillo: Genotipos del Polimorfismo C8092A del gen ERCC1. Silvestre (C/C), heterócigo (C/A) y mutante (A/A). Azul: sitios de corte de la enzima de restricción.

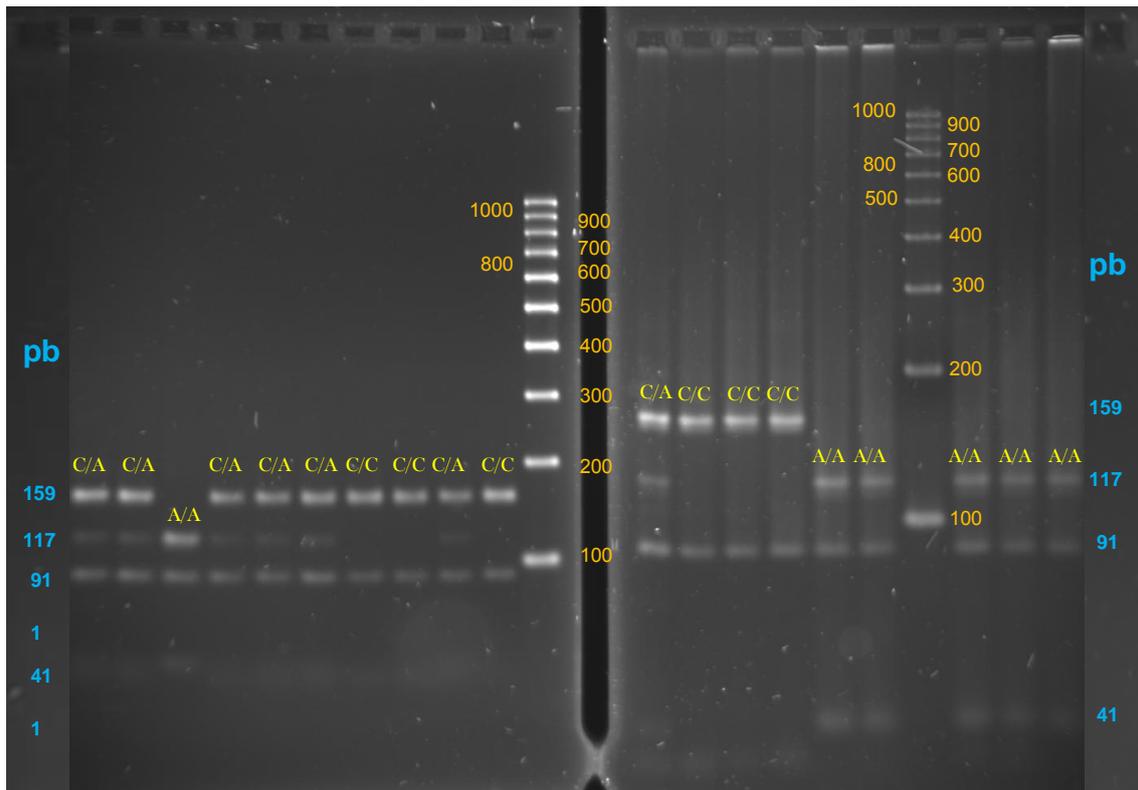


Figura 9. Digestión del segmento amplificado de ADN en sangre periférica. Amarillo: Genotipos del Polimorfismo C8092A del gen ERCC1. Silvestre (C/C), heterócigo (C/A) y mutante (A/A). Azul: sitios de corte de la enzima de restricción.

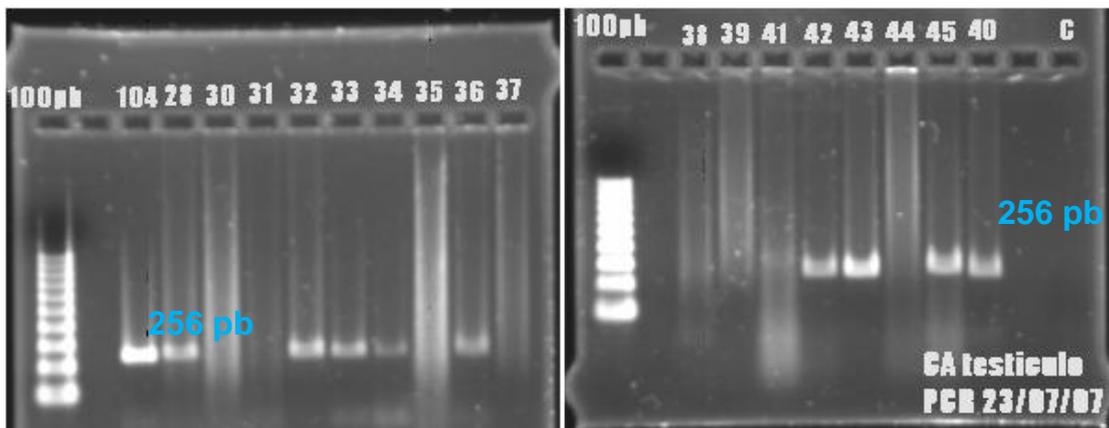


Figura 10. Amplificación del segmento de ADN localizado en 256 pb en TCG.

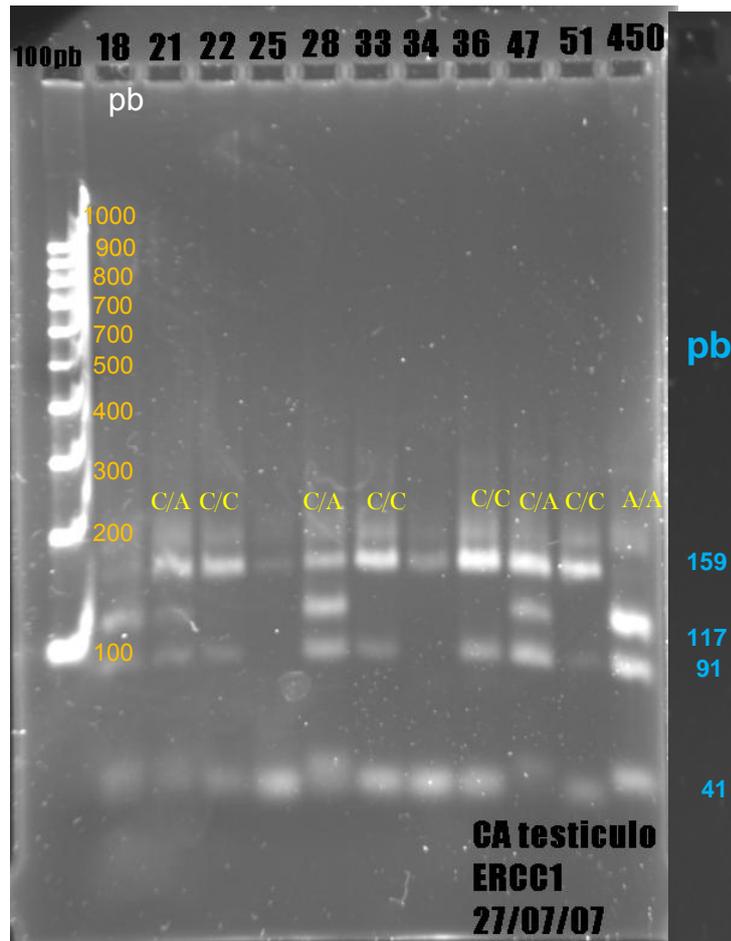
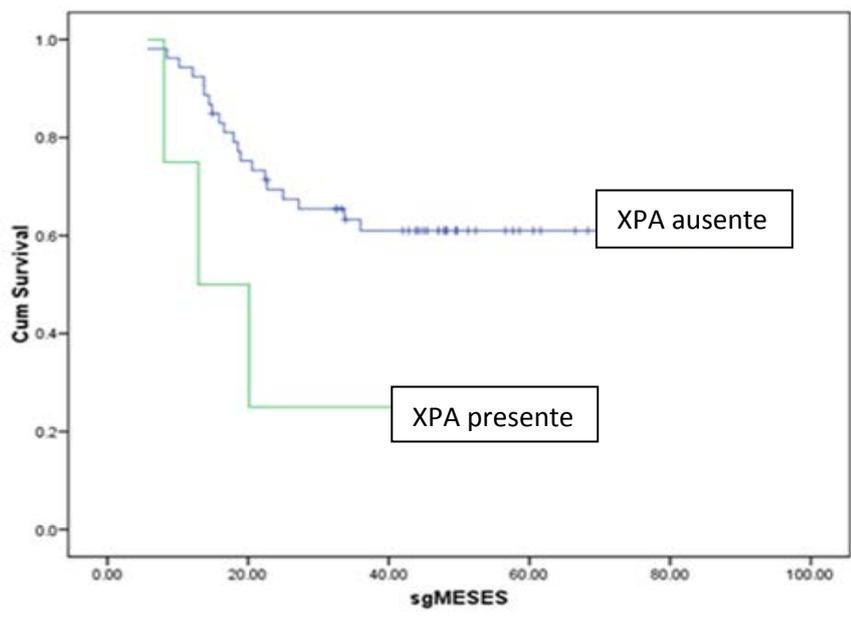
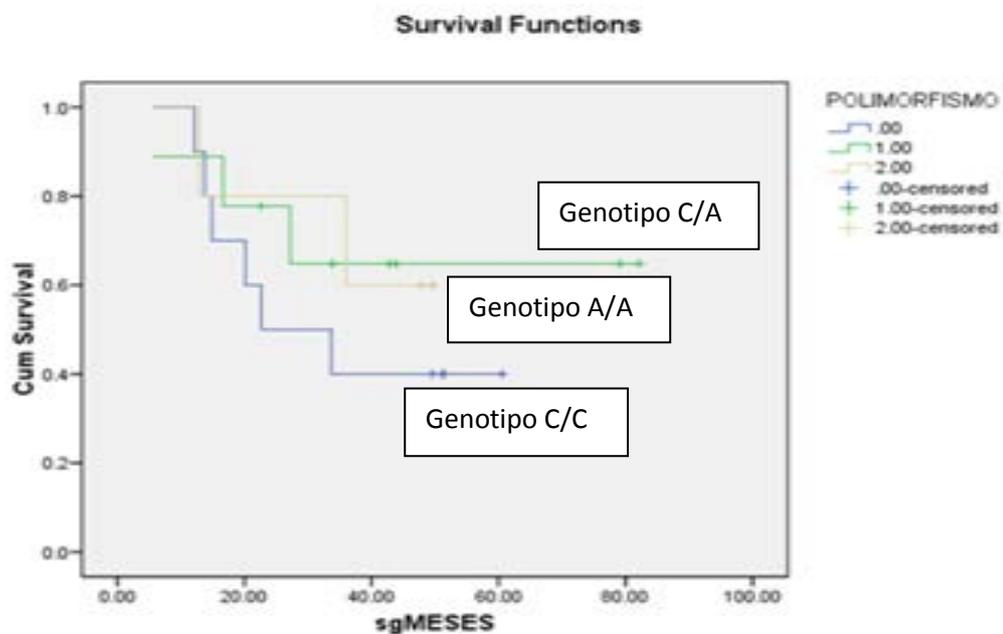


Figura 11. Digestión del segmento amplificado de ADN. Genotipos del Polimorfismo C8092A del gen ERCC1 de cáncer CGT. Silvestre (C/C), heterocigoto (C/A) y mutante (A/A).



Gráfica 1. Curvas de supervivencia global de pacientes con tumor de células germinales de testículo correlacionado con XPA presente y ausente.



Gráfica 2. Curvas de supervivencia global de pacientes con TCG correlacionadas con la genotipificación del polimorfismo C8092A del gen ERCC1.

REFERENCIAS

1. Gori S. Germ cell tumours of the testis. *Critical Rev in Oncol/Hem* 2005;53:141-164.
2. *Registro Histopatológico Nacional de México 2002*.
3. Farmakis D. Recent Advances in Conventional-Dose Salvage Chemotherapy in patient with Cisplatin resistant or refractory testicular germ cell tumors. *Eur Urol* 2005;48:400-407.
4. Berney DM. A practical approach to the reporting of germ cell tumors of the testis. *Current Diagnostic Pathology* 2005;11:151-161.
5. Horwich A. Testicular Germ cell cancer. *Lancet* 2006;367:754-765.
6. Motzer MD. Testicular Germ Cell Cancer. *New Eng J Med* 1997;337:242-253.
7. International Germ Cell Cancer Collaborative Group. International Germ cell Consensus classification: a prognostic factor-based staging system for metastatic germ cell cancer. *J Clin Oncol* 1997;15:594-603.
8. Shelley MD. Treatment of Testicular germ-cell cancer: a Cochrane evidence-based systematic review. *Cancer Treat Rev* 2002;28:237-253.
9. Williams SD. Treatment of disseminated germ cell tumours with cisplatin, bleomycin and either vinblastine or etoposide. *N Eng J Med* 1987;316 (23):1435-1440.
10. Freedman L. Histopathology in the prediction of relapse of patients with stage I testicular teratoma treated by orchidectomy alone. *Lancet* 1987;2:294-298
11. European consensus on diagnosis and treatment of germ cell cancer: a report of the European Germ Cell Cancer Consensus Group. *Ann Oncol* 2004;15:1377-1399.
12. Vasey PA. Testicular Cancer-management of advanced disease. *Lancet Oncol* 2003;4:738-747.
13. Huddart R. The management of Poor-prognosis, non seminomatous Germ cell tumors. *Clinical Oncol* 2005;17:543-552.
14. Bokemeyer C. Molecular Determinants of treatment response in human Germ Cell Tumors. *Clin Cancer Reserch*;2003;9:767-773.
15. Damia G. Mechanisms of resistance to alkylating agents. *Cytotechnology* 1998;27:165-173.
16. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003;22:7265-7279.

17. Essigmann JM. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutation Research* 2001;478:23-43.
18. Giaccone G. Drug Resistance. *The Oncologist* 1996;1:82-87.
19. Martínez MM. La glicoproteína P una bomba de membrana que representa una barrera a la quimioterapia en los pacientes con cáncer. *An Med Interna* 2002;19:477-485.
20. Clarke DM. Molecular dissection of the human multidrug resistance P-glycoprotein. *Biochem Cell Biol* 1999;77:11-23.
21. Stavrovskaya AA. Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry* 2000;65:112-126.
22. Lavie Y. Cancer multidrug resistance: A review of recent drug discovery research. *IDrugs* 2002;5:1-7.
23. Simon SM. Role of organelle pH in tumor cell biology and drug resistance. *DDT* 1999;4:32-37.
24. Simon SM. Cell biological mechanism of multidrug resistance in tumors. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91:3497-3504.
25. Takayama H. Frequent *Fas* gene mutations in testicular Germ Cell Tumors. *Am J Pathol* 2002;161:635-641.
26. Leibel D. et al. Nucleotide excision repair and cancer. *J Mol Hist* 2006;37:225-238.
27. Johnston PG. Molecular mechanism of drug resistance. *J Pathol* 2005;205:275-292.
28. Reardon J. Efficient Nucleotide Excision Repair of Cisplatin, Oxaliplatin and Bis-aceto-ammine-dichloro-cyclohexylamine-platinum(IV) (JM216) Platinum Intrastrand DNA Diadducts. *Cancer Research* 1999;59:3968-3971.
29. Eddie Reed. Nucleotide excision repair and anti-cancer chemotherapy. *Cytotechnology* 1998;27:187-201.
30. Sharova NP. How Does a cell Repair Damaged DNA?. *Biochemistry* 2005;70:341-359.
31. Wood RD. Nucleotide excision repair in mammalian cells. *J Biol Chem* 1997;272:23465-23468.
32. Moggs JG. Differential human nucleotide excision repair of paired and mismatched cisplatin-DNA adducts. *Nucleic Acids Res* 1997;25(3):480-491.
33. Hara R. DNA damage in the nucleosome core is refractory to repair by human excision nuclease. *Molecular and Cellular Biology* 2000;20:9173-9181.

34. Popanda O., Schattenberg T., Phong CT et al. Specific combinations of DNA repair. *Carcinogenesis* 2004; 92: 2433-2441
35. Shen MR, Jones IM, Mohrenweiser H. Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res* 1998; 58:604-8
36. Yu JJ, Mu C, Lee KB, et al. A nucleotide polymorphism in ERCC1 in human ovarian cancer cell lines and tumor tissues. *Mutat Res* 1997; 382: 13-20
37. Zhou W., Gurubhagavatula S., Liu G., et al. Excision repair cross-complementation group I polymorphism predicts overall survival in advanced non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4939-4943
38. Suk R., Gurubhagavatula S., Park S., et al. Polymorphisms in ERCC1 and grade 3 or 4 toxicity in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1534-1538
39. Köberle B. et al. Defective repair of cisplatin-induced DNA damage caused by reduced XPA protein in testicular germ cell tumours. *Current Biol* 1999;9:273-276.
40. Köberle B. Et al. Reduced levels of XPA, ERCC1 and XPF DNA repair proteins in testis tumor cell lines. *Int J Cancer* 2004;110:352-361.
41. Reeves R. Role of high mobility group (HMG) chromatin proteins in DNA repair. *DNA Repair* 2005;4:926-938.
42. Lippard JS. Et al. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Rev* 2005;4:307-320.
43. Lippard JS. Et al. Specific binding of chromosomal protein HMG1 to DNA damaged by the anticancer drug cisplatin. *Science* 1992;256:234-237.
44. Lippard JS. Et al. Basis for recognition of cisplatin-modified AND by high-mobility-group proteins. *Nature* 1999;399(17):708-712.
45. Hock R. Et al. HMG chromosomal proteins in development and disease. *TRENDS in Cell Biol* 2006;doi:10.1016/j.tcb.2006.12.001.
46. Lanuszewska J. Et al. The role of chromatin proteins in DNA damage recognition and repair. *Histochem Cel Biol* 2006;125:119-126.
47. Zamble DB. Testis-specific HMG-domain protein alters the responses of cells to cisplatin. *J Inorg Biochem* 2002;91:451-462.
48. Reed E. Et al. Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy. *J Clin Invest* 1994;94:703-708.

49. Olausson KA. Et al. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Eng J Med* 2006;355:983-991