

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA

Correlación de los polimorfismos C8092 de ERCC1, y 5'UTR de XPA, con las características clínicas y la sensibilidad al tratamiento con cisplatino en pacientes con tumores de células germinales de testículo”

T E S I S

Q U E P R E S E N T A

DR. LUIS ALBERTO TAVARES DE LA PAZ

PARA OBTENER EL DIPLOMA EN LA

SUBESPECIALIDAD EN CIRUGIA ONCOLOGICA

ASESOR: Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo

Asesor

Director de Investigación

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA

Dra S. Verónica Villavicencio Valencia

Secretario

Subdirección de Enseñanza

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA

Dr Luis Alberto Tavares de la Paz

Alumno

INDICE

RESUMEN

INTRODUCCION

ANTECEDENTES

OBJETIVOS

HIPOTESIS

METODOLOGIA

RESULTADOS

DISCUSION

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

APENDICE

RESUMEN

Los pacientes con tumores germinales de testículo en estadios avanzados alcanzan una supervivencia a 5 años del 70-80% si son tratados con quimioterapia adyuvante basada en platino; sin embargo, cerca del 20-30% de los pacientes no responderán a esta estrategia terapéutica y tendrán una evolución desfavorable, con progresión de la enfermedad y un potencial desenlace fatal. Uno de los mecanismos de acción del platino es mediante la formación de uniones con el DNA de la célula tumoral, cambiando su configuración espacial y propiciando su apoptosis. Una de las vías de reparación de estas uniones entre el platino y el DNA más estudiadas, es la vía de "Reparación por Excisión de Nucleótidos (NER)". Dos de las proteínas más importantes de este sistema de reparación, son el ERCC1 y la XPA. La presencia de los polimorfismos C8092A de ERCC1 y 5'UTR de XPA, se han asociado con la supervivencia global en pacientes tratados con cisplatino en otras neoplasias. **Objetivo:** Determinar la genotipificación de los polimorfismos C8092A de ERCC1 y 5'UTR de XPA en pacientes con tumores germinales de testículo en estadios avanzados y correlacionarlos con las características clínicas y la respuesta a la quimioterapia basada en cisplatino. **Metodología:** Estudio prospectivo y observacional. Extracción de DNA de sangre periférica de pacientes con TCGT en estadios avanzados para la genotipificación de los polimorfismos C8092A de ERCC1 y 5'UTR de XPA antes del inicio de quimioterapia, y su correlación con variables clínicas, histológicas y la respuesta al tratamiento con quimioterapia

Resultados: los polimorfismos C8092A del gen ERCC1 y 5'UTR de XPA en los pacientes con TCGT en estadios avanzados, muestran una tendencia a presentar una mejor respuesta al tratamiento con quimioterapia basada en platino, un mejor perfil clínico y a una mejor sobrevida global.

Conclusión: Es posible que la presencia de polimorfismos de ERCC1 (C8092A) y de XPA (5UTR), se asocien a un mejor pronóstico, además de tener un hipotético papel como factor predictivo en los tumores germinales de testículo en estadios avanzados. Es necesario completar el tamaño de la muestra calculado para determinar el verdadero valor de estos resultados.

INTRODUCCION

Los tumores germinales de testículo son consideradas neoplasias altamente quimiosensibles, en donde se alcanzan tasas tan altas de curabilidad como del 90%, aun en presencia de enfermedad metastásica. El éxito terapéutico se atribuye en gran medida a la introducción de la quimioterapia adyuvante a base de cisplatino, aunada a un adecuado seguimiento y control quirúrgico de la enfermedad residual.

Se han descrito diversos mecanismos biológicos que participan directa o indirectamente en la respuesta a la quimioterapia basada en platino, pero uno de los más estudiados y que ha demostrado consistentemente una relación con la respuesta al tratamiento sistémico, es el de la capacidad para reparar el DNA que ha sido modificado por el platino. La vía de reparación del DNA por escisión de nucleótidos (NER) es considerada de las más importantes, y existen en la literatura diferentes líneas de investigación que han encontrado asociación entre las distintas proteínas que conforman esta complicada maquinaria de reparación, con la sensibilidad a la quimioterapia en distintos tipos de neoplasias.

Por otro lado, en la actualidad es ya posible encontrar mutaciones genéticas ocultas (polimorfismos) que se manifiestan como pérdida, mal funcionamiento o ausencia de expresión de proteínas específicas. Estos hallazgos han encontrado aplicación en la investigación básica y clínica del cáncer. Los avances más importantes en el tratamiento sistémico de las neoplasias en general, ha tenido lugar en el conocimiento de la biología molecular y los mecanismos genéticos que regulan el comportamiento biológico de los tumores. El tener conocimiento de las variables clínicas así como de las variables moleculares de cada tumor en forma individualizada, permitirá guiar un tratamiento mas específico y con mayor probabilidad de éxito.

Recientemente se han descrito distintos polimorfismos en la vía NER y su asociación con la respuesta a la quimioterapia basada en platino, así como en la supervivencia global en neoplasias diversas. El papel específico de los polimorfismos y su verdadero impacto en el área clínica de la oncología, son hasta este momento desconocidos.

Este trabajo de investigación busca encontrar nuevas asociaciones entre polimorfismos de los genes ERCC1 y XPA (proteínas que participan en la vía NER), en pacientes con tumores germinales de testículo; neoplasias por si solas altamente quimiosensibles, que basan su tratamiento sistémico en el platino.

ANTECEDENTES

Quimioterapia basada en platino

El cáncer de testículo representa del 1 al 5% de todos los cánceres en el hombre, siendo la neoplasia más frecuente en menores de 45 años (1,2). El 90% de los casos corresponden a tumores de células germinales de testículo (TCGT; seminomas y no seminomas). (3,4). Los marcadores tumorales séricos (Deshidrogenasa Láctica (DHL), Alfa Feto Proteína (AFP) y la Fracción Beta de la Hormona Gonadotropina Coriónica Humana (HGC-FB)) son relativamente específicos y son indispensables en el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de estos tumores. Hasta este momento, el nivel en suero de los marcadores tumorales, la histología y el estadio clínico al momento del diagnóstico, son tomados en cuenta para la obtención de un pronóstico y como guía en la decisión terapéutica (5).

Desde 1987 el tratamiento estándar de los TCGT en estadios II-IV se basa en la administración de quimioterapia con Bleomicina, Etopósido y Platino (BEP), alcanzando una supervivencia a 5 años de 70-80%; sin embargo, cerca del 20-30% de los pacientes no responderán a este esquema de tratamiento (platinorefractarios) y tendrán una evolución desfavorable, con progresión de la enfermedad y un potencial desenlace fatal (6). La causa de esta resistencia al platino, continúa siendo hasta este momento desconocido (7).

Sensibilidad del Platino

Los mecanismos de acción del platino en tumores germinales y la causa precisa de su tan elevada sensibilidad, no se conocen con exactitud, pero uno de los mecanismos de acción más estudiados es mediante la formación de uniones covalentes con el DNA de la célula tumoral, ocasionando 3 tipos de daño: a) monoadductos, b) uniones dentro de la misma cadena (intracatenarios) y c) uniones entre cadenas del DNA de la célula tumoral (intercadenarios)(8-10), cambiando su configuración espacial, y propiciando su apoptosis.

Otros mecanismos de acción del platino menos estudiados y posiblemente no tan directamente relacionados con la tan elevada tasa de respuesta, son la interrupción de la polimerización de la actina y ruptura del citoesqueleto de la célula, la interacción con los fosfolípidos y fosfatidilserina de la membrana celular, y el daño a el DNA mitocondrial.

Resistencia al platino

Existen varios mecanismos por los cuales se cree que se desarrolla resistencia al platino:

- 1) Por disminución de la acumulación de la droga dentro de la célula
- 2) Por aumento de la expulsión de la droga de la célula
- 3) Por inactivación de la droga por compuestos sulfuro (glutación –metalotineinas)
- 4) Por resistencia de la célula al daño producido al DNA (formación de un “puente” que salta las uniones covalentes del DNA con el platino)
- 5) Por aumento en los mecanismos que reparan el segmento de DNA alterado.**

De todos los antes mencionados, el mecanismo de aumento en la reparación del DNA es sin duda de los más minuciosamente estudiados, y en este mecanismo se distinguen otras tres formas de reparación del DNA:

- 1) Reparación por escisión de bases (BER);
- 2) Reparación por escisión de nucleótidos (NER), y**
- 3) Reparación por mal apareamiento de las bases (MMR) (11-13).

Estudios in vitro e in vivo han mostrado que de estos mecanismos de reparación, el mecanismo vía NER es posiblemente el más importante. Este mecanismo de reparación, consiste en el reconocimiento del daño del DNA a través de la proteína XPC, que actúa como sensor del sitio dañado. La proteína XPA se une entonces al DNA dañado (previamente reconocido por XPC), verificando la lesión y promoviendo el reclutamiento de otras proteínas, que se encargaran de delimitar y eliminar el daño en el DNA. La proteína de replicación A (RPA) se une a XPA, sirviendo de soporte para la actividad del factor de transcripción IIH (TFIIH) que es un complejo de proteínas con actividad de helicasas 3'→5' y 5'→3' (XPB y XPD respectivamente). La incisión del daño se lleva a cabo por la endonucleasa XPG, la cual corta la cadena en el extremo 3'; mientras que el extremo 5' es cortado por el complejo XPF-ERCC1; una vez extraído el daño, se lleva a cabo la polimerización del DNA mediante la polimerasa delta, utilizando como molde la cadena complementaria (14-19).

Actualmente existe suficiente evidencia que muestra que un hiperfuncionamiento en la capacidad de reparación del DNA (dañado por el platino) mediante la vía NER, es posiblemente el mecanismo más importante en el desarrollo de resistencia al tratamiento; en esta vía, el gen ERCC1 y el gen XPA juegan un papel medular: cualquier situación que sobreexpresa (los genes ERCC1 y XPA), o que por otro lado que se manifieste en un hipofuncionamiento de estas proteínas, podría traducirse en una disminución o aumento en la sensibilidad al tratamiento con cisplatino respectivamente. (20,21)

Con respecto a los tumores germinales de testículo y la expresión de ERCC1 y XPA, diversas líneas de investigación han mostrado que existe una fuerte asociación entre la expresión de estos genes y la resistencia al platino (a mayor expresión, mayor resistencia). (22,23,24,25)

Los polimorfismos de los genes ERCC1 y XPA resultan en mutaciones silenciosas que podrían interferir con la función de sus respectivas proteínas (20)(21). Ya existen estudios que han mostrado asociación entre la presencia de los polimorfismos de la vía NER y la supervivencia, periodo libre de enfermedad y tasas de respuesta a la quimioterapia basada en platino en otro tipo de neoplasias: cáncer de pulmón, cáncer de ovario, y cáncer de colon (26,27,28), mostrando resultados consistentes: “ la presencia de polimorfismos de la vía NER se asocia con un mejor pronóstico”.

Hasta este momento, el efecto de la presencia de polimorfismos de ERCC1 y XPA no ha sido descrita en pacientes con tumores germinales de testículo, en donde podría encontrarse asociada al pronóstico, al fenotipo maligno y tener un papel como factor predictivo, en aquellos pacientes candidatos a recibir tratamiento adyuvante a base de platino.

OBJETIVOS:

Determinar la genotipificación de los polimorfismos C8092A de ERCC1 y 5'UTR de XPA en pacientes con tumores germinales de testículo en estadios avanzados y correlacionarlos con las características clínicas y la respuesta a la quimioterapia basada en cisplatino.

HIPOTESIS:

Los polimorfismos C8092A del gen ERCC1 y 5'UTR de XPA en los pacientes con TCGT en estadios avanzados, se asocian a una mejor respuesta al tratamiento con quimioterapia basada en platino, a un mejor perfil clínico y a una mejor sobrevida global

METODOLOGIA

Diseño del estudio

- Es un estudio prospectivo, transversal, descriptivo y observacional.

Tamaño de muestra

Se realizó el cálculo de la muestra en base a la sobrevida de pacientes con tumores testiculares no seminomas de un estudio previo retrospectivo, (35) para obtener un poder del 80% y una significancia de $p=0.05$ (2 colas) y detectar una diferencia en sobrevida global de 21% a 5 años (45% para el grupo de pacientes con genotipo C/C y 66% para el grupo de pacientes con genotipo heterócigo (C/A) y homócigo (A/A) para el polimorfismo en pacientes con tratamiento con quimioterapia (BEP), hipotetizando una disminución en sobrevida para los individuos que no poseen el polimorfismo .

$P1=0.45$ y $P2=0.66$; $Z_{\alpha/2}=1.96$, $\alpha=0.2$ y $Z_{\alpha}=0.84$, $pM=0.55$, $qM=0.49$, $d=0.21$

Utilizando la formula: $N= (Z_{\alpha/2}+Z_b)^2 (2) pM qM$

d^2

Obtenemos un cálculo de 99 pacientes por brazo.

Debido a que el alelo C es del 52% en población mexicana, necesitamos 52 pacientes del genotipo CC o CA, en total 104 pacientes.

Población de estudio

- Pacientes con tumores germinales de testículo del Instituto Nacional de Cancerología, que cumplan con los criterios de inclusión.

Criterios de inclusión

- Pacientes con TCG de testículo
- Estadios II, III y IV de la clasificación Royal Marsden
- Vírgenes al tratamiento con quimioterapia (Bleomicina, Etopósido y Platino)
- Mayores de 15 años y menores de 60 años.
- Karnofsky ≥ 70 y/o ECOG ≤ 2 .
- Firma del consentimiento informado para tomar tanto la biopsia durante la orquiectomía, como la muestra de sangre periférica
- Determinación sérica de marcadores tumorales antes de la realización de orquiectomía radical

Criterios de exclusión

- Pacientes que hayan recibido tratamiento con quimioterapia previo a la orquiectomía
- Pacientes que se hayan hecho la orquiectomía fuera del INCan
- Expedientes que no contengan la información completa

Criterios de eliminación

- Retiro del consentimiento informado
- Pacientes que hayan recibido otro tratamiento de quimioterapia distinto a BEP, como primera línea de tratamiento

Obtención de muestras de sangre periférica

Se tomará una muestra de 5 ml de sangre periférica a cada uno de los pacientes que cumplan con los criterios de inclusión para llevar a cabo la determinación de los polimorfismos C8092A del gen ERCC1 y 5'UTR de XPA. Previa firma de una carta de consentimiento informado aprobada por los Comités de Investigación y de Ética del Instituto Nacional de Cancerología

Amplificación del polimorfismo de C8092A del gen ERCC1 y 5'UTR de XPA mediante la técnica de PCR

El DNA genómico se extraerá a partir de muestras de sangre periférica de pacientes con cáncer de testículo, mediante la utilización de Fenol/Cloroformo/Proteinasa K.

Para determinar el polimorfismo 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 el caso del polimorfismo 5'UTR de XPA los primers son los siguientes:

Sentido: 5'-CTA GGT CCT CGG AGT GGT CC-3'

Antisentido: 5'-GCC CAA ACC TCC AGT AGC C-3'

Para la reacción de PCR se utilizarán 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 productos amplificados son fragmentos de 255pb y 204pb respectivamente. La amplificación se verificará mediante electroforesis en gel de agarosa al 3%.

Análisis de los polimorfismos C8092A del gen ERCC1 y 5'UTR de XPA por RFLP's

Para identificar el polimorfismo de ERCC1 el producto de PCR se digerirá con la enzima de restricción Mbo II (New England Biolabs), la cual 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. Mientras que para el polimorfismo 5'UTR de XPA el producto se digerirá con la enzima *BspEI* que reconoce el sitio 5' T/CCGGA 3'.

Obtención de biopsia

La biopsia se obtendrá inmediatamente después de la realización de la orquiectomía, manteniendo la muestra en RNA later para evitar la degradación del material.

Análisis de expresión de XPA, ERCC

A partir de las biopsias obtenidas, se llevará a cabo la extracción de RNA y se realizará RT-PCR para cada uno de los genes de interés utilizando primers específicos para la amplificación de cada uno de ellos, previamente diseñados.

XPA

Sentido 5'-GCACCACTGTACCCAGG-3'

Antisentido 5'-TAGTCCCCACTGTTCCACC-3'

ERCC1

Sentido 5'- CCTGGGAATTTGGCGACG-3'

Antisentido 5'-GCGGAGGCTGAGGAACAG-3'

EVALUACION DE LA RESPUESTA Y SEGUIMIENTO

Todos los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión, que contaban con muestra sanguínea y biopsia, fueron estadificados mediante una Tomografía Axial computarizada de abdomen y pelvis y una tele de torax antes del inicio del tratamiento. Todos aquellos pacientes con evidencia de lesiones pulmonares metastásicas por tele de torax fueron también evaluados con TAC de torax y mediastino, y en presencia de sospecha de actividad tumoral en sistema nervioso central, se les realizó además una TAC de cráneo para descartar actividad tumoral a este nivel. Todos los pacientes fueron etapificados según las guías de la Royal Marsden y agrupados en grupos pronóstico según el consenso internacional de tumores germinales

Los pacientes fueron tratados de acuerdo a las guías internacionales de tratamiento (de forma homogénea), con quimioterapia a base de Bleomicina, Etopósido y cisplatino, y tuvieron un seguimiento mensual, con medición de marcadores tumorales durante el curso del tratamiento para evaluar la respuesta al mismo, así como trimestral para detectar recurrencia o persistencia de la enfermedad.

En todos los pacientes se determinó la quimiosensibilidad o resistencia de acuerdo a la negativización de los marcadores tumorales, y en todos se documentaron las características histológicas de los tumores.

Se tomó como única fuente de información el expediente electrónico del Instituto Nacional de Cancerología (IncaNet).

ANALISIS ESTADISTICO

Todas las variables clínicas (edad, estadio clínico, grupo pronóstico, fecha de diagnóstico, recurrencia, resistencia al tratamiento con quimioterapia) e histológicas (tipos y subtipos histológicos, permeación linfovascular, etc), fueron vertidas en una base de datos y fue analizada mediante el programa SPSS.

DEFINICION DE LAS VARIABLES

VARIABLES INDEPENDIENTES

EDAD

1. Definición operativa
Se medirá el número de años cumplidos en expediente electrónico al momento del diagnóstico
2. Tipo de variable
Cuantitativa discreta
3. Unidad de medición
Años

TIPO HISTOLOGICO

1. Definición operativa
Tipo histológico en el reporte histopatológico del expediente electrónico
2. Tipo de variable
Cualitativa nominal
3. Categorías de la variable:
 - a. Seminoma
 - b. No seminoma

SUBTIPO HISTOLOGICO

1. Definición operativa
Subtipo histológico en el reporte histopatológico del expediente electrónico
2. Tipo de variable
Cualitativa nominal
3. Categorías de la variable:
 - a. Coriocarcinoma
 - b. Carcinoma embrionario
 - c. Tumor de senos endodérmicos
 - d. Teratoma

ESTADIO CLINICO

1. Definición operativa
Se medirá según los criterios de la Royal Marsden
2. Tipo de variable
Cuantitativa discreta
3. Unidad de medición
 - a) I
 - b) II
 - c) III
 - d) IV

GRUPO PRONOSTICO

1. Definición operativa
Definición obtenida según criterios pronósticos del consenso internacional
2. Tipo de variable
Cualitativa nominal
3. Categorías de la variable:
 - a) Buen pronóstico
 - b) Pronóstico intermedio
 - c) Pobre pronóstico

VARIABLES DEPENDIENTES

RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON QUIMIOTERAPIA (BEP)

1. Definición operativa
Definida por presencia de negativización, o ausencia de negativización de marcadores tumorales
4. Tipo de variable
Cualitativa nominal
5. Categorías de la variable:
 - a) Sensible
Negativización de marcador tumoral durante el tratamiento con quimioterapia
 - b) Resistente
Ausencia de negativización del marcador tumoral durante el tratamiento con quimioterapia

SOBREVIDA GLOBAL

1. Definición operativa

Se medirá el tiempo en meses desde la fecha de diagnóstico, hasta la fecha de muerte. (datos obtenidos del expediente electrónico)

2. Tipo de variable

Cuantitativa discreta

3. Unidad de medición

meses

PERIODO LIBRE DE ENFERMEDAD

1. Definición operativa

Se medirá el tiempo en meses desde la fecha de término de la quimioterapia, hasta la fecha de documentación de recurrencia (por elevación de marcador tumoral)

2. Tipo de variable

Cuantitativa discreta

3. Unidad de medición

meses

X. CONSIDERACIONES ÉTICAS

1. PROCESO DE OBTENCION DE MUESTRAS

A todos los pacientes que sean candidatos a ingresar al protocolo se les proporcionará y explicará el consentimiento informado, también se les manifestará verbalmente que se utilizarán muestras sanguíneas para el análisis de los polimorfismos de interés, así como una biopsia obtenida de la orquiectomía para el estudio de expresión de los genes a estudiar. Como se describe en el consentimiento informado, el paciente tendrá la libertad de retirarse del estudio de manera voluntaria si así lo desea.

2. PROCESO DE OBTENCIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

Se entrevistará a las pacientes diagnosticados con TCGT de reciente ingreso al INCAN que se vayan a llevar a orquiectomía radical. Se les informará detalladamente en que consiste el protocolo y los beneficios que esta investigación puede proporcionarles en cuanto a respuesta al tratamiento basado en cisplatino y los efectos en la supervivencia. También, se les hará entrega de una copia del consentimiento informado.

Se les dará información explícita de la elaboración del estudio y como se llevarán a cabo los ensayos biológicos.

El presente estudio cumple con los requisitos de la Declaración de Helsinki, la Ley General de Salud y las normas de Buenas Prácticas Clínicas.

RESULTADOS

Del periodo comprendido entre abril del 2008 hasta junio del 2009, se capturaron un total de 72 pacientes en quienes fue posible la obtención de muestra sanguínea y biopsia del tumor germinal del testículo. Se excluyeron a 47 pacientes que no cumplían con los criterios de inclusión (pacientes en estadio clínico I, no candidatos a recibir quimioterapia adyuvante); de los 25 restantes, 23 pacientes eran del tipo no seminomatoso (TGTNS) y 2 del tipo seminoma. Tuvieron que ser eliminados 7 pacientes en quienes se carece de información acerca del seguimiento clínico y de la respuesta al tratamiento con quimioterapia. De los 16 pacientes restantes, el DNA se degradó y no fue posible su amplificación en 2 pacientes, dejando para el análisis final un total de 14 pacientes. Se incluyó en el análisis a un paciente en EC I, pero que fue catalogado como de pobre pronóstico, y que recibió además tratamiento adyuvante con quimioterapia a base de BEP 4 ciclos

De los 14 pacientes que se incluyeron en el análisis final, 6 tumores eran del tipo no seminoma (42.9%) y 8 del tipo seminoma (57.1%).

Las características generales de la población de estudio se encuentran en la tabla 1. La media de edad fue de 26 años. Se presentaron 3 muertes durante el seguimiento, todas secundarias a progresión de la enfermedad y falta de respuesta al tratamiento con quimioterapia.

La histología más frecuente fue la de teratoma (71.4%), y la mayoría del grupo correspondió a pacientes con estadios clínicos II y III (35.7 % para ambos), con pronósticos buenos, intermedios y pobres del 28.6%, 28.6% y 6% respectivamente.

Tabla 1. Características generales

VARIABLE	MEDIA % (n)
HISTOLOGIA	
CORIOCARCINOMA	14 (2)
SENOS ENDODERMICOS	64.3 (9)
TERATOMA	71.4 (10)
CARCINOMA EMBRIONARIO	50 (7)
ESTADIO CLINICO	
II	35.7 (5)
III	35.7 (5)
IV	21.4 (3)
I	7.1 (1)
GRUPO PRONOSTICO	
BUENO	28.6 (4)
INTERMEDIO	28.6 (4)
POBRE	6 (42.9)
RECURRENCIA	7.1 (1)
MUERTE	21.4 (3)

Encontramos que un 35.7% de los pacientes fue catalogado como resistente al tratamiento con quimioterapia y un 64.3% se catalogó como sensible al mismo (tabla 2). Las frecuencias de presentación de los distintos genotipos se encuentran plasmados en la tabla 3.

Tabla 2. Respuesta a la quimioterapia

RESPUESTA A LA QUIMIOTERAPIA	% (n)
Sensible	64.3 (9)
Resistente	35.7 (5)

Tabla 3

GENOTIPO ERCC1	% (numero)
Wild type (wt C/C)	35.7 (5)
Heterocigoto (C/A)	50 (7)
Polimorfico (A/A)	14.3 (2)
GENOTIPO XPA	% (numero)
Wild type (A/A)	42.9 (6)
Heterocigoto (A/G)	35.7 (5)
Polimorfico (G/G)	21.4 (3)

No se encontró ninguna asociación entre la expresión de los genotipos (silvestre (wt), heterócigo o polimórfico) con las distintas variables clínicas (estadío clínico, nivel de marcadores tumorales, etc) e histopatológicas (subtipo histológico) (tabla 4 y 5); Pero si se apreció una tendencia hacia la presencia de características histológicas (presencia de invasión linfovascular) y clínicas) de pobre pronóstico (presencia de un mayor número de metástasis a pulmón) en aquellos pacientes que NO presentaron el polimorfismo de ambos genes (ERCC1 y XPA), aunque en ninguna de ellas con significancia estadística.

Tabla 4

VARIABLES	GENOTIPOS ERCC1			TOTAL	P
HISTOLOGICAS	WT C/C	HETERO C/A	POLI A/A		
Con Inv Cordón Espermático	1	1	0	2	0.79
Sin Inv Cordón Espermático	4	6	2	12	
Con Inv Linfocascular	2	1	0	3	0.78
Sin Inv Linfocascular	3	6	2	11	
CLINICAS					
Grupo pronóstico Pobre					
SI	3	2	1	6	0.67
Otro	2	5	1	8	
Metástasis a Pulmón					
Presentes	3	3	0	6	0.35
Ausentes	2	4	2	8	

Tabla 5

VARIABLES	GENOTIPOS XPA			TOTAL	P
HISTOLOGICAS	WT A/A	HETERO A/G	POLI G/G		
Con Inv Cordón Espermático	2	0	0	2	0.21
Sin Inv Cordón Espermático	4	5	3	12	
Con Inv Linfocascular	3	0	0	3	0.078
Sin Inv Linfocascular	3	5	3	11	
CLINICAS					
Grupo pronóstico Pobre					
SI	3	1	2	6	0.38
Otro	3	4	1	8	
Metástasis a Pulmón					
Presentes	4	2	0	6	0.16
Ausentes	2	3	3	8	

Al comparar la tasa de respuesta a la quimioterapia entre los diferentes genotipos, se puede apreciar una tendencia a presentar una mayor resistencia a la quimioterapia cuando NO se expresa el polimorfismo tanto de ERCC1 como de XPA, aunque sin alcanzar un nivel de p con valor estadísticamente significativo. (tabla 6)

Tabla 6. Genotipos de ERCC1 y XPA y respuesta a la Qt

ERCC1	Sensible	Resistente	Total
WT C/C	3	2	5
Hetero C/A	4	3	7
Poli A/A	2	0	2

P=0.52

XPA	Sensible	Resistente	Total
WT A/A	3	3	6
Hetero A/G	3	2	5
Poli G/G	3	0	3

P=0.32

El único paciente que presentó recurrencia, presentó un genotipo silvestre (wild type) tanto de ERCC1 como de XPA.

En las figuras 1 y 2 se presentan las curvas de Kaplan Meyer para sobrevida global y su asociación con la expresión de los distintos genotipos, observándose una clara tendencia hacia una mejor sobrevida con la presencia de los polimorfismos de ERCC1 y de XPA, aunque ninguno de ellos alcanzó significancia estadística.

Figura 1. Sobrevida y Genotipos de ERCC1

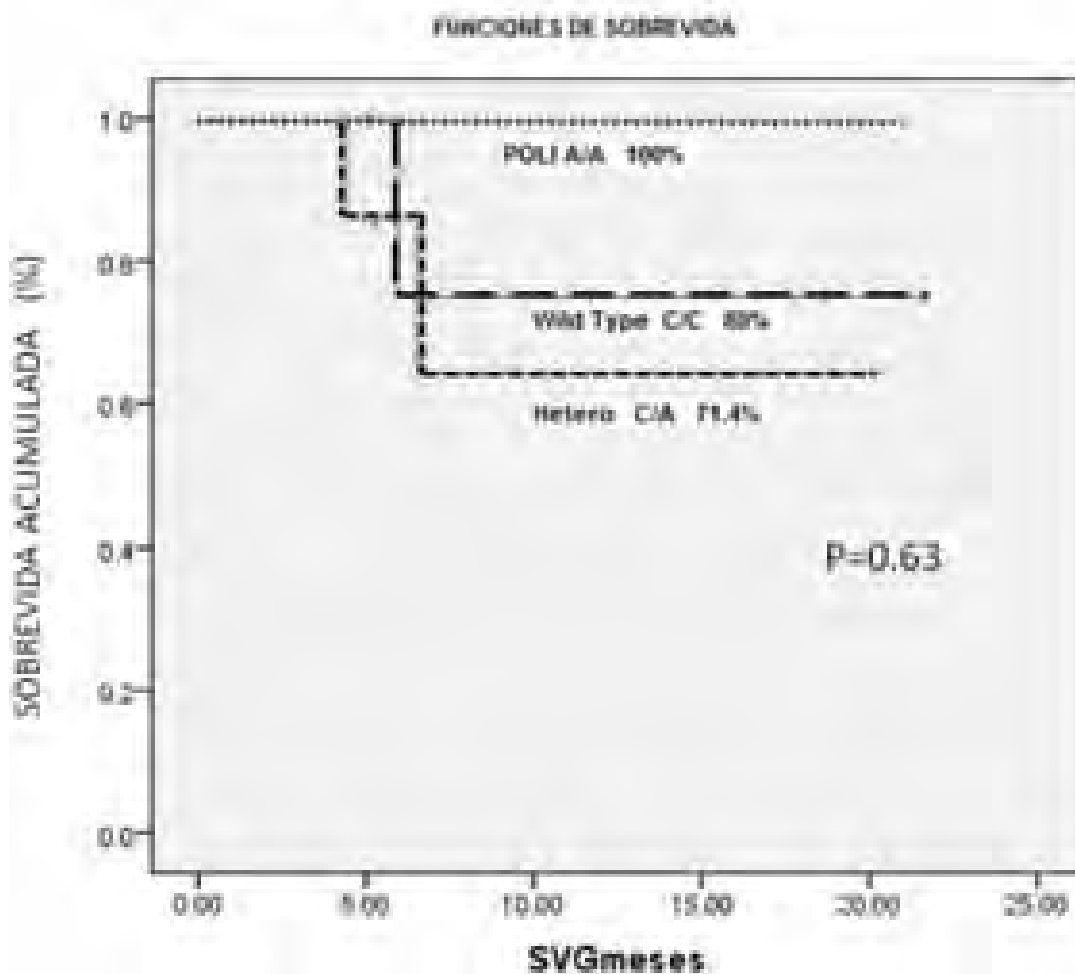
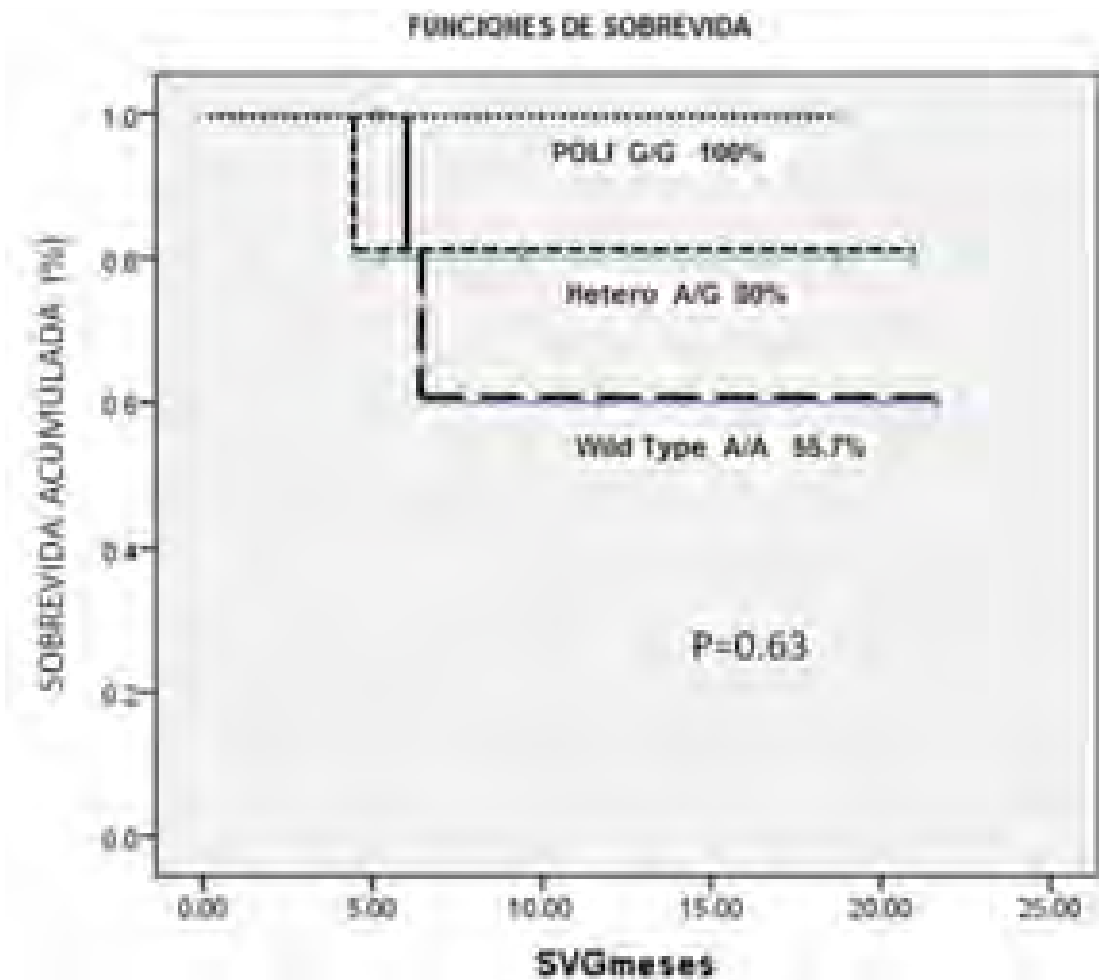


Figura 2. Sobrevida y Genotipos de XPA



DISCUSION

En este trabajo se analizan sólo a pacientes con estadios clínicos avanzados (con presencia de metástasis retroperitoneales en adelante) y que son candidatos a quimioterapia adyuvante, encontrando un mayor porcentaje de pacientes quimiorresistentes al compararlo con el porcentaje global de todos los pacientes con tumores germinales de testículo independientemente del estadio clínico al diagnóstico (37% versus 10% respectivamente).

Otros estudios ya han encontrado asociaciones importantes entre la presencia de polimorfismos de XPA y ERCC1 en otro tipo de neoplasias:

- 1) En ovario: Saldivar y cols, demostraron que distintos polimorfismos de la maquinaria del NER (XPC, XPD exón 10, XPD exon 23) se asociaban a una menor riesgo de muerte y recurrencia en 146 mujeres con cáncer de ovario avanzado (27). Aunque de forma contraria a los encontrado en nuestro trabajo, la presencia de un genotipo XPA heterócigo se asocio a una peor sobrevida y menor periodo libre de enfermedad al compararlo con el genotipo homocigo (wild type)
- 2) En cáncer de colon, Moreno y cols, mostraron que el polimorfismo de ERCC1 podría tener un importante papel en predecir que paciente responderán al tratamiento con platino (28).
- 3) En cáncer cervicouterino avanzado: Chung y cols demostraron una mayor tasa de respuesta al tratamiento con cisplatino en aquellas pacientes que presentaban el polimorfismo de XRCC1. (29)
- 4) En ovario: Kang S y cols, encontraron que la presencia del polimorfismo ASN 118ASN (c-T) de ERCC1, se asociaba a una mayor sensibilidad al tratamiento con platino en 60 pacientes con cáncer de ovario avanzado . (30)

- 5) En pulmon, Zhou y cols demostraron que los pacientes que presentaban el polimorfismo C8092A de ERCC1 tenían una mejor supervivencia global al compararlos con aquellos pacientes que no. (20)

Todas las neoplasias antes mencionadas, tienen el común denominador de basar su tratamiento adyuvante en quimioterapia con platino, al igual que los tumores germinales de testículo, en donde además se añaden bleomicina y etopósido para alcanzar mejores respuestas.

Aunque la farmacodinamia del platino continúa siendo algo no completamente entendido, la mayoría de la información científica producida con este fin, concluye que la respuesta al tratamiento depende básicamente de la efectividad de los mecanismos de reparación del DNA, propiciando una adecuada respuesta al tratamiento en aquellas células neoplásicas que no son capaces de reparar el daño infligido al DNA por el platino. (31-33)

Aunque no se alcanzó un poder estadísticamente significativo (por el tamaño de la muestra), en estos resultados preliminares se observan tendencias reportadas por otros autores: la presencia de los polimorfismos se asocia con mejores tasas de supervivencia y un mejor perfil clínico de los pacientes: tendencia a tener características clínicas más agresivas (presencia de metastasis pulmonares, peor estatus pronóstico (según el consenso internacional)), recurrencia y menor supervivencia global), así como características histológicas de mal pronóstico (presencia de permeación linfovascular), en ausencia del polimorfismo de los genes ERCC1 y XPA.(34)

Una posible explicación a estos hallazgos, es que si las proteínas que funcionan en la reparación del DNA (XPA y ERCC1) no funcionan adecuadamente debido a la presencia de polimorfismos, esto se traduciría en una mejor tasa de respuesta y por consiguiente una mejor supervivencia global.

Es importante recalcar que los resultados aquí presentados son resultado de un análisis preliminar del trabajo, con el fin de visualizar la dirección del proyecto, y no las conclusiones finales del mismo. Aun a pesar de no contar con el tamaño de la muestra calculada, en este primer análisis se han encontrado tendencias importantes que podrían presentar significancia estadística cuando se alcance el tamaño de la muestra calculado.

Este primer análisis impulsa a continuar con el proyecto, con el fin de demostrar diferencias significativas en las variables analizadas.

CONCLUSIONES

En este primer análisis se demostraron tendencias a presentar un perfil clínico más adverso, un aumento en la presencia de permeación linfovascular, y una peor sobrevida, en pacientes con tumores germinales de testículo que no presentan el polimorfismo de los genes XPA y ERCC1, proteínas involucradas en los mecanismo de reparación del DNA. Será necesario continuar con el estudio hasta alcanzar el tamaño de la muestra calculado, para poder demostrar o rechazar con bases científicas, una verdadera asociación entre los polimorfismo de los genes XPA y ERCC1, con el pronóstico, la tasa de respuesta al tratamiento con quimioterapia, y la presencia de un fenotipo maligno, en pacientes con tumores de células germinales de testículo

BIBLIOGRAFIA

1. Gori S, Porrozzì S, Roila F, Gatta G, De Giorgi U, Marangolo M. Germ cell tumours of the testis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2005 Feb;53(2):141-64
2. Farmakis D, Pectasides M, Pectasides D. Recent advances in conventional-dose salvage chemotherapy in patients with cisplatin-resistant or refractory testicular germ cell tumors. *Eur Urol*. 2005 Sep;48(3):400-7.
3. Berney DM. A practical approach to the reporting of germ cell tumours of the testis. *Current Diagnostic Pathology*, Volume 11, Issue 3, Pages 151-161
4. Horwich A, Shipley J, Huddart R. Testicular germ-cell cancer. *Lancet*. 2006 Mar 4;367(9512):754-65
5. Bosl GJ, Motzer RJ. Testicular germ-cell cancer. *N Engl J Med*. 1997 Jul 24;337(4):242-53
6. Mayer F, Stoop H, Scheffer GL, Scheper R, Oosterhuis JW, Looijenga LH, Bokemeyer C. Molecular determinants of treatment response in human germ cell tumors. *Clin Cancer Res*. 2003 Feb;9(2):767-73
7. Damia G, D'Incalci M. Mechanisms of resistance to alkylating agents. *Cytotechnology* (1998); 27:165-173
8. Kartalou M, Essigmann JM. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat Res*. 2001 Jul 1;478(1-2):23-43
9. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*. 2003 Oct 20;22(47):7265-79
10. Longley DB, Johnston PG. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol*. 2005 Jan;205(2):275-92
11. Leibel D, Laspe P, Emmert S. Nucleotide excision repair and cancer. *J Mol Histol*. 2006 Sep;37(5-7):225-38. Epub 2006 Jul 20.
12. Reardon JT, Vaisman A, Chaney SG, Sancar A. Efficient nucleotide excision repair of cisplatin, oxaliplatin, and Bis-aceto-ammine-dichloro-cyclohexylamine-platinum(IV) (JM216) platinum intrastrand DNA diadducts. *Cancer Res*. 1999 Aug 15;59(16):3968-71
13. Reed E. Nucleotide excision repair and anti-cancer chemotherapy. *Cytotechnology* 1998;27:187-201.
14. Sharova NP. How does a cell repair damaged DNA?. *Biochemistry (Mosc)*. 2005 Mar;70(3):275-91
15. Wood RD. Nucleotide excision repair in mammalian cells. *J Biol Chem*. 1997 Sep 19;272(38):23465-8
16. Moggs JG, Szymkowski DE, Yamada M, Karran P, Wood RD. Differential human nucleotide excision repair of paired and mispaired cisplatin-DNA adducts. *Nucleic Acids Res*. 1997 Feb 1;25(3):480-91
17. Hara R, Mo J, Sancar A. DNA damage in the nucleosome core is refractory to repair by human excision nuclease. *Mol Cell Biol*. 2000 Dec;20(24):9173-81
18. Shen MR, Jones IM, Mohrenweiser H. Nonconservative Amino Acid Substitution Variants Exist at Polymorphic Frequency. *Cancer Res*. 1998 Feb 15;58(4):604-8
19. Yu JJ, Mu C, Lee KB, Okamoto A, Reed EL, Bostick-Bruton F, Mitchell KC, Reed E. A nucleotide polymorphism in ERCC1 in human ovarian cancer cell lines and tumor tissues. *Mutat Res*. 1997 Sep;382(1-2):13-20
20. Zhou W, Gurubhagavatula S, Liu G, Park S, Neuberg DS, Wain JC, Lynch TJ, Su L, Christiani DC. Excision Repair Cross-Complementation Group 1 Polymorphism

- Predicts Overall Survival in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated With Platinum-Based Chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2004 Aug 1;10(15):4939-43
21. Reed, E. ERCC1 and Clinical Resistance to Platinum-Based Therapy. *Clin Cancer Res* 2005;11(17)
 22. Metzger R. *J Clin Oncol*; 1998;16 (1): 309-16
 23. Koberle B, Roginskaya V, Zima KS, Masters JRW, Wood RD. Elevation of XPA Protein Level in Testis Tumor Cells Without Increasing Resistance to Cisplatin or UV Radiation. *Curr Biol* 1999; 9 (5): 237 -6
 24. Welsh C. *Int J Cancer* 2004; 110 (3): 351-61
 25. Dabholkar. *Biochem Pharmacol* 2000; 60 (11): 1611-9
 26. Wu X, Zhao H, Wei Q. *et al.* XPA polymorphism associated with reduced lung cancer risk and a modulating effect on nucleotide excision repair capacity. *Carcinogenesis.* 2003;24:505-9.
 27. Saldivar JS, Wu X, Follen M, Gershenson D. Nucleotide excision repair pathway review I: implications in ovarian cancer and platinum sensitivity. *Gynecol Oncol.* 2007 Oct;107(1 Suppl 1):S56-71. Epub 2007 Sep 19.
 28. Moreno V. Polymorphisms in Genes of Nucleotide and Base Excision Repair: Risk and Prognosis of Colorectal Cancer *Clin Cancer Res* 2006;2101 12(7) April 1, 2006
 29. Chung HH, Kim *et al.* XRCC1 R399Q polymorphism is associated with response to platinum-based neoadjuvant chemotherapy in bulky cervical cancer; *Gynecologic Oncology* 103 (2006) 1031–1037
 30. Kang S, *et al.* *Experimental & Molecular medicine* 2006; 38:320-29
 31. Larminat F, Bohr VA. Role of the human ERCC-1 gene in gene-specific repair of cisplatin-induced DNA damage *Nucleic Acids Research*, 1994, Vol. 22, No. 15 3005 3010
 32. Kelland L, The resurgence of platinum based cancer chemotherapy. *Nature Reviews*; 2007; 7: 573-583
 33. Brabec . Molecular aspects of resistance to antitumor platinum drugs. *Drug Resist Updates.* 2002; 5: 147- 161
 34. Lippard JS. *Et al.* Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Rev* 2005;4:307-320.
 35. Hernández y col., ERCC1 C8092A genotype and XPA expression is associated with cisplatin-resistance and poor prognosis in non-seminomatous germ cell cancer patients. Manuscrito en preparación.

APENICE I

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Introducción

A usted se le está solicitando que participe en un estudio de investigación. Antes de que usted tome una decisión es importante que entienda por qué se hace la investigación, como se usará su información, lo que abarcará el estudio y los posibles beneficios.

¿Cuáles son los antecedentes y el propósito del estudio?

Usted tiene cáncer de testículo y posterior a su orquiectomía es necesario llevar a cabo tratamiento con quimioterapia. El estudio pretende determinar en su muestra de sangre y en su biopsia ciertos genes que probablemente nos ofrezcan una predicción de la respuesta clínica previa al tratamiento químico. Usted no conocerá los resultados de estos análisis ya que por el momento no pueden ofrecer un criterio para su tratamiento, sin embargo, los resultados que se obtengan probablemente ayudarán a mejorar el tratamiento de otros pacientes en el futuro.

¿Tengo que participar?

Usted decide si desea participar o no en el estudio. Incluso si se rehúsa a participar en el estudio clínico no tendrá ninguna desventaja, incluyendo tratamiento y atención médica que tiene derecho a recibir. Si decide participar se le dará la forma de consentimiento informado para que la firme.

¿Qué me sucederá si participo?

Si usted elige participar en este estudio, se realizará su historia clínica, ésta incluirá la colección de toda la información previa sobre su tumor, que pase una exploración física (que incluye peso, talla, presión arterial, temperatura y pulso), evaluación topográfica abdominal y estudios de laboratorio incluyendo marcadores tumorales Alfa Fetoproteína, Fracción Beta de la Hormona Gonodotrópica Humana, deshidrogenasa láctica. Estos estudios son procedimientos de rutina para ayudar a sus médicos a tratar su cáncer, adicionalmente se tomará un fragmento de la biopsia al finalizar su orquiectomía, así como muestra de sangre de 5 ml para propósitos del estudio. Estos estudios no interferirán con el diagnóstico y tratamiento estándares de su enfermedad

¿Cuáles son los posibles beneficios de participar?

Usted no obtendrá ningún beneficio directo de este estudio. Sin embargo, se espera que los resultados obtenidos brinden mayor información acerca de la enfermedad que usted sufre en afán de mejorar las estrategias terapéuticas para los pacientes que la padecen. Usted recibirá el manejo considerado estándar para cáncer de testículo.

¿Cómo se usarán mis datos personales?

Al firmar esta forma da su consentimiento a su médico del estudio y a su personal para recopilar y procesar sus datos personales del estudio ("datos del estudio"), incluyendo lo siguiente: Su fecha de nacimiento, sexo, origen étnico y datos personales sobre su salud física o mental o su padecimiento. Su consentimiento para utilizar sus datos del estudio no tiene una fecha específica de expiración, pero usted puede discontinuar su consentimiento en cualquier momento notificando a su doctor del estudio.

Tiene el derecho de solicitar la información sobre cualquier dato personal que el doctor del estudio pueda retener de usted. También tiene el derecho de solicitar que se corrija cualquier equivocación en sus datos personales. Si desea hacer alguna petición, sírvase contactar al doctor del estudio en primera instancia. Si retira su consentimiento, el doctor del estudio ya no utilizará sus datos del estudio ni la compartirá con otros.

Por lo que al firmar esta forma yo consiento al uso de los datos de Estudio como se describe en la misma.

¿A quién debo contactar si necesito más información o ayuda?

Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo

Subdirección de Investigación Básica. INCan

Av. San Fernando No.22 Col. Sección XVI. Delegación Tlalpan. México D.F

Tel. 56-28-04-00 ext. 115

Biol. Julia Rosalinda Mendoza Pérez

Laboratorio carcinogénesis. INCan

Av. San Fernando No.22 Col. Sección XVI. Delegación Tlalpan. México D.F

Tel. 56-28-04-00 ext. 168

Cel. 044-55-18-24-65-45

Si usted tiene alguna pregunta sobre sus derechos como sujeto de investigación, usted puede ponerse en contacto con el Comité de Ética:

Dr. Juan Zinzer Sierra

No. de teléfono: 56 55 47 66.

He recibido información verbal sobre el presente estudio y he leído la información por escrito anexa.

Me dieron la oportunidad de discutir el estudio y hacer preguntas.

Estoy de acuerdo en participar en el estudio y estoy consciente que mi participación es por completo voluntaria.

Entiendo que me puedo retirar en cualquier momento sin que esto afecte mis cuidados en el futuro.

Al firmar esta información y forma de consentimiento acepto que mis datos personales. Incluyendo los datos relacionados con mi estado físico o mental o padecimiento y raza u origen étnico, pueden ser utilizados como se describe en esta forma de consentimiento.

Entiendo que recibiré una copia firmada de esta información y forma de consentimiento.

Firma del sujeto

Fecha de la firma.

Nombre del Sujeto (CON LETRA DE MOLDE Y MAYÚSCULAS)

Firma de la persona que realiza la conducción
De la discusión del consentimiento informado

Fecha de la firma

Nombre de la persona que realiza la discusión del consentimiento informado. (CON LETRA DE MOLDE Y MAYÚSCULAS)

La firma del representante legalmente aceptable debe agregarse si el sujeto es incapaz de firmar por él mismo. Debe mencionarse la relación entre el sujeto y el representante legalmente aceptable. La firma de 2 testigos imparciales debe agregarse.

Firma del representante legalmente aceptado

Fecha de la firma

Nombre del representante legalmente aceptado (CON LETRA DE MOLDE Y MAYÚSCULAS)

Relación del representante legalmente aceptado con el sujeto (CON LETRA DE MOLDE Y MAYÚSCULAS)

Domicilio del representante legalmente aceptado

Número de teléfono del representante legalmente aceptado

Firma del testigo imparcial 1

Fecha del testigo imparcial 1

Nombre del testigo imparcial 1 (CON LETRA DE MOLDE Y MAYÚSCULAS)

Relación del testigo imparcial 1 con el sujeto (CON LETRA DE MOLDE Y MAYÚSCULAS)

Domicilio del testigo 1

Número telefónico del testigo 1

Firma del testigo imparcial 2

Fecha de la firma del testigo imparcial 2

Nombre del testigo imparcial 2 (CON LETRA DE MOLDE Y MAYÚSCULAS)

Relación del testigo imparcial 2 con el sujeto (CON LETRA DE MOLDE Y MAYÚSCULAS)

Domicilio del testigo 2

Número telefónico del testigo 2