



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO DEL POLIMORFISMO 5'UTR DE XPA
EN LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO BASADO
EN CISPLATINO DE PACIENTES CON TUMOR
DE CÉLULAS GERMINALES DE TESTÍCULO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

EUNICE FABIAN MORALES



DIRECTOR DE TESIS:

DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO

2009



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.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Fabian
Morales
Eunice
56 58 54 06
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología

2. Datos del asesor

Dr.
Luis Alonso
Herrera
Montalvo

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Martha Patricia
Ostrosky
Shejet

4. Datos del sinodal 2

M. en I.B.B.
Clementina
Castro
Hernández

5. Datos del sinodal 3

M. en C.
Alejandro
López
Saavedra

6. Datos del sinodal 4

Biól.
Julia Rosalinda
Mendoza
Pérez

7. Datos del Trabajo escrito

Efecto del polimorfismo 5'UTR de XPA en la respuesta
al tratamiento basado en cisplatino de pacientes
con Tumor de Células Germinales de Testículo.
90 p

2009

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Carcinogénesis de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del Instituto de Investigaciones Biomédicas y el Instituto Nacional de Cancerología bajo la Dirección del Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo.

A mis padres, con mucho cariño, gracias por creer y confiar siempre en mí, apoyándome incondicionalmente en todas las decisiones que he tomado en la vida.

A mi hermano y a toda mi familia por sus consejos e incentivos en cada paso que doy.

A mis abuelitos, gracias por su amor y por los maravillosos recuerdos que me dejaron.

A ti, Galvéz por tu entrega e infinito amor, agradezco tu paciencia, apoyo y sobre todo las lecciones aprendidas.

A todos aquellos que estuvieron en algún momento de mi vida para escucharme, darme aliento y motivarme a seguir adelante.

Agradecimientos

Al Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo por haberme aceptado como miembro de su laboratorio, por su apoyo y observaciones en el desarrollo de esta tesis.

A Julia por su dedicación e invaluable apoyo para la realización de este trabajo, que también es suyo, y sobre todo por brindarme su amistad y confianza.

A la M. en IBB. Clementina Castro Hernández por sus enseñanzas y consejos que en todo momento me fueron de gran ayuda no solo para la realización de esta tesis, gracias Clemen, por ser una excelente persona.

Al M. en C. Alejandro López Saavedra por compartirme parte de sus conocimientos y por las aportaciones brindadas para este trabajo.

A la Dra. Patricia Ostrosky Shejet por darme parte de su tiempo para la revisión y enriquecimiento de la presente tesis.

Al Dr. Carlos Alberto Hernández Hernández por la propuesta inicial y por el gran apoyo en el área clínica.

A todos los integrantes del laboratorio de carcinogénesis de los cuales he aprendido mucho, y con los que he cultivado una bonita amistad.

A todos mis amigos de Oaxaca, de la Facultad y a todos aquellos que he conocido en el camino, porque con su cariño y apoyo he logrado concretar esta meta... GRACIAS

ÍNDICE

RESUMEN	8
ABSTRACT	10
INTRODUCCIÓN	12
CÁNCER	12
TUMOR DE CÉLULAS GERMINALES DE TESTÍCULO	13
EPIDEMIOLOGÍA	15
<i>Incidencia</i>	15
<i>Etiología y Factores de Riesgo</i>	16
GENÉTICA	17
PRONÓSTICO Y TRATAMIENTO DE TCGT	18
CISPLATINO	19
<i>Mecanismo de acción</i>	19
<i>Respuesta celular al cisplatino</i>	22
EL CASO PARTICULAR DE TCGT	24
MAQUINARIA DE REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE NUCLEÓTIDOS (NER)	27
<i>Mecanismo molecular de NER</i>	27
<i>NER y sensibilidad al cisplatino en TCGT</i>	30
XPA	32
SNPs COMO HERRAMIENTA PARA EL ESTUDIO DE XPA EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE TCGT	33
POLIMORFISMO 5'UTR DE XPA.....	34
HIPÓTESIS	36
OBJETIVOS	36
OBJETIVO GENERAL	36
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
METODOLOGÍA	37
OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE POBLACIÓN MEXICANA APARENTEMENTE SANA.....	37
ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA	37

OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE TCGT	38
<i>Criterios de inclusión</i>	38
<i>Criterios de exclusión</i>	39
EXTRACCIÓN DE DNA DE MUESTRAS DE TCGT EMBEBIDAS EN PARAFINA	39
<i>Primera Parte</i>	39
<i>Segunda Parte</i>	40
<i>Tercera Parte</i>	41
AMPLIFICACIÓN DEL POLIMORFISMO 5'UTR DE XPA MEDIANTE PCR	42
GENOTIPIFICACIÓN DEL POLIMORFISMO 5'UTR DE XPA	43
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	45
RESULTADOS	46
POLIMORFISMO 5'UTR DE XPA	51
<i>Muestras de Población mexicana aparentemente sana</i>	51
<i>Muestras de TCGT</i>	53
<i>Análisis de respuesta al tratamiento con BEP respecto al polimorfismo 5'UTR de XPA</i> .	56
DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	64
ANEXOS	72
ANEXO I	72
ABREVIATURAS EMPLEADAS EN EL TEXTO	79
ABREVIATURAS DE MEDIDAS Y REACTIVOS	81
GLOSARIO	82
REFERENCIAS	86

RESUMEN

Los pacientes con tumores de células germinales de testículo (TCGT) presentan una tasa inusual de curación que va de un 80 a un 95%, incluso cuando la enfermedad inicial es avanzada. Los TCGT tienen una incidencia máxima en varones jóvenes de entre 15 y 34 años de edad, siendo el tipo tumoral más común en este rango de edad. Los mecanismos por los cuales los TCGT responden favorablemente al tratamiento con cisplatino se desconocen.

Se ha demostrado que células derivadas de TCGT presentan una capacidad disminuida para remover los aductos formados por el cisplatino, lo que puede explicar la sensibilidad de este tipo de tumores. La reparación por escisión de nucleótidos (NER) es la maquinaria principal encargada de la reparación del daño provocado por el cisplatino, la proteína XPA forma parte importante de este mecanismo. En células de TCGT los niveles de XPA se encuentran disminuidos, además existen estudios en los que sugieren a XPA como un factor importante en la sensibilidad al cisplatino de TCGT.

Recientemente se identificó un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en la región 5' no codificante (UTR) de XPA, el cual se ha relacionado tanto a susceptibilidad a desarrollar cáncer como con la supervivencia de pacientes tratados con cisplatino.

Teniendo en cuenta que los SNPs en la secuencia del gen XPA pueden resultar en alteraciones estructurales en la proteína, y subsecuentemente en la modulación de la capacidad de NER, en el presente estudio se decidió evaluar el polimorfismo 5'UTR de XPA en un estudio retrospectivo.

Se evaluaron 58 casos de TCGT con enfermedad avanzada que fueron tratados con cisplatino en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan) entre los años 2000-2003. El DNA genómico fue extraído a partir de muestras de TCGT embebidas en bloques de parafina para posteriormente ser genotipificadas mediante el análisis de RFLPs.

La media de edad de la población de estudio fue de 25.2, y la supervivencia global (SVG) a 2 años fue del 65% y a 5 años del 59.2%; tanto la SVG como la supervivencia libre de enfermedad (SLE) correlacionaron con las características clínicas de los pacientes.

Aunado al estudio realizado en pacientes, se analizaron muestras de población mexicana aparentemente sana, debido a que no existen estudios previos que analicen la frecuencia de este polimorfismo en nuestra población. Nuestros resultados muestran que tanto la población sana como los pacientes diagnosticados con TCGT poseen frecuencias similares del polimorfismo 5'UTR de XPA, en los que el genotipo heterocigoto (A/G) así como el alelo polimórfico (G) son los más frecuentes.

Al correlacionar la respuesta al tratamiento, SVG y SLE con la presencia del polimorfismo no encontramos diferencias estadísticamente significativas, sin embargo, existe una tendencia clara de aquellos pacientes que poseen el genotipo A/A presenten una mayor SVG y un mayor intervalo de SLE comparados con los genotipos A/G y G/G. En cuanto a los alelos, se presenta la misma tendencia, sin llegar a ser estadísticamente significativo, dado que la presencia de al menos un alelo polimórfico (G) confiere una menor SVG y SLE, dichos resultados pueden ser consecuencia de un tamaño de muestra limitado.

El presente estudio es el primero en determinar la frecuencia del polimorfismo 5'UTR de XPA tanto en población mexicana como en pacientes con TCGT. Los resultados presentados sugieren al polimorfismo 5'UTR de XPA como un posible modulador de la respuesta en pacientes con TCGT, al tener un impacto en la SVG y SLE, lo que podría generar una herramienta muy importante para el pronóstico clínico de dicha enfermedad. No obstante, aún se requieren estudios posteriores que puedan proveer resultados concluyentes.

Abstract

Testicular germ-cell tumors (TGCTs) show an unusual cure rate, more than 80%, even when initial disease is advanced. TCGTs occur mainly in young men, with a peak incidence between the ages of 15 and 34, and are the most frequently diagnosed cancers in this age group. The mechanisms that determine sensitivity of TGCTs to cisplatin are unknown.

It seems that TGCT cells have a low capacity for remove cisplatin-DNA adducts, this finding might explain the TGCT sensitivity. Nucleotide excision repair (NER) is the main mechanism by which cisplatin-induced damage is removed from DNA, the contribution of the XPA protein is absolutely required for NER. The relevance of XPA protein levels has received particular attention, low amounts of XPA protein might account for the low NER capacity in testis tumor cell lines and consequently explain part of the sensitivity to cisplatin.

Recently, a single nucleotide polymorphism (SNP) was identified in the 5' untranslated region (UTR) of the XPA gene, this SNP has been related with cancer susceptibility as well as in clinical response to platinum chemotherapeutic treatment.

Considering that any variations that may occur in the XPA gene, just as an SNP, might have the potential to affect protein function and subsequently affect NER capacity, we decided evaluate the role of the XPA 5'UTR polymorphism in a retrospective study.

We evaluated 58 patients with advanced TGCT, who had presented for treatment in The Cancerology National Institute (INCan) between 2000 and 2003. Genomic DNA was isolated from TGCT samples and later the genotyping was performed by using a polymerase chain reaction (PCR) restriction fragment length polymorphism-based assay (RFLPs).

The mean age was 25.2 years for all patients, 2- and 5-year overall survival (OS) rates for the 58 patients were 65% and 59.2%, respectively; as much the OS as recurrence-free survival (RFS) rates, correlated with the patients' clinical characteristics.

Parallely, we analyzed mexican seemingly healthy population samples, due to the fact that don't exist previous studies that analyze the frequency of this polymorphism in our population. Our findings show that the healthy population and the TGCT patients exhibited similar XPA 5'UTR polymorphism frequencies, we observed that the heterozygous variant genotype (A/G) and the variant allele (G) were the most frequent.

We correlated the genotype frequency of the XPA 5'UTR polymorphism with patients' response, OS and RFS, and there are clear trends of those patients who possess the A/A genotype exhibit more OS and RFS than those with A/G and G/G genotype. The same tendency showed the alleles analysis, without statistic significance, the patients with at least one variant allele (G) had a shorter median survival and shorter median time to recurrence than individuals with the wild-type allele (A), probably these findings are due to the limited sample size.

To our knowledge, this is the first study to assess the XPA 5'UTR polymorphism in Mexican population as well as in TGCT patients. This study suggests that the XPA 5'UTR polymorphism may modulate platinum chemotherapy response, by the impact in the OS and RFS, these findings could result in improved strategies for the TGCT clinical presage. Nevertheless are necessary posterior studies to draw definitive conclusions.

INTRODUCCIÓN

CÁNCER

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial ¹, lo que lo convierte en un problema importante de salud. Cáncer, es un término genérico empleado para referirnos a más de 100 enfermedades diferentes con diversos factores de riesgo y etiológicos que se originan de la mayoría de los tipos celulares y órganos del cuerpo humano y que se caracterizan por una proliferación exacerbada de células, las cuales son capaces de invadir y propagarse a órganos distantes ².

Todos los tipos de cáncer se desarrollan como resultado de alteraciones genéticas y/o epigenéticas que originan una serie de modificaciones en los patrones de expresión del genoma. Estas alteraciones tienen lugar en un grupo de genes, denominados genes elementales del cáncer, debido a que sus alteraciones contribuyen al desarrollo de este padecimiento. Estos genes son clasificados como oncogenes y genes supresores de tumores cuya ganancia y pérdida de función respectivamente, contribuyen al desarrollo oncogénico²⁻⁴.

La mayoría de las personas que mueren por cáncer sucumben a los tumores metastásicos. Algunos de los tipos tumorales más comunes como el cáncer de pulmón de células pequeñas, ovario, mama y estómago, responden a quimioterapia, pero el impacto en la supervivencia no es significativo ⁵, en la mayoría de los casos existe recaída con enfermedad resistente al fármaco y disminución en la supervivencia global a cinco años (Cuadro 1) ⁶. Tenemos como ejemplo el cáncer de ovario, en el que más del 70% de las pacientes inicialmente responden a la terapia, sin embargo, la supervivencia a cinco años es menor al 25% ⁷. Otro ejemplo se presenta en la tasa de

recaída para cáncer de pulmón de células pequeñas que después del tratamiento con cisplatino es del 95% ⁸. Los tipos de cáncer de cabeza y cuello, por su parte, reciben cisplatino como primera línea de tratamiento, obteniendo solamente una tasa de respuesta de 20-30% ⁷.

Tipo de Cáncer	Tasa de supervivencia a 5 años
Cáncer Pancreático	1.6%
Cáncer de Pulmón	1.7%
Cáncer de Vejiga	5.9%
Cáncer Colorectal	6.9%
Cáncer Cervical	8.6%
Cáncer de Riñón	9.2%
Melanoma	15.9%
Cáncer de mama	19.8%
Cáncer de Ovario	23.3%
Cáncer Endometrial	26.1%
Cáncer de Prostata	29.8%

Cuadro 1. Tasa de supervivencia de cáncer metastásico

Los tumores que pueden ser curados con quimioterapia son relativamente pocos, tales como: leucemias, linfomas, enfermedad de Hodgkin y tumores de células germinales de testículo ⁹. El entender la razón por la que estos tumores son curables con quimioterapia puede conducirnos al desarrollo de tratamientos más efectivos para la lucha contra el cáncer.

TUMORES DE CÉLULAS GERMINALES DE TESTÍCULO (TCGT)

Un claro ejemplo del éxito de la quimioterapia se presenta en los Tumores de Células Germinales de Testículo (TCGT) que a diferencia de muchos de los tumores en estadios avanzados, la mayoría son curables utilizando quimioterapia basada en cisplatino, se

ha reportado una tasa de curación que va de un 80 a un 95%, incluso con enfermedad metastásica ¹⁰⁻¹⁶.

Aproximadamente el 95% de tumores malignos desarrollados en el testículo corresponden a Tumores de Células Germinales (TCG), un término que indica su origen a partir de células germinales primordiales (CGP) ¹⁰. Al parecer, los TCGT tienen su inicio durante el desarrollo fetal e involucran cambios en las CGP ya sea durante la migración a la cresta genital del embrión, o bien, después de que las células llegan a las gónadas (Fig. 1) ¹⁷.

La primera lesión reconocida en el testículo es la neoplasia intratubular de células germinales de tipo no clasificado (IGCNU, por sus siglas en inglés), o también denominado carcinoma *in situ*, donde las células germinales (CG) transformadas son evidentes en el interior de los túbulos seminíferos, y generalmente se considera que esta neoplasia es la precursora de todos los TCGT ^{18,19}. Este precursor normalmente llega a ser un tumor de células germinales invasivo en un período aproximado de cinco años ²⁰.

Los TCGT son clasificados histológicamente en dos grandes grupos: seminomas y no seminomas. Los TCGT no seminomas incluyen tipos celulares múltiples representando varios linajes de diferenciación y estadios del desarrollo embrionario, por su parte, los seminomas, solo se componen de células uniformes parecidas a CGP, que también se caracterizan por índices mitóticos bajos además de un potencial metastásico bajo ^{10,19,11}, estos últimos, comprenden el 40% de todos los TCGT y frecuentemente aparecen en la cuarta década de vida; mientras que los TCGT no seminoma representan cerca del 60% de todos los TCGT y frecuentemente aparecen en la tercera década de vida²¹.

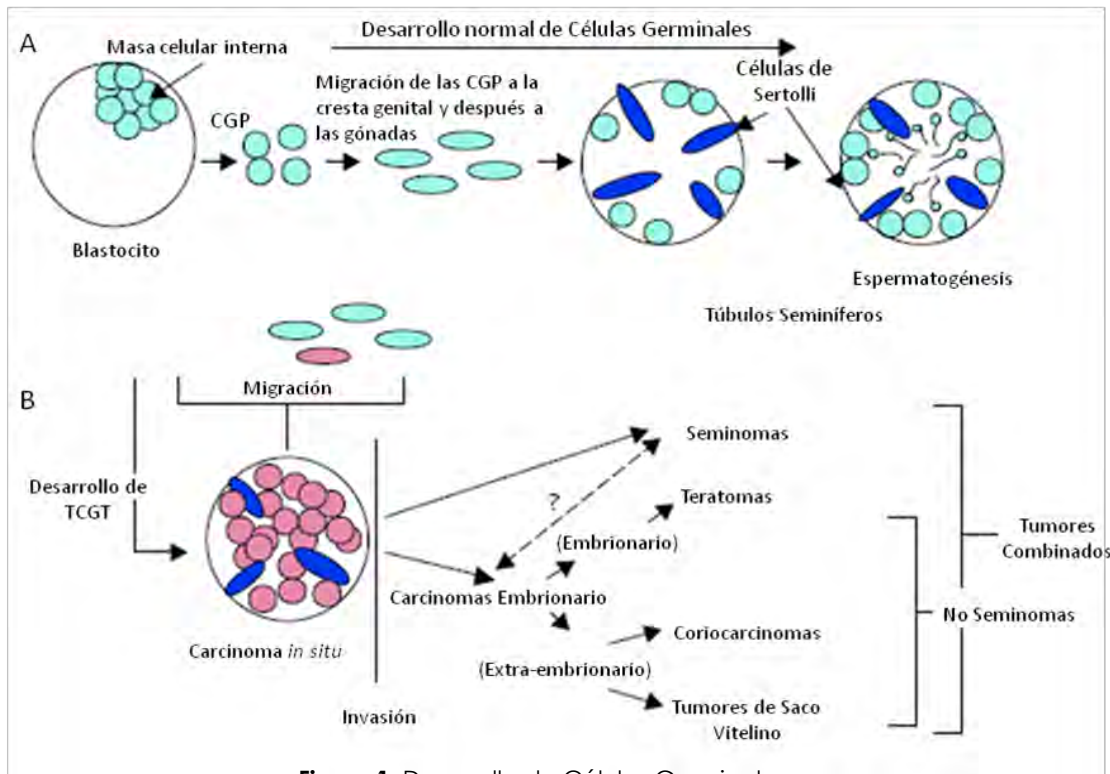


Figura 1. Desarrollo de Células Germinales

A. Modelo de origen e histogénesis.

B. Modelo de origen e histogénesis de diferentes subtipos de tumores de células germinales de testículo.

Modificado de Horwich, A., et al. 2006

EPIDEMIOLOGÍA

Incidencia

A diferencia de la mayoría de tumores sólidos, los TCGT tienen su máxima incidencia en la adolescencia y en adultos jóvenes²², se presentan principalmente en hombres de entre 15 y 34 años, y son el tipo de cáncer más frecuente en este grupo de edad¹⁰. Aproximadamente 8090 casos nuevos de TCGT fueron pronosticados para el año 2008 en Estados Unidos presentando una incidencia de 4 por cada 100,000 varones, por su parte, en México se presentaron 1,186 casos en el año 2002, con una incidencia de 2.4 por cada 100,000 hombres^{23,24}.

En los últimos años se ha producido un incremento progresivo en la incidencia de estos tumores

sobre todo en población caucásica. En países en vías de desarrollo este incremento es significativamente menor, de forma que en África, el Caribe y Asia la incidencia suele ser menor de 2 casos por cada 100,000 hombres ²⁵. En Europa, sin embargo, presenta una incidencia elevada, alrededor de 8 a 10 casos por 100,000 varones en países como Dinamarca, Suiza, Alemania, Noruega y Hungría. Por otro lado países como Gran Bretaña, Francia o Italia presentan niveles medios, mientras que en España o Grecia los niveles son bajos, con aproximadamente 3.8 casos por cada 100,000 varones ²⁶. En general, se ha reportado un incremento anual de 3-6% en población caucásica ^{27,28}.

Etiología y Factores de Riesgo

Las diferencias en la incidencia de las poblaciones mundiales, y la persistencia de estas a pesar de las migraciones, evidencian la importancia de la interacción entre factores genéticos y ambientales para el desarrollo de TCGT; aún cuando ambos factores parecen jugar un papel en esta enfermedad, su importancia aún no es clara ²⁹.

La realidad es que, actualmente la etiología de los TCGT es desconocida. El único factor de riesgo confirmado es la criptorquidia, la cual está asociada con el 10% de los casos e incrementa el riesgo 2.5-11 veces más ^{29,21}.

Por otro lado, existen factores para los cuales la evidencia es sugestiva pero no indiscutible, tales como: niveles altos de estrógenos *in útero*, atrofia, hernia inguinal, infertilidad y antecedentes familiares de TCGT, característica presente en el 2% de los casos ^{21,30-33}.

Síndromes con desarrollo anormal testicular también están asociados con un incremento en el riesgo a desarrollar tumores de células germinales, tales como el síndrome de Klinefelter (47XXY) ³⁴, Disgénesis XY ³⁵, y síndrome de Down (trisomía del cromosoma 21) ³⁶.

GENÉTICA

Por lo regular los TCGT, presentan hiperploidía y frecuentemente son triploides o tetraploides ³⁷.

Por otro lado, el isocromosoma 12, denominado i(12p), es la única aberración cromosómica estructural consistente, presente en más del 90% de los casos de TCGT, es considerado un marcador genético específico y ha sido identificado en todos los subtipos histológicos y en el carcinoma *in situ*, sugiriendo que pudiera ser un cambio genético inicial asociado con el origen de los TCGT (Fig. 2) ³⁸.

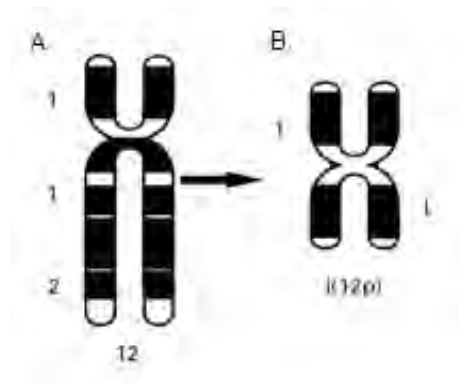


Figura 2. Marcador genético de Tumores de Células Germinales de Testículo.

A. Cromosoma 12 normal

B. Isocromosoma 12 i(12p)

Modificado de Bosl, G., et al. 1997.

PRONÓSTICO Y TRATAMIENTO DE TCGT

Los TCGT tienen una tasa de curación muy alta comparada con la mayoría de tumores sólidos, sin embargo, antes del tratamiento con quimioterapia el pronóstico de los pacientes era malo. Fue a mediados de los años 70's cuando se introdujo el primer régimen quimioterapéutico basado en cisplatino combinado con vincristina y bleomicina (PVB) resultando en la remisión completa en el 70 a 80% de los pacientes con TCGT metastásico ³⁹. En 1987 se comparó PVB versus bleomicina, etopósido y cisplatino (BEP) demostrándose un mejor perfil de toxicidad y supervivencia con BEP, por lo que desde entonces se considera la terapia estándar en estadios avanzados II-IV⁴⁰.

Los TCGT seminoma tienen una respuesta al tratamiento mayor al 90%, y para pacientes con enfermedad temprana el porcentaje se aproxima al 100%. En el caso de los pacientes con tumores no seminoma la respuesta es mayor al 80% en estadios I y II, en el caso de estadios III y IV la tasa es aproximadamente del 70% con quimioterapia estándar y resección de enfermedad residual en caso necesario ²¹.

En general, si el cáncer está confinado al sitio primario (estadio I) puede ser curado con cirugía o radioterapia, pero si el cáncer es metastásico, la quimioterapia es necesaria.

A pesar del éxito obtenido con el cisplatino existe un 20-30% de pacientes que no responden al tratamiento por lo que se utilizan segundas líneas de tratamiento con respuestas globales del 23% ⁴¹⁻⁴⁴.

CISPLATINO

Uno de los compuestos más exitosos, el *cis*-Diaminodicloroplatino(II), o cisplatino (Fig. 3), se ha conocido desde 1845, pero no fue hasta 1970 que se estableció su actividad antitumoral ⁴⁵⁻⁴⁷. Es así que los beneficios clínicos del cisplatino como antineoplásico se han reconocido durante más de 30 años ⁴⁸. El cisplatino tiene un efecto amplio contra diversos tipos de cáncer epitelial y se ha convertido en un agente fundamental en los regímenes terapéuticos contra el cáncer de testículo, ovario, cervical, hígado, cabeza y cuello entre otros ⁴⁹.

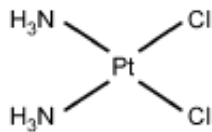


Figura 3. Estructura química del cisplatino

Mecanismo de acción

El cisplatino entra a la célula por difusión pasiva, aunque existen algunas evidencias de que la captación puede en parte, ocurrir por un mecanismo de transportación activa ⁴⁵. Una vez que el cisplatino entra a la célula, este se activa al intercambiar uno o ambos iones cloro (grupo saliente) por moléculas de agua ^{7,50,51}, lo que la convierte en una molécula con carga positiva capaz de interactuar con moléculas biológicas dentro de la célula, incluyendo DNA, RNA, fosfolípidos de membrana, microfilamentos que constituyen el citoesqueleto y otras proteínas (Fig.4) ^{7,45}.

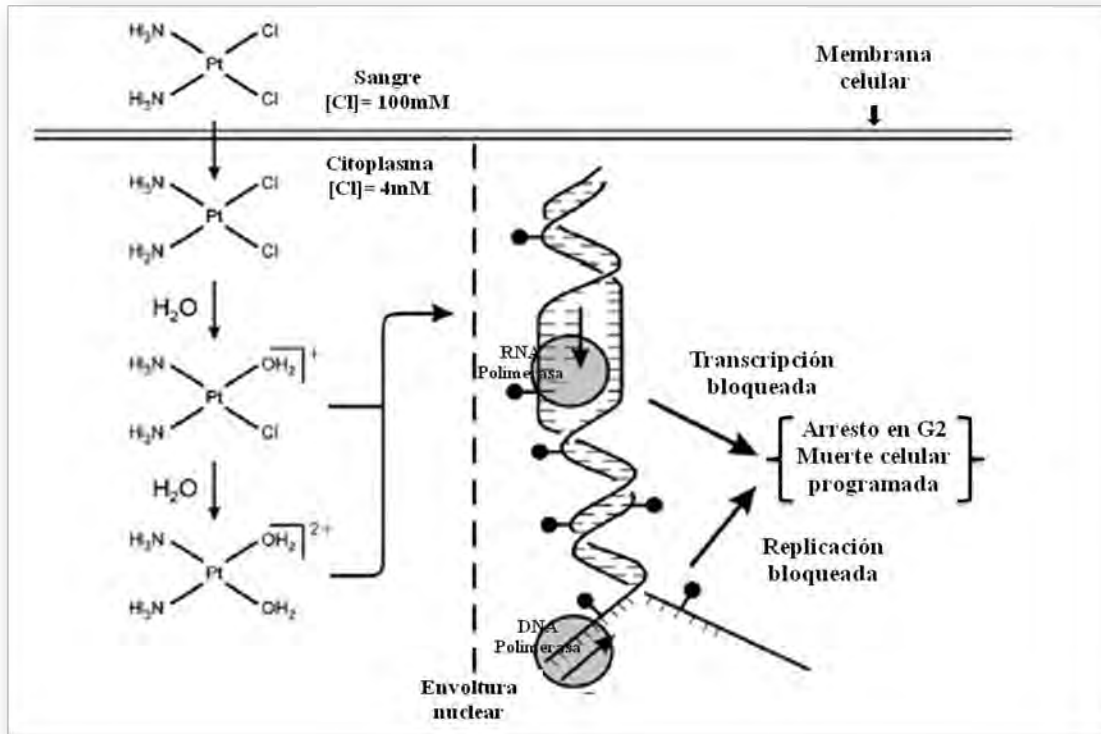


Figura 4. Mecanismo de acción del cisplatino. El cisplatino es administrado intravenosamente, permaneciendo estable e inactivo en sangre, dado que la concentración de cloruro es alta (~100 mM), una vez que el cisplatino entra al citoplasma de la célula, donde la concentración de cloro es mucho menor (~ 4 mM), inicialmente se favorece la sustitución de un ligando de cloro, el cual es reemplazado por una molécula de agua (+), una segunda hidrólisis puede llevarse a cabo en el otro ligando de cloro (2+), en ambos casos se obtiene un complejo con carga positiva que puede reaccionar con sitios nucleofílicos de macromoléculas intracelulares para formar aductos con proteínas, RNA y DNA. La formación de aductos resulta en la inhibición de la replicación del DNA, transcripción del RNA, arresto en la fase G2 del ciclo celular, y/o muerte celular programada. Modificado de Kartalou y Essigmann, 2001.

El efecto citotóxico del cisplatino es el resultado de su interacción covalente con el DNA⁵², reaccionando preferencialmente con los átomos de nitrógeno en la posición 7 de la guanina y en menor grado de la adenina⁵³, lo que resulta en la formación de aductos mono- y bifuncionales^{50,54}.

Los aductos bifuncionales pueden formar uniones inter- e intracatenarias, lo que puede provocar distorsiones en la estructura del DNA, involucrando doblamiento y

desenrollamiento de la doble hélice ⁵⁰. Las uniones intracatenarias son los productos más abundantes de la interacción: 1,2-d(GpG) (corresponde al 60-65% de todos los aductos) y 1,2-d(ApG) (20-25%). El cisplatino también puede formar uniones intercatenarias entre guaninas localizadas en hebras opuestas del DNA siendo estas uniones 2-3% de los aductos formados entre el cisplatino y el DNA (Fig. 5) ^{8,51,55}.

Estos aductos también pueden contribuir al efecto citotóxico del fármaco debido al impedimento que esto ocasiona en los procesos celulares que requieren de la separación de las dos hebras de DNA, como es el caso de la replicación y la transcripción ⁵⁰. La formación de aductos es el primer paso de una serie compleja de reacciones que finalmente llevan a muerte celular por apoptosis ⁵³.

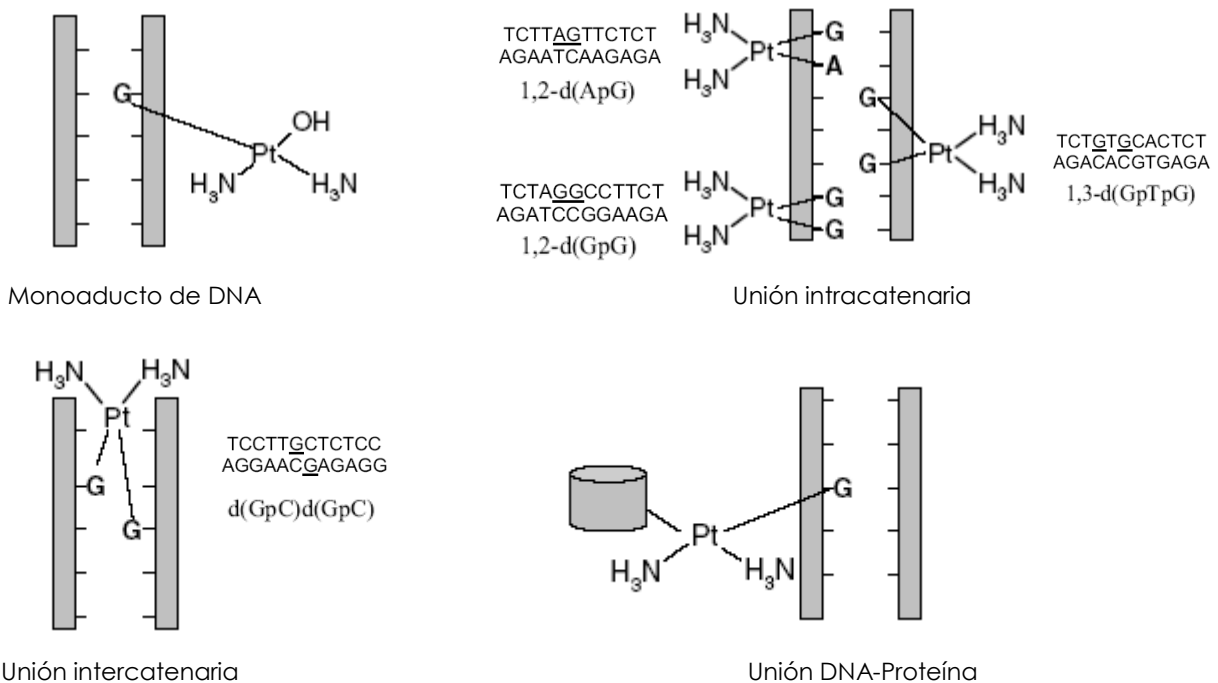


Figura 5. Representación esquemática de aductos formados por el cisplatino. Modificado de Rabik y Dolan, 2007.

Como parte del mecanismo de acción del cisplatino, se reconoce que existen proteínas denominadas proteínas de alta movilidad (HMG, por sus siglas en inglés), las cuales presentan una gran afinidad por el DNA distorcionado por el cisplatino, específicamente se unen a los entrecruzamientos intracatenarios 1,2-d(GpG) ^{7,50}. Este grupo de proteínas, especialmente la familia HMGB, se han relacionado directamente con la sensibilidad al cisplatino ^{7,56}. Se propone un mecanismo por el cual actúan, el cual sugiere que al asociarse las HMG's con los aductos formados por el cisplatino bloquean el reconocimiento del daño mediante un 'mecanismo de escudo', y por tanto al no haber reparación, la célula es dirigida a muerte celular ⁵⁶. El complejo formado por DNA-cisplatino-HMGB1 es capaz de bloquear los factores de transcripción, de este modo evitan tanto la transcripción como la replicación. Este bloqueo en los procesos celulares puede ser responsable de enviar señales de daño al DNA lo que resulta en la iniciación de la apoptosis ⁷.

Respuesta celular al cisplatino

En general, existen cuatro mecanismos que influyen en la respuesta de la célula a los fármacos quimioterapéuticos (Fig. 6) ^{11,51,57}:

- ∞ Entrada y salida del fármaco a través de la membrana celular. La concentración intracelular de cisplatino activo puede ser disminuida por una reducción en la entrada o un incremento en la salida del fármaco.
- ∞ Activación y detoxificación del fármaco. Los fármacos pueden ser metabolizados ya sea activándolos o detoxificándolos dentro del citoplasma.

- ∞ Acceso del fármaco al DNA. La accesibilidad que tenga el fármaco al DNA puede influenciar la eficiencia de este.
- ∞ Respuesta de la célula al DNA dañado. Esta respuesta finalmente determinará el destino del fármaco.

Además de los ya mencionados, existen otros factores que funcionan fuera de la célula que pueden también influenciar la respuesta de las células cancerosas a la terapia, tal como la vía de administración y la farmacocinética ⁵⁷. Cuando las células de cáncer llegan a ser resistentes a los fármacos, estas tienden a evadir uno de estos mecanismos generales ^{45,58}.

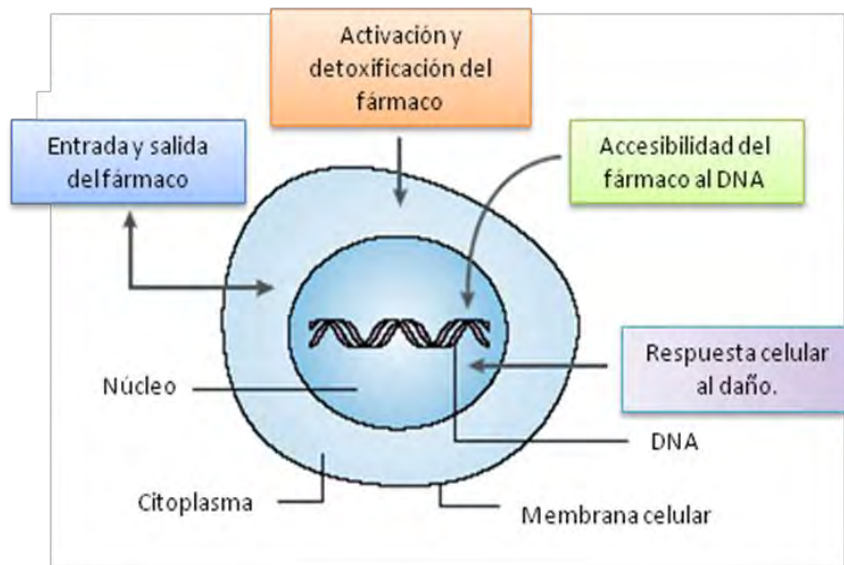


Figura 6. Mecanismos generales que pueden influenciar la respuesta de la célula a los agentes antineoplásicos. Modificado de Masters y Köberle, 2003.

En particular, la resistencia a la quimioterapia basada en cisplatino puede ser intrínseca o adquirida. Algunos tejidos son inherentemente resistentes al cisplatino y no responden al tratamiento, y en otros casos, pueden responder inicialmente, pero eventualmente pueden adquirir resistencia al fármaco, tal es el caso del cáncer de ovario ⁴⁵.

Se reconoce que la resistencia al cisplatino es multifactorial y en general consiste de dos mecanismos:

- i) Aquellos que limitan la formación de aductos en el DNA y/o actuando río abajo de la interacción de cisplatino con el DNA para promover la sobrevivencia celular. La formación de aductos del DNA por cisplatino pueden ser limitados por la reducción en la acumulación del fármaco (proceso de detoxificación), intensificando la salida del cisplatino y la inactivación de este en coordinación con tioles intracelulares y metalotioneinas cuya producción puede ser incrementada como resultado del tratamiento con cisplatino.
- ii) El segundo grupo de mecanismos incluye la intensificación de la reparación de los aductos formados por el cisplatino en el DNA y el incremento en la tolerancia del daño al DNA, evitando así, la muerte celular ^{50,51,59}.

Adicionalmente se han caracterizado otras vías que alteran la expresión de oncogenes que subsecuentemente limitan la formación de aductos de cisplatino con el DNA y la activación de vías antiapoptóticas puede también contribuir a la resistencia celular al cisplatino ⁵⁰.

EL CASO PARTICULAR DE TCGT

Al ser la resistencia la limitante principal del tratamiento exitoso del cáncer, es importante entender los factores y mecanismos que subyacen a esta respuesta, no obstante debemos considerar el efecto contrario, es decir, estudiar aquellos tipos de cáncer en los que se presenta una alta tasa de efectividad, las razones por las cuales estos tipos de cáncer responden de manera favorable a la quimioterapia, puede

llevarnos al desarrollo de un tratamiento más efectivo. Un modelo que ejemplifica este caso son los TCGT, los cuales raramente desarrollan resistencia.

Además de los resultados clínicos, se han realizado diversos estudios en los que se demuestra que las células de TCGT son aproximadamente 2-4 veces más sensibles a los fármacos antineoplásicos comparadas con otros tipos de células cancerosas ⁶⁰⁻⁶². Sin embargo, se desconoce la razón, o mejor dicho, el mecanismo por el cual las células de TCGT son sensibles al cisplatino, podemos especular que probablemente se deba a la acción del fármaco o quizá a las características inherentes de la célula.

Se han realizado diferentes estudios para identificar aquellos mecanismos que determinan la sensibilidad de los TCGT al cisplatino, sin embargo, no se han obtenido resultados determinantes.

A continuación se enlistan aquellos factores que pueden influenciar en la quimiosensibilidad y que han sido estudiados en TCGT:

- ∞ Transporte a través de la membrana; punto en el cual no se encontraron diferencias entre células derivadas de TCGT y líneas celulares de colon y vejiga ⁶³.

- ∞ Activación y detoxificación del cisplatino; se han estudiado tanto el glutatión y las metalotioneinas, no encontrando diferencias con otros tipos celulares de cáncer, indicando que los tioles no son los responsables de la sensibilidad al cisplatino de TCGT ^{63,64}

- ∞ Respuesta al daño al DNA; se han estudiado cuatro aspectos referentes a este punto, estos son:

- Respuesta al estrés. La respuesta a estrés involucra la activación de proteínas de choque térmico (HSPs, por sus siglas en inglés), las cuales son capaces de proteger a la célula después de exposición a agentes quimioterapéuticos. No obstante, no se encuentran diferencias consistentes en los niveles proteicos de las HSPs entre las células de TCGT comparado con células derivadas de cáncer de vejiga y colon ^{65,66}.
- Actividad de p53. Se han encontrado altos niveles de p53, no obstante la presencia de mutaciones en esta proteína se localiza en proporciones bajas en TCGT, aunque no se ha observado correlación con la sensibilidad al cisplatino ⁶⁷.
- Inducción de apoptosis. Varias proteínas involucradas en la regulación de la apoptosis (Bax, Bcl₂ y Bcl-x_L) han sido estudiadas en una serie de muestras clínicas, pero no se ha encontrado correlación con la respuesta al tratamiento de TCGT ⁶⁸.
- Eficiencia en la reparación del DNA. Experimentos realizados en células de cáncer de testículo, demostraron que la remoción de los aductos, llevada a cabo por la Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER, por sus siglas en inglés), del daño al DNA en estas células, es poca o nula, estos hallazgos nos indican que deficiencias en este mecanismo de reparación puede fundamentar la sensibilidad al cisplatino ^{45,69,70}.

MAQUINARIA DE REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE NUCLEÓTIDOS (NER)

Además de las células de TCGT, se ha demostrado que células deficientes en la reparación del DNA son más sensibles al cisplatino que aquellas células capaces de reparar eficientemente ⁴⁵. Esta fue tan sólo una de las observaciones que llevaron a concluir que los mecanismos de reparación son importantes en la respuesta celular al cisplatino.

La maquinaria de NER además de ser el mecanismo principal encargado de la reparación de los aductos formados por el cisplatino en el DNA, también se encarga de reparar el daño causado por radiación UV y otros compuestos que se unen covalentemente al DNA afectando su estructura ^{45,71}.

Por otro lado, la importancia biológica de NER ha sido bien documentada debido a que diversas enfermedades genéticas en seres humanos, tales como xeroderma pigmentosa (XP), síndrome de Cockayne (CS) y tricotiodistrofía (TTD), son asociadas con una disminución en la actividad de NER. Hasta ahora se han identificado siete grupos de complementación para XP (XP-A a XP-G), dos para CS (CS-A y CS-B), y uno para TTD (TTD-A) ⁷².

Mecanismo molecular de NER

Dependiendo de la localización precisa del DNA dañado, el mecanismo NER es conocido como Reparación Acoplada a la Transcripción (TCR) o Reparación del Genoma Global (GGR). El proceso de TCR repara específicamente el daño en genes transcripcionalmente activos, mientras que la GGR elimina el daño de todo el genoma (Fig. 7) ⁷³.

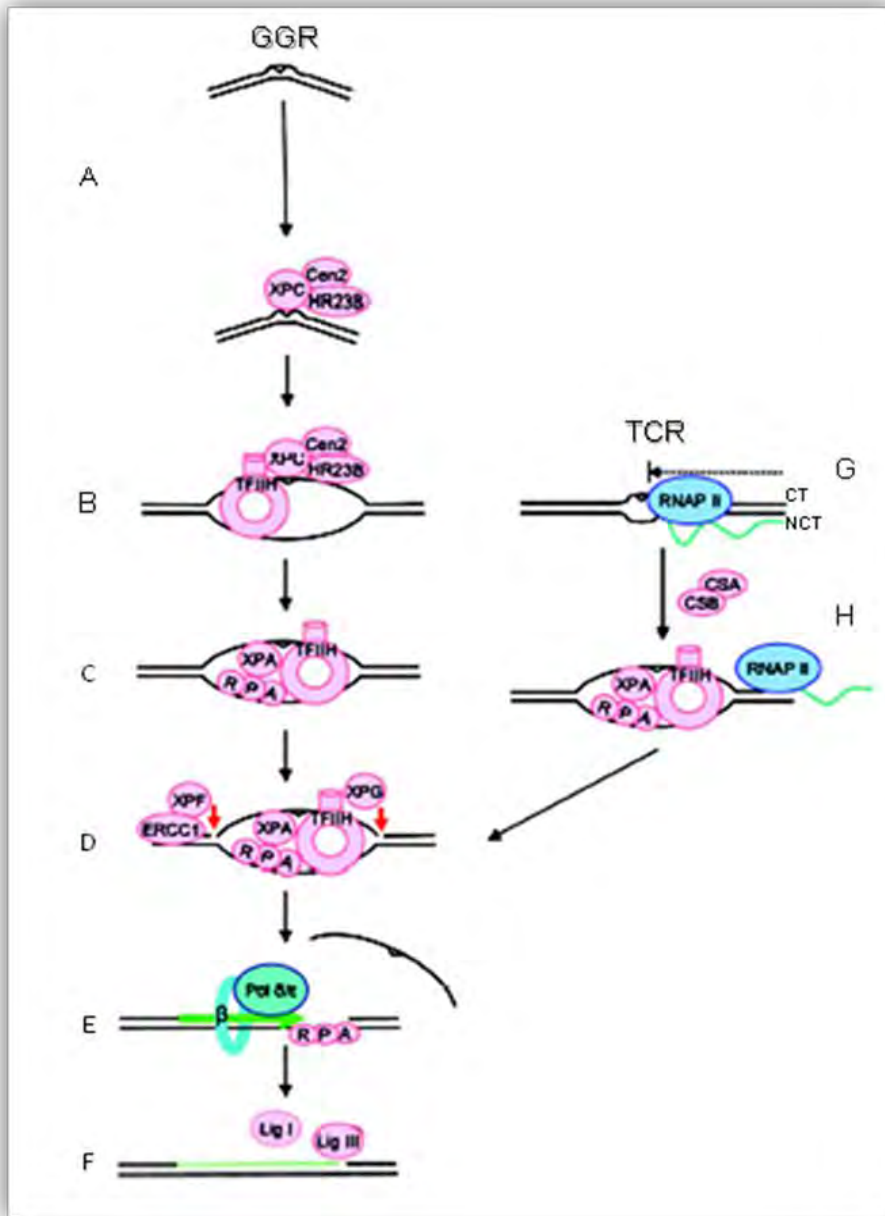


Figura 7. Mecanismo de NER: (A) El DNA dañado es reconocido por el complejo XPC-HR23B-Cen2. (B) Las helicasas XPB y XPD que forman parte de TFIIH abren la cadena en un fragmento de ~30 nucleótidos alrededor del daño. (C) El complejo XPA-RPA se une y desplaza a XPC. RPA se une a la cadena no dañada; XPA, por su parte, puede confirmar la presencia del daño y/o servir para la identificación de la cadena dañada. (D) XPG corta en la cadena dañada en el extremo 3', mientras que ERCC1-XPF lo hacen en el extremo 5'. (E) La lesión es escindida y el hueco resultante es resintetizado por la DNA Pol delta o epsilon, probablemente asociada a PCNA (β). (F) Para después ser sellada por la Ligasa III, con una menor contribución de la Ligasa I. (G) En la reparación acoplada a la transcripción, la RNA Pol II es retenida por el daño en la cadena transcrita (CT) de genes activos y permite la entrada de las enzimas NER. (H) La reparación prosigue como en la de GGR pero requiere de enzimas extra, CSA y CSB, cuya función aún no es clara. Modificado de Nospikel, 2009.

En general el mecanismo NER involucra tres pasos secuenciales:

- i. Reconocimiento del daño y ensamblaje del complejo proteico que lleva a la escisión del DNA que rodea el daño.

- ii. Escisión del DNA dañado y,
- iii. Síntesis y ligación del DNA para reparar el vacío creado por la escisión ⁷³.

Para que la maquinaria NER pueda ser activada se requiere que exista una distorsión o modificación en la estructura de la doble hélice del DNA ⁷¹. Los componentes de NER que reconocen la distorsión son tres subunidades: XPC, HR23B y centrin 2. XPC es una proteína con gran afinidad al DNA dañado, que junto a HR23B son las encargadas del reconocimiento de este daño ^{71,73}. El complejo XPC-HR23B se encuentra casi siempre en asociación con centrin 2, aunque su presencia no es estrictamente requerida para NER, estabiliza el complejo y mejora la actividad de NER ⁷¹.

En el caso de TCR, el bloqueo de la actividad de la RNA Polimerasa (RNA Pol) y su posterior remoción, parece ser el punto crucial para que el daño sea accesible para la reparación, ya que actúa como un marcador para el reconocimiento del daño; la remoción de la RNA Pol requiere de dos factores: CSB y CSA ^{73,74}. Los pasos subsecuentes parecen ser idénticos tanto en GGR como en TCR.

Una vez identificado el daño, el siguiente paso es la abertura de ~30 pares de bases (pb) del DNA alrededor del daño ⁷⁴, esto es llevado a cabo por las helicasas XPB y XPD las cuales forman parte del factor de transcripción TFIIH, un complejo de aproximadamente 10 subunidades con un arreglo estructural parecido al de un anillo, y que además desempeña un papel muy importante en la iniciación de la transcripción de la RNA Pol II ^{71,75}.

XPA es otra proteína que también forma parte de este mecanismo NER e interactúa con RPA, sin embargo, el papel preciso de XPA no es claro. Originalmente se pensaba

que participaba en el reconocimiento del daño junto con XPC, no obstante, recientemente se ha demostrado que XPA es reclutada después de TFIIH y que destituye a XPC ^{71,75}.

Un posible papel de XPA es que puede ser la encargada de identificar la hebra del DNA que contiene el daño, en lugar de reconocer a la no dañada, lo que es relevante, dado que esta identificación es necesaria para asegurar que la reparación se lleve a cabo en la hebra correcta ⁷¹.

RPA por su parte, se une a la hebra no dañada y se ha propuesto como un factor de reconocimiento al daño. Al parecer RPA protege a la hebra no dañada intacta de las nucleasas ^{73,75}. En pasos posteriores, el complejo XPA-RPA interactúa con XPG y el complejo XPF-ERCC1; la interacción XPA-RPA y XPG contribuye a su asociación con el DNA ⁷³.

El siguiente paso es la escisión del DNA dañado, el corte del lado 3' se lleva a cabo por la nucleasa XPG, mientras que el lado 5' es cortado por el heterodímero XPF-ERCC1, y el fragmento escindido es de una extensión aproximada de 24-32 nucleótidos dependiendo de la lesión ^{71,74}.

Finalmente el vacío resultante es llenado por las DNA Polimerasas delta (δ) o épsilon (ϵ), en asociación con PCNA para posteriormente ser sellado por una ligasa ⁷¹. Una vez reparado el daño en el DNA, la maquinaria NER es desensamblada ⁷⁴.

NER y sensibilidad al cisplatino en TCGT

Los primeros estudios enfocados en evaluar NER en TCGT comenzaron comparando la reparación del daño al DNA inducido por cisplatino en células de cáncer de testículo

(platino-sensibles) y de vejiga (platino-resistentes); estos experimentos demostraron que células de cáncer de vejiga sometidas a tratamiento con cisplatino fueron capaces de reparar la mayoría de los daños provocados en el DNA, mientras que las células de cáncer de testículo eliminaron poco o nada del DNA dañado, lo que señala que las células de TCGT tienen una capacidad reducida de reparación vía NER ^{57,76,77}. Esta conclusión también fue señalada en otro estudio, en el que se observó que las células de TCGT son deficientes en la reparación de aductos 1,2-d(GpG) ⁷⁷.

Tiempo después se demostró que el daño a DNA en células de TCGT es retenido por un período amplio comparado con células de cáncer de vejiga, comprobando la primera conclusión, es decir, que células derivadas de TCGT tienen una reducida capacidad de NER, esto no sólo se demostró en el genoma global, sino también a nivel de genes específicos ^{69,70}. De esta forma se confirmó que la reducción de la capacidad de reparación puede contribuir a la hipersensibilidad de las células de TCGT al cisplatino.

Investigaciones posteriores midieron niveles de cada una de las proteínas que participan en la maquinaria NER en dos líneas celulares derivadas de TCGT, encontrando bajos niveles de las proteínas XPA, ERCC1 y XPF, posteriormente este hallazgo fue corroborado en otro estudio, en el que también se compararon las células de TCGT, pero en esta ocasión de seis líneas diferentes, con otras 28 líneas celulares derivadas de diferentes tipos de cáncer en humano. Para determinar si la deficiencia en NER puede ser restaurada, extractos celulares de TCGT fueron suplementados con XPA y ERCC1-XPF, obteniendo una restauración de la capacidad de NER a niveles normales con la proteína XPA, mientras que la adición de XPF-ERCC1 también estimuló la reparación en los extractos, pero el efecto fue menos significativo. Estos resultados

concluyeron que niveles bajos de XPA en líneas celulares de cáncer de testículo pueden explicar una disminución en la eficiencia de la maquinaria NER, indicando que, probablemente XPA sea un factor determinante en la sensibilidad al cisplatino ⁷⁸.

XPA

XPA es una proteína relativamente pequeña de 36 KDa que, como se mencionó anteriormente, forma parte de NER actuando en el centro de esta maquinaria; esta proteína interactúa con el DNA dañado y con otros factores de NER como RPA, TFIIH y ERCC1 ^{70,73,75}. Aunque aún no es claro el papel que desempeña, se reconoce que la contribución de XPA es absolutamente necesaria para NER ^{71,75,79}.

Células humanas con el gen de XPA inactivo o ratones 'knockout' con deficiencias en XPA no tienen capacidad de reparar vía NER, lo que provoca que no puedan eliminar el daño provocado por cisplatino ⁸⁰⁻⁸³. Paralelamente se realizó otro estudio en el que se examinaron los niveles de expresión de RNAm de XPA y ERCC1 en tejidos de cáncer de ovario, encontrando que niveles altos de RNAm de ERCC1 y principalmente de XPA fueron detectados en los tejidos tumorales de pacientes resistentes a la terapia basada en cisplatino, comparados con aquellas pacientes que respondieron a la terapia ⁸⁴. Este fue el primer reporte en sugerir la importancia clínica de la expresión de XPA como determinante en la respuesta a la quimioterapia basada en cisplatino.

Estos datos correlacionan con los encontrados en TCGT por lo que podemos esperar que la cantidad de XPA en células de TCGT influencie significativamente la sensibilidad al cisplatino. Sin embargo, existen reportes en los que esta aseveración no fue comprobada, tal es el caso de un estudio realizado en el 2003 en el que se demostró que la presencia de la proteína XPA, evaluada por inmunohistoquímica, difiere entre

subtipos histológicos de TCGT, así mismo no se encontraron diferencias en cuanto a la presencia de XPA en muestras de TCGT resistentes o sensibles a la quimioterapia, ni correlación entre los niveles de proteína de XPA y la sensibilidad al cisplatino en líneas celulares derivadas de TCGT ⁸².

Además del estudio anterior, recientemente el grupo de investigación de Köberle reportó que la sobreexpresión de XPA en líneas celulares de TCGT no tiene efecto en la sensibilidad a cisplatino ni sobre la sensibilidad a luz UV, lo que lleva a concluir que XPA no juega un papel crítico en la capacidad de NER ⁸⁵. No obstante, las razones por las que estos estudios difieren de los previos aún no se conocen.

SNPs COMO HERRAMIENTA PARA EL ESTUDIO DE XPA EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE TCGT.

Los polimorfismos genéticos refieren a la existencia de más de un alelo para un gen, para que un alelo sea considerado polimórfico debe encontrarse al menos en el 1% de la población. Se considera que los polimorfismos son un tipo de diversidad genética de la población, que pueden manifestarse en el fenotipo de un individuo.

La mayoría de las variaciones genéticas comprenden un cambio de una sola base en la secuencia del DNA, conocidos como polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, por sus siglas en inglés), los cuales ocurren en aproximadamente 1 de cada 1000 nucleótidos ^{86,87}. Dependiendo de donde ocurra un SNP, puede tener diferentes consecuencias a nivel fenotípico. Pueden presentarse SNPs localizados en regiones codificantes de genes que alteran la función o estructura de la proteína, pero la mayoría de SNPs se localizan en regiones no codificantes del genoma ⁸⁸.

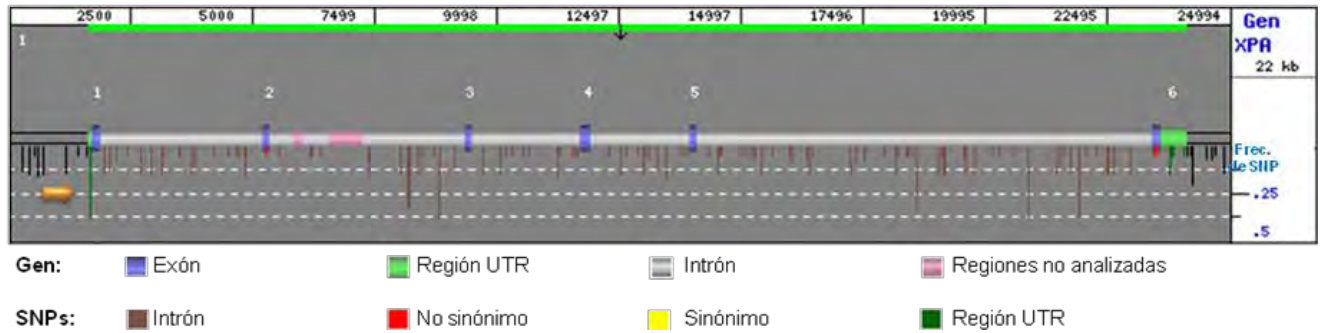
Los SNPs pueden ser usados como marcadores para identificar genes de importancia biomédica para diagnóstico y terapia de una gran variedad de condiciones clínicas^{86,88}. En el caso del cáncer, los SNPs pueden jugar un papel en las diferentes respuestas a los tratamientos en pacientes diagnosticados con esta enfermedad⁸⁹.

A pesar de que el tratamiento en TCGT tiene un gran éxito, existe un porcentaje de pacientes que no responde a este, por lo que en el presente trabajo proponemos a los SNPs como una herramienta potencial para mejorar el pronóstico y tratamiento en este tipo de tumores.

POLIMORFISMO 5'UTR DE XPA

XPA se localiza en el cromosoma 9, en la posición 9q22.3 (Fig. 8). En el año 2000 fue identificado un sitio polimórfico en el gen XPA, específicamente en la región 5' no codificante (UTR, por sus siglas en inglés), el cual consiste en una transición de Adenina a Guanina (A→G) cuatro nucleótidos río arriba del codón de inicio ATG (Fig. 8)⁹⁰. La función de este SNP es desconocida, sin embargo, se ha especulado al respecto: dado que este polimorfismo es localizado próximo al codón de inicio de la traducción, este puede afectar la eficiencia de la traducción de la proteína. Los nucleótidos cercanos al codón de inicio son importantes para que se lleve a cabo la traducción, ya que la subunidad ribosomal 40s se une inicialmente al extremo 5' del RNAm y es posible que la sustitución de una Adenina por una Guanina en la posición en la que se encuentra este polimorfismo pueda afectar la unión ribosomal^{91,92}.

A.



B.

CACTCAGAAAGGCCGCTGGGTGCGGGGAGCGCAGAGGCCGGTGCAGGGCGGCTGGCTCGCCTCGGC
 GTGCAGTGC GCGT GCGTGGAGCTGGGAGCTAGGTCCTCGGAGTGGTCC **GAG** ATG GCG GCG GCC
 GAC GGG GCT TTG CCG GAG GCG GCG GCT TTA GAG CAA CCC GCG GAG CTG CCT GCC TCG GTG
 CGG GCG AGT ATC GAG CGG AAG CGG CAG CGG GCA CTG ATG CTG CGC CAG GCC CGG CTG

Figura 8. A. Representación del gen XPA en el que se muestran los sitios en los que se encuentran SNPs, la flecha señala la ubicación del polimorfismo 5'UTR. **B.** Parte de la secuencia de XPA, en rojo se observa el sitio polimórfico. Modificado de GeneSNPs database del National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS)

Para el polimorfismo 5'UTR de XPA se han realizado estudios tanto de riesgo a cáncer como de respuesta al tratamiento. En el primer caso, existen dos estudios en los que reportaron una asociación entre la presencia del polimorfismo 5'UTR de XPA y un riesgo reducido a padecer cáncer de pulmón, por lo que se demuestra que este SNP puede modular la capacidad de NER^{92,93}.

Por otro lado, en el 2007 se publicó un artículo que presenta los resultados de un estudio realizado en pacientes con cáncer de ovario sometidas a tratamiento con cisplatino, en el que asocian la presencia del genotipo heterocigoto (A/G) del polimorfismo 5'UTR de XPA con un tiempo de supervivencia menor que aquellas pacientes que presentaron el genotipo A/A (genotipo silvestre), es decir, la presencia del polimorfismo está asociada a un pronóstico clínico pobre en cáncer de ovario⁹⁴.

La relevancia de la proteína XPA en la sensibilidad de TCGT al cisplatino ha recibido particular atención, y respecto a ello existen argumentos a favor y en contra, no obstante los polimorfismos encontrados en esta proteína pueden tener efecto en la eficiencia de reparación de las células, de tener algún efecto el estudio del polimorfismo 5'UTR de XPA en pacientes diagnosticados con TCGT podrá contribuir y servir como una herramienta clínica no sólo para el pronóstico, sino también como un marcador predictivo para el tratamiento con cisplatino de estos pacientes. Aunado a ello, en la población mexicana no se han realizado estudios respecto a este polimorfismo, por lo que adquiere importancia ya que este tipo de estudios pueden conducirnos al entendimiento no solo de la respuesta terapéutica, sino también de la susceptibilidad genética a padecer ciertas enfermedades, así como la generación de nuevos blancos para la subsecuente generación de fármacos.

HIPÓTESIS

Los pacientes diagnosticados con TCGT con enfermedad avanzada que presenten el polimorfismo 5'UTR de XPA tendrán una menor respuesta al tratamiento basado en cisplatino, así como una menor Supervivencia Global (SVG) y Supervivencia Libre de Enfermedad (SLE) comparado con aquellos pacientes que tengan el genotipo silvestre.

OBJETIVOS

Objetivo General

Correlacionar el polimorfismo 5'UTR de XPA con la SVG, SLE y respuesta al tratamiento con quimioterapia basada en cisplatino en pacientes diagnosticados con TCGT con enfermedad avanzada.

Objetivos específicos

- ∞ Obtención y extracción de DNA de muestras de bloques de parafina de pacientes diagnosticados con TCGT en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan) entre los años 2000-2003.
- ∞ Determinar el genotipo de las muestras extraídas de TCGT.
- ∞ Determinar la frecuencia del polimorfismo 5'UTR de XPA en una muestra de la población mexicana sana.
- ∞ Definir la respuesta al tratamiento, SVG y SLE de los pacientes con TCGT a partir de expedientes clínicos y correlacionar estas variables con la presencia o ausencia del polimorfismo

METODOLOGÍA

Obtención de muestras de población mexicana aparentemente sana

Las muestras empleadas para población abierta, fueron obtenidas gracias al Banco de DNA del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM (Laboratorio de la Dra. Julieta Rubio), dichas muestras fueron aisladas de leucocitos de individuos aparentemente sanos, no relacionados familiarmente y considerados mexicanos, es decir, que tanto padres como abuelos nacieron en territorio mexicano.

Estimación del tamaño de la muestra

Se realizó una estimación estadística para determinar el tamaño de la muestra en población mexicana aparentemente sana, para ello se tomaron en cuenta las frecuencias del polimorfismo 5'UTR de XPA reportadas en población polaca, ya que es

el único estudio que evalúa este polimorfismo en población abierta, utilizando la siguiente fórmula:

$$n = \frac{Z^2 \alpha/2 (p q)}{B^2}$$

Donde:

$$Z^2 \alpha/2 = 1.96 \text{ (IC 95\%)}$$

$$B^2 = 0.075 \text{ error estándar}$$

p y q = Variabilidad en la población analizada

Estimación del número de individuos necesarios para obtener la frecuencia del polimorfismo con un nivel de confianza del 95%.

$$n = \frac{(1.96)^2(0.38)(0.62)}{(0.075)^2} = 160.9$$

Por tanto el tamaño de muestra para la población debe ser de al menos 161 individuos.

Obtención de muestras de TCGT

En primera instancia se realizó una revisión de expedientes de pacientes diagnosticados con TCGT en el INCan entre los años 2000-2003, con apoyo del médico oncólogo Carlos Hernández se seleccionaron aquellos casos que cumplieron con los criterios de inclusión.

Criterios de inclusión:

- Pacientes diagnosticados con TCGT con enfermedad avanzada.
- Inicio de tratamiento en el INCan entre los años 2000-2003.
- Haber recibido de 3 a 4 ciclos de quimioterapia con BEP.
- Mayores de 14 años y menores de 60 años.

- Contar con bloque de parafina para la extracción de DNA del TCGT.

Criterios de exclusión:

- Pacientes diagnosticados con TCGT en estadios tempranos.
- Pacientes tratados con quimioterapia previo ingreso al INCan.
- TCGT extragonadales.
- Tratados con dos o menos ciclos de BEP.
- Pacientes que posterior al tratamiento con 3 o 4 ciclos de BEP no presentaron estudios de extensión por abandono o cambio de hospital.
- No contar con bloque de parafina en el INCan.
- Aquellos pacientes que desarrollaron un segundo cáncer primario en testículo contralateral.

Extracción de DNA de muestras de TCGT embebidas en parafina

Una vez seleccionados los casos y obtenidos los bloques de parafina se procedió a la extracción del DNA de dichas muestras, para ello se empleó el método de Fenol/Cloroformo/Alcohol isoamílico, el cual se describe a continuación:

Primera parte

Para llevar a cabo la extracción, se utilizaron tres cortes de 20 μm del bloque de parafina, almacenados en tubos con capacidad de 1500 μl , posteriormente se agregó 1 ml de octano y se agitó vigorosamente para después ser colocado en un termoblock a una temperatura de 50°C 10 min, durante este tiempo se procuró la agitación del tubo; una vez pasados los 10 min se procedió a centrifugar a 1300 rpm a 25°C para después extraer el sobrenadante, este procedimiento (a partir del octano) se repitió

dos veces más. Después, se agregó 1ml de etanol (EtOH) al 100% y se agitó para centrifugar posteriormente a 1200 rpm por 3 min a 25°C y se eliminó el sobrenadante, estos dos pasos se repitieron dos veces y una vez más con 500 µl de EtOH al 100%; a continuación se agregaron 500 µl de EtOH al 70% y al igual que los pasos anteriores se centrifugó a 1200 rpm a 25°C 3 min para después eliminar el sobrenadante, y repetir este procedimiento dos veces más. Una vez concluido, se procedió a evaporar el EtOH residual colocando el tubo en un termoblock a 50°C, ya obtenido el tejido sin exceso de EtOH, este se resuspendió en 350 µl de buffer de lisis (50 mM de Tris HCL pH 8.5, 1 mM de EDTA, 0.5% de Tween 20) y 3.5 µl de Proteinasa K (20 mg/ml), por último se incubó a 55°C de 1 a 5 días, dependiendo de la integridad del tejido, dado que la proteínasa K tiene una vida media de dos días, es preciso verificar que el tejido se haya lisado y dependiendo de ello, en algunos casos fue necesario agregar más proteínasa K para lograr la mayor lisis posible.

Segunda parte

Una vez que el tejido se haya lisado se agregaron 350 µl de Fenol/Cloroformo/Alcohol Isoamílico (25/24/1) y se agitó 30 s utilizando vórtex, después se centrifugó a 14000 rpm a 24°C por 5 min, este procedimiento resultó en dos fases, sólo la fase acuosa se pasó a un nuevo tubo y se le agregó 350 µl de cloroformo agitando suavemente con el vórtex aproximadamente 30 s, se continuó con la centrifugación en las mismas condiciones anteriores y nuevamente se recuperó la fase acuosa para ser colocada en otro tubo y así adicionarle 1/10 de Acetato de Sodio 3 M y 2 ½ volúmenes de EtOH frío al 100%, se agitó y se dejó durante una noche a -20°C.

Tercera parte

Pasado el tiempo, se centrifugó a 14000 rpm a 4°C 10 min y se retiró el sobrenadante para agregar 1 ml de EtOH frío al 70% (grado biología molecular) y se centrifugó nuevamente con las mismas condiciones, se retiró el sobrenadante y el tubo se colocó en un termoblock a 55°C durante aproximadamente 5 min, finalmente el pellet resultante se resuspendió en 50 µl de TE (Tris 10 mM/EDTA 0.1 mM).

Una vez terminado el proceso de extracción se procedió a cuantificar la muestra de DNA en un espectrofotómetro (ND-1000, Nanodrop Technologies, Inc., USA), la pureza fue evaluada mediante la relación de lectura 260 nm/280 nm, a 260nm son leídas las bases del DNA y a 280nm, las proteínas; la proporción 260/280 se utiliza para determinar la pureza de extracción, ya que determina el contenido relativo DNA/proteínas, la proporción óptima debe ser 1.8, una proporción menor indica contaminación con proteínas (Fig. 9).

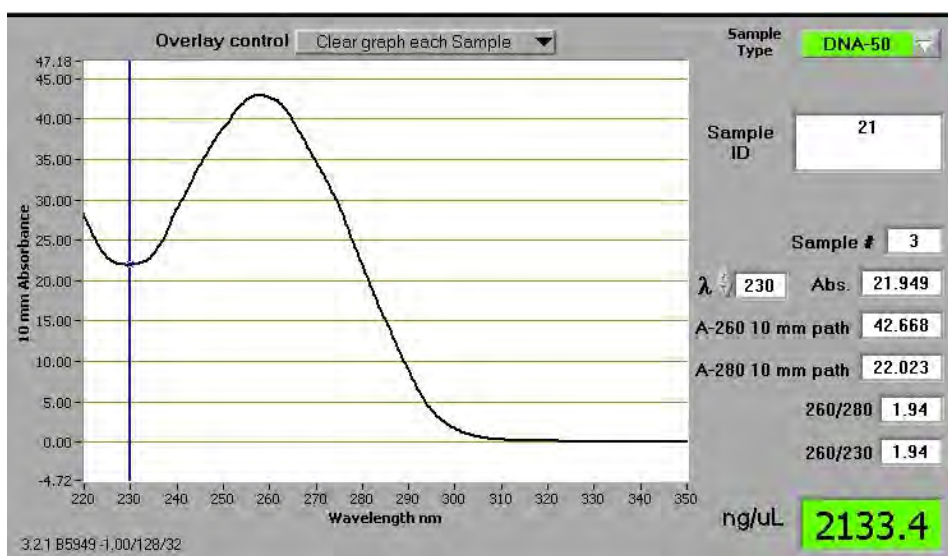


Figura 9. Ejemplo del software utilizado para la cuantificación del DNA extraído de bloques de parafina de TCGT

La integridad del DNA fue analizada mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% en buffer TBE 0.5X y tinción con bromuro de etidio (BrEt).

Amplificación del polimorfismo 5'UTR de XPA mediante PCR

Para la amplificación del fragmento de XPA que contiene el polimorfismo de interés se utilizaron los siguientes cebadores o 'primers':

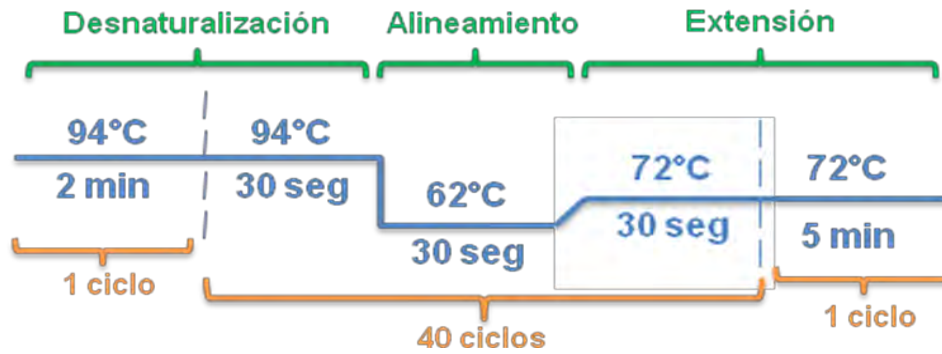
Sentido (Forward): 5'-CTA GGT CCT CGG AGT GGT CC-3'

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

Se utilizaron aproximadamente 100 ng de DNA para la reacción de PCR con la siguiente concentración y volumen de reactivos:

Reactivo	Volumen (µl) por reacción
Buffer 10X (Invitrogen)	2.5
MgCl₂ (2 mM)	1
Primer sentido (0.5 µM)	0.5
Primer antisentido (0.5 µM)	0.5
dNTPs (0.8 mM)	2
Platinum Taq Polimerasa (Invitrogen Cat. 10966-030)	0.25
Muestras de DNA (50-100 ng)	~1
H₂O MQ estéril	17.25
Volumen final	25

Esta reacción se llevó a cabo en un termociclador Gene Amp. PCR Systems 9700, Applied Biosystems con las siguientes condiciones:



El fragmento de DNA, producto de la PCR, tiene una longitud de 204 pb; los fragmentos de cada una de las muestras fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%, utilizando buffer TBE 0.5X y posteriormente teñidos con BrEt.

Genotipificación del polimorfismo 5'UTR de XPA

La identificación del polimorfismo, tanto en muestras de población abierta como en muestras de TCGT, se llevó a cabo mediante análisis de polimorfismo del tamaño de fragmento por enzima de restricción (RFLP's por sus siglas en ingles), para ello se utilizó la enzima de restricción BspEI (New England Biolabs) la cual reconoce el sitio TCCGGA (Fig. 10), que se genera en el gen XPA por la transición de Adenina a Guanina (A→G) en la región no codificante 5'.



Figura 10. Sitio de reconocimiento de la enzima BspEI. En rojo se puede observar la Guanina presente en el polimorfismo y de esta forma se genera el sitio de restricción.

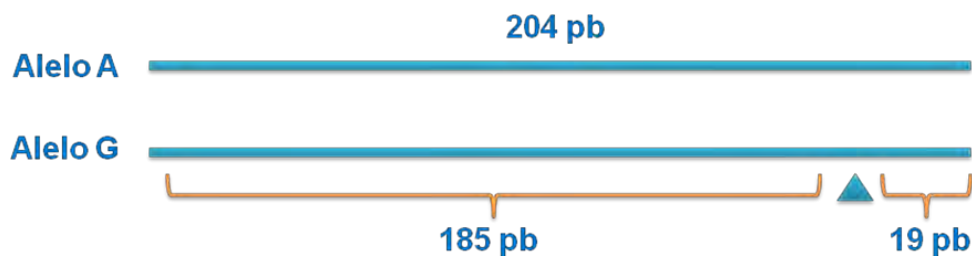
Las condiciones para la digestión del producto de PCR fueron las siguientes:

Reactivo	Volumen (µl)
Producto de PCR	4
Buffer NEB2 (New England Biolabs)	1
Enzima BspEI (3 U)	0.3
H ₂ O	4.7
Volumen total	10

La reacción de digestión se incubó por 16 h a una temperatura de 37°C para posteriormente ser analizadas por electroforesis en geles de agarosa al 3% utilizando buffer TBE 0.5X y tinción con BrEt.

Aquellos individuos que presentan el genotipo homocigoto polimórfico (GG) producen dos fragmentos de 185 y 19 pb, ya que se genera el sitio de restricción que es reconocido por la enzima BspEI; en el caso de presentar el genotipo heterocigoto (AG) se producen tres fragmentos de 204, 185 y 19 pb; y para el genotipo homocigoto silvestre se produce solamente un fragmento de 204 pb, ya que no se genera sitio de restricción (Fig. 11).

A.



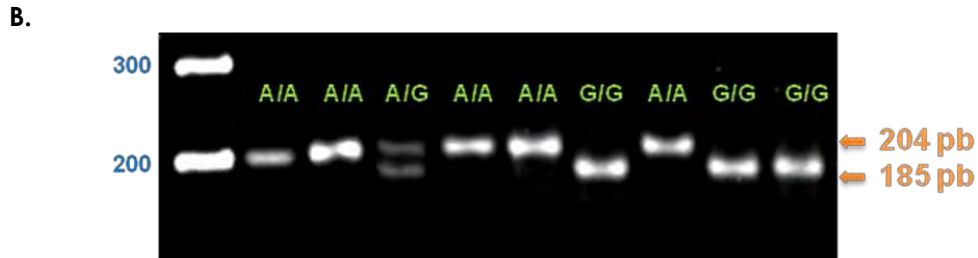


Figura 11. A. Representación del sitio de corte en el producto de PCR por la enzima BspEI; la flecha indica el sitio de corte de la enzima que define los alelos, en caso del alelo silvestre (A) no hay sitios de corte, por lo que solo se presenta el fragmento original de 204pb, y en el caso del alelo polimórfico (G) se genera un sitio de restricción que genera dos fragmentos de 185 y 19pb. **B.** Gel de agarosa que muestra los fragmentos resultantes después de la digestión, así mismo se señalan los diferentes genotipos analizados: A/A.- Homocigo silvestre (1 banda de 204 pb); A/G.- Heterocigo (3 bandas de 204, 185 y 19 pb); y G/G.- Homocigo polimorfo (2 bandas de 185 y 19 pb)

Análisis estadístico

La comparación entre variables categóricas y el SNP fueron analizados con χ^2 o la prueba exacta de Fisher; $p < 0.05$ fue considerada estadísticamente significativa.

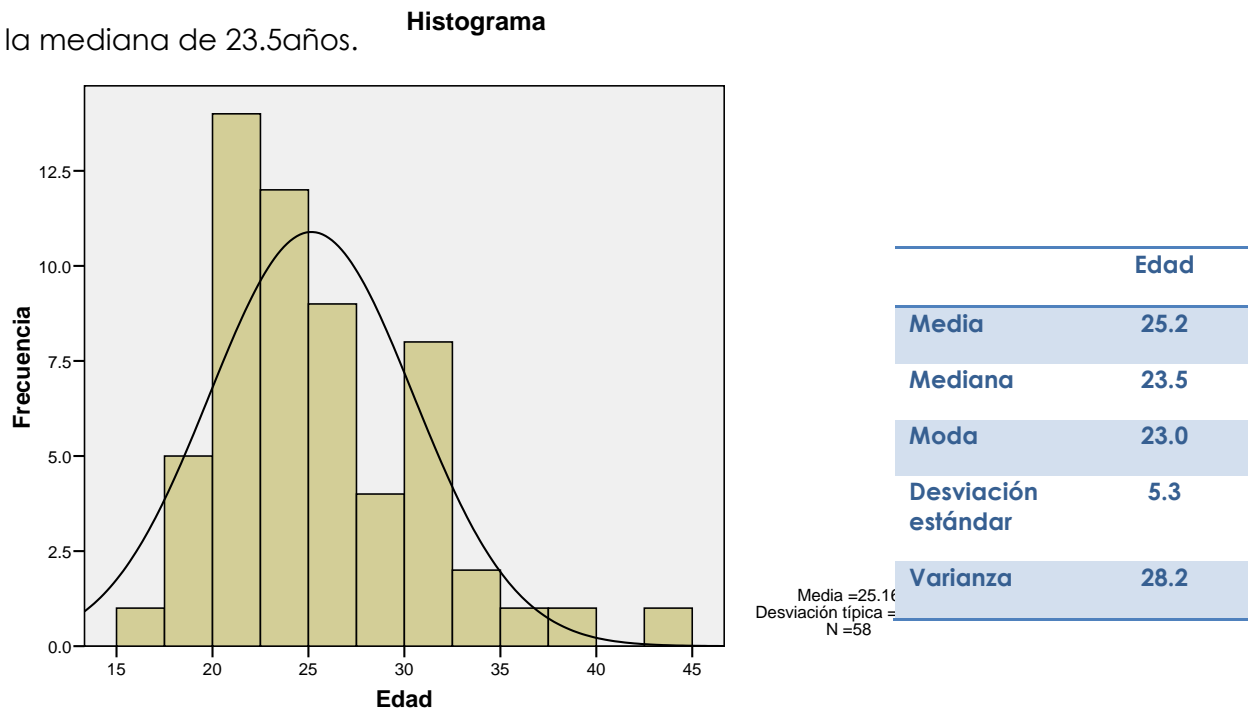
El tiempo de supervivencia fue analizado por el método de Kaplan-Meier y las comparaciones entre subgrupos fueron realizadas por Log Rank o Breslow. Para realizar el análisis estadístico se utilizó el software SPSS versión 17.0.

La definición de cada una de las variables empleadas en el estudio se explica detalladamente en el Anexo 1.

RESULTADOS

Se revisaron un total de 450 expedientes de pacientes diagnosticados con TCGT en el INCan entre los años 2000 a 2003, de los cuales 58 cumplieron con los criterios de inclusión.

La distribución de edades de los pacientes incluidos en el estudio, se muestra en el siguiente histograma (Gráfica 1), en la que encontramos que la media fue de 25.2 años y la mediana de 23.5 años.



Gráfica 1. Histograma y datos de edades de pacientes incluidos en el estudio

Encontramos 6 (10.3%) pacientes en los que la enfermedad recurrió y 23 (39.7%) muertes durante el período de seguimiento. La mayoría de los pacientes fueron diagnosticados en los estadios II y IV con 27 (46.6%) y 22 (37.9%) casos respectivamente, así mismo, se incluyeron 3 pacientes en estadio IB con enfermedad avanzada y que cumplieron con los criterios de inclusión, 41 de los 58 pacientes (70.7%) recibieron 4 ciclos de quimioterapia y el restante 3 ciclos.

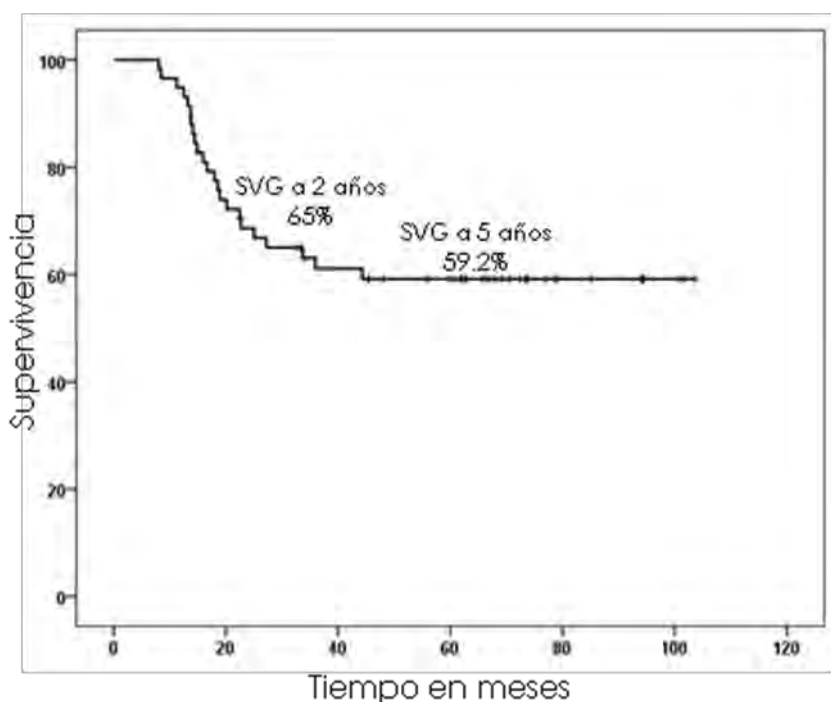
El siguiente cuadro resume el estado de los pacientes, tipos histológicos, sitios más frecuentes de metástasis y características clínicas (Definición de variables en Anexo1).

		Porcentaje
Estado	Vivos	60.3%
	Muertos	39.7%
Tipos histológicos	Seminoma	43.1%
	Carcinoma embrionario	56.9%
	Teratoma	51.7%
	Senos endodérmicos	48.3%
	Coriocarcinoma	17.2%
Sitios más frecuentes de metástasis	Retroperitoneo	89.7%
	Pulmón	34.5%
	Mediastino y ganglios	10.3%
Características clínicas		
Estadio	IB	5.2%
	II	46.6%
	III	10.3%
	IV	37.9%
Grupo pronóstico	Bueno	25.9%
	Intermedio	36.2%
	Pobre	37.9%
Respuesta a la quimioterapia	Sensible	60.34%
	Resistente	39.66%

Recurrencia	Si	10.3%
	No	89.7%

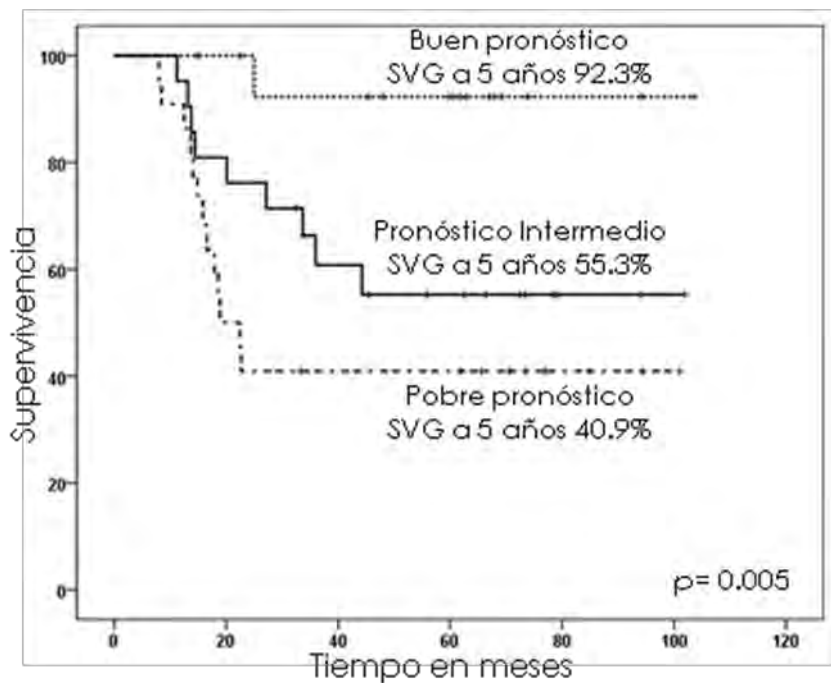
Cuadro 4. Estado de los pacientes, tipos histológicos, sitios más frecuentes de metástasis y características clínicas de la población de estudio.

La Supervivencia Global (SVG) de la población fue de 69.3 meses, de lo que podemos destacar que la SVG a 2 años fue del 65.0% [Intervalos de Confianza (IC) 95% 58.5-71.4] y a 5 años del 59.2% (IC 95% 52.5-65.8) (Gráfica 2).



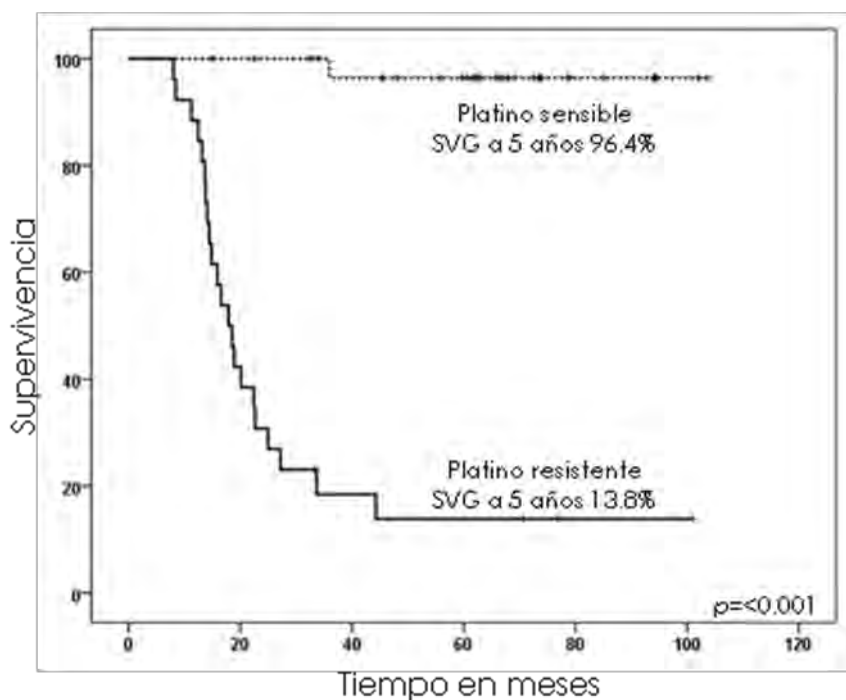
Gráfica 2. Curva Kaplan-Meier de Supervivencia Global de la población de estudio.

Al analizar la supervivencia de los pacientes después del tratamiento respecto al grupo pronóstico, encontramos que a cinco años el 92.3% de los casos del grupo de buen pronóstico estaba vivo mientras que para pronóstico intermedio fue de 55.3% y para pronóstico pobre de 40.9%, lo cual representa un nivel estadísticamente significativo (p) de 0.005 (Gráfica 3).



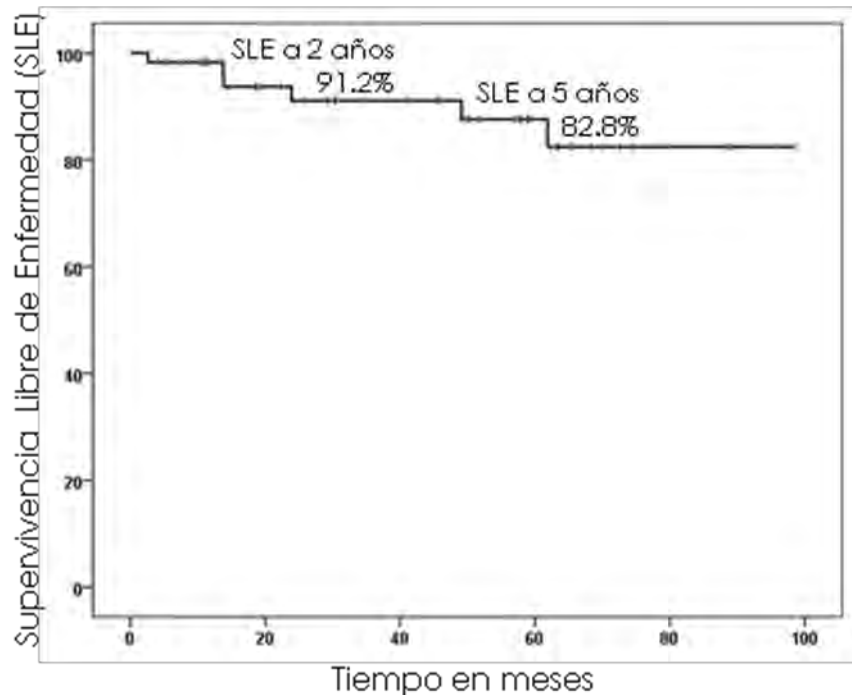
Gráfica 3. Curva Kaplan-Meier de Supervivencia Global en relación al Grupo Pronóstico.

En cuanto a respuesta a la quimioterapia basada en cisplatino encontramos que aquellos pacientes sensibles al tratamiento con cisplatino tuvieron una SVG media de 101.185 meses, a diferencia de los pacientes resistentes que solo tuvieron una SVG media de 30.258 meses. De los pacientes considerados platino-sensibles el 96.4% se encontraban vivos a 5 años en comparación con el 13.8% de los pacientes platino-resistentes ($p < 0.001$) (Gráfica 4).



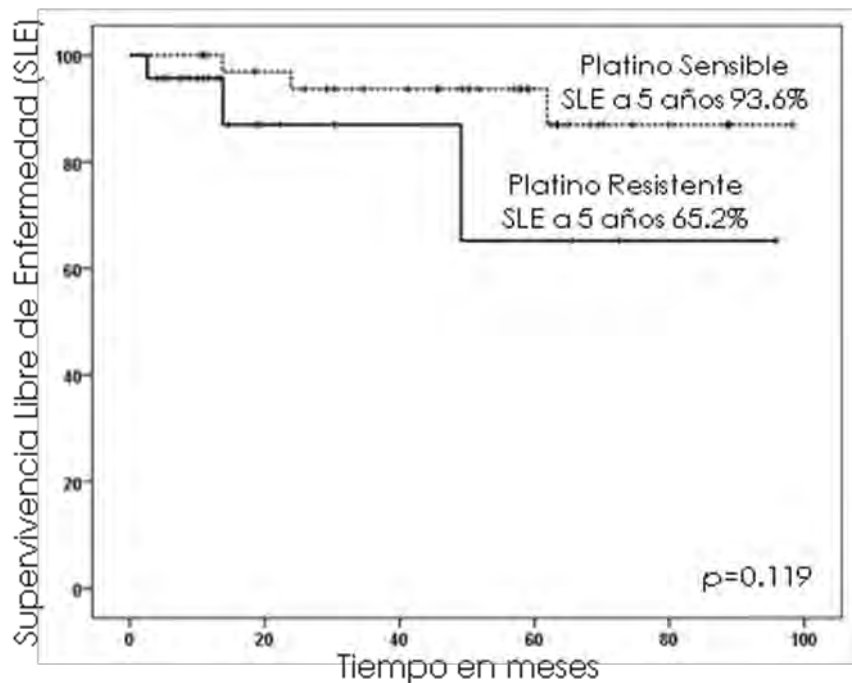
Gráfica 4. Curva Kaplan-Meier de Supervivencia Global en relación a la respuesta al cisplatino.

Por otro lado, se analizó la Supervivencia Libre de Enfermedad (SLE) en la población de estudio y encontramos que 6 de los 58 pacientes presentó recurrencia de la enfermedad (10.34%), así mismo tenemos que a 2 y 5 años el 91.2% (IC 95% 85.9-96.5) y 82.8% (IC 95% 76.2-89.4) de los pacientes, respectivamente, no presentaron recurrencia posterior al finalizar el tratamiento con BEP (Gráfica 5).



Gráfica 5. Curva Kaplan-Meier de SLE de pacientes con TCGT.

Al relacionar la SLE con la respuesta al tratamiento, se encontró que los pacientes platino-sensibles tuvieron una SLE a 5 años del 93.6% (IC 95% 88.26-98.93) mientras que los pacientes platino-resistentes presentaron una SLE a 5 años del 65.2% (IC 95% 57.3-76.71) ($p=0.119$) (Gráfica 6).



Gráfica 6. Curva Kaplan-Meier de SLE en relación a la respuesta al cisplatino.

Polimorfismo 5'UTR de XPA

Muestras de Población mexicana aparentemente sana

Se analizaron 161 muestras de DNA de individuos mexicanos, estas muestras fueron amplificadas mediante la técnica de PCR con las condiciones previamente descritas, el producto que contiene el polimorfismo 5'UTR de XPA es un fragmento de 204pb (Fig.12).



Figura 12. Amplificación del fragmento que contiene la región 5'UTR del gen XPA.

Para la genotipificación del polimorfismo 5'UTR de XPA, el producto de PCR de las 161 muestras fue analizado por RFLP's empleando la enzima de restricción BspEI (Fig. 13).

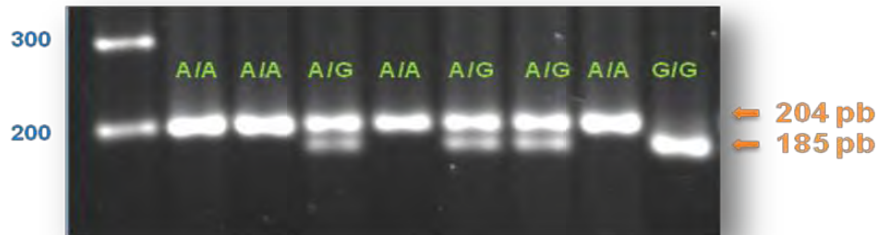


Figura 13. Gel de agarosa que muestra la digestión del fragmento de 204 pb. Así mismo se señalan los diferentes genotipos analizados:

A/A.- Homocigo silvestre (1 banda de 204 pb)

A/G.- Heterocigo (3 bandas de 204, 185 y 19 pb)

G/G.- Homocigo polimorfo (2 bandas de 185 y 19 pb)

Encontramos que el genotipo heterocigo (A/G) presenta la mayor frecuencia comparado con los otros genotipos. En cuanto a las frecuencias de los alelos, tenemos que el alelo G (polimorfo) es el más frecuente (Cuadro 5).

Genotipo	Núm. de individuos (n)	Frecuencia	Alelo	Frecuencia
A/A	28	0.174	A	0.410
A/G	76	0.472	G	0.590
G/G	57	0.354		
Total	161	1.000		1.000

Cuadro 5. Frecuencias genotípicas y alélicas de muestras de población mexicana aparentemente sana

Muestras de TCGT

En primera instancia se extrajo el DNA de TCGT a partir de bloques de parafina, posteriormente se analizó la integridad del DNA extraído (Fig. 14), para continuar con la amplificación por PCR del fragmento que contenía el polimorfismo.

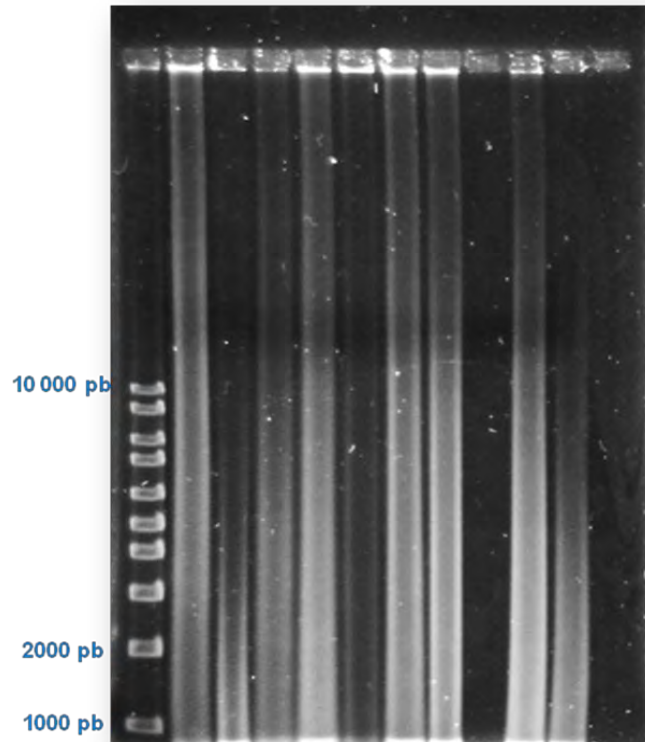


Figura 14. Gel de agarosa que muestra la integridad del DNA.

Para la determinación de la presencia del polimorfismo 5'UTR de XPA, dichas muestras fueron procesadas siguiendo la misma metodología que para las muestras de DNA proveniente de la población mexicana sana, comenzando por la amplificación (Fig. 15) para posteriormente ser analizada por RFLP's con la finalidad de determinar el genotipo de cada una de las muestras (Fig. 16).

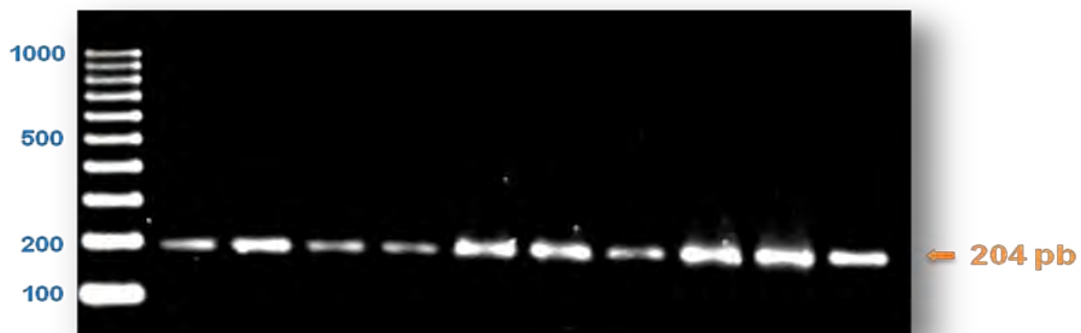


Figura 15. Amplificación del fragmento que contiene la región 5'UTR del gen XPA a partir de muestras de TCGT.

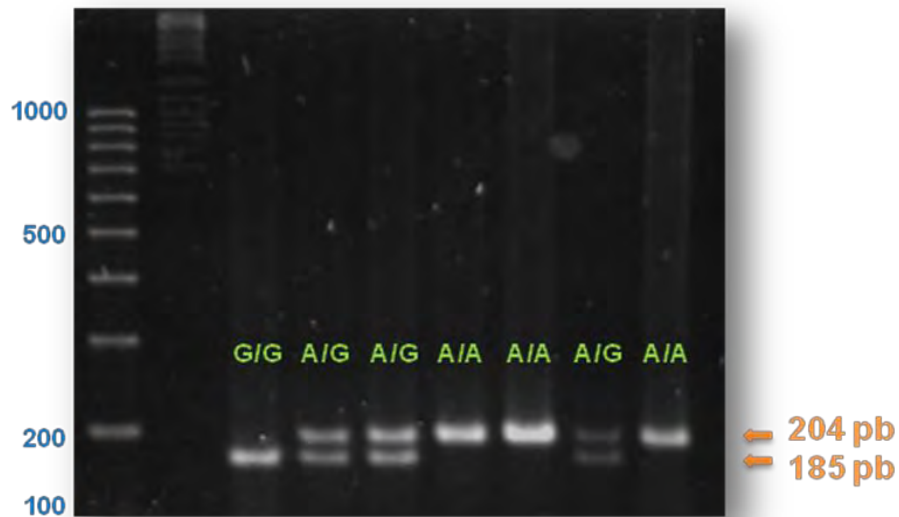


Figura 16. Digestión del fragmento de 204pb amplificado a partir de muestras de TCGT, señalando los diferentes genotipos analizados:

AA.- Homócigo silvestre (1 banda de 204 pb)

AG.- Heterócigo (3 bandas de 204, 185 y 19 pb)

GG.- Homócigo polimórfico (2 bandas de 185 y 19 pb)

Al analizar las frecuencias genotípicas y alélicas, se encontró que al igual que en la población aparentemente sana, el genotipo heterócigo (A/G) y el alelo polimórfico (G) presentaron la mayor frecuencia en nuestra población de estudio (Cuadro 6).

Genotipo	n	Frecuencia	Alelo	Frecuencia
A/A	6	0.103	A	0.430
A/G	38	0.655	G	0.570
G/G	14	0.241		
Total	58	1.000		1.000

Cuadro 6. Frecuencias genotípicas y alélicas de pacientes con TCGT.

Al comparar nuestros resultados con otros estudios en diferentes poblaciones en el que también se evalúa el polimorfismo 5'UTR de XPA (Cuadro 7), encontramos que las frecuencias genotípicas varían entre cada población, no obstante tenemos que la gran mayoría de estos estudios presenta una mayor frecuencia del alelo polimórfico (G).

Ref.	Grupo étnico	Población estudiada	n	A/A	A/G	G/G	Alelo A	Alelo G
97	Africanos-Americanos	Control	67	0.10	0.39	0.51	0.30	0.70
		Ca. de pulmón	81	0.19	0.37	0.44	0.37	0.63
	Caucásicos	Control	581	0.22	0.45	0.33	0.45	0.55
		Ca. de Pulmón	564	0.29	0.39	0.32	0.48	0.52
	Mexicanos - Americanos	Control	47	0.20	0.40	0.40	0.39	0.61
		Ca. de Pulmón	50	0.40	0.26	0.34	0.53	0.47
94	Polacos	Control	35	0.17	0.51	0.32	0.38	0.62
98	Africanos-Americanos	Ca. de Ovario	106	0.07	0.42	0.51	0.28	0.72
	Hispanos							
	Caucásicos							
Mexicana	Control	161	0.17	0.47	0.35	0.41	0.59	
	Ca. de testículo	58	0.10	0.66	0.24	0.43	0.57	

Cuadro 7. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo 5'UTR de XPA reportadas en diferentes poblaciones

Análisis de respuesta al tratamiento con BEP respecto al polimorfismo 5'UTR de XPA

Dado que nos interesa evaluar el efecto que pudiera tener el poseer al menos un alelo polimórfico tanto en la supervivencia (SVG y SLE) como en la respuesta a la quimioterapia basada en cisplatino, se agruparon los genotipos heterocigos (A/G) y homocigos polimórficos (G/G) en un solo grupo de estudio el cual fue comparado con el genotipo homocigo silvestre (A/A).

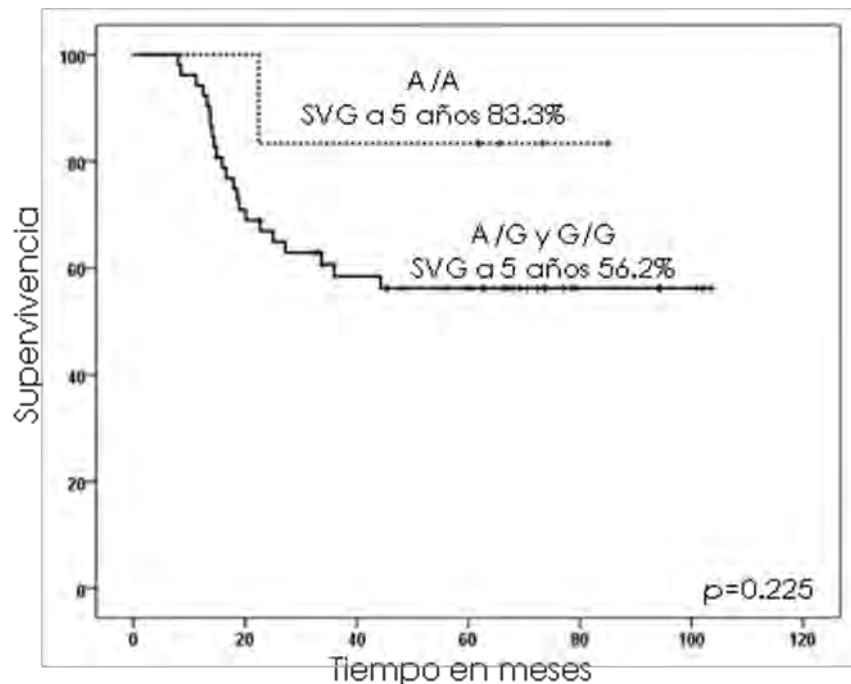
Al correlacionar la respuesta de los pacientes al tratamiento basado en cisplatino con los genotipos del polimorfismo 5'UTR de XPA, se destaca la sensibilidad que se presenta en este tipo de tumores, no obstante, no encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p=0.386$) entre aquellos pacientes que poseían el genotipo A/A comparados con los que tenían los genotipos A/G y G/G (Cuadro 8), sin embargo, es importante señalar que de los seis pacientes con genotipo silvestre (A/A) solo uno fue resistente al tratamiento y de los casos platino-resistentes la gran mayoría tenían los genotipos A/G y G/G (95.6%).

Genotipo	Resistentes		Sensibles		
	n	%	n	%	p=0.386
A/A	1	4.4	5	14.3	
A/G y G/G	22	95.6	30	85.6	
Total	23	100	35	100	

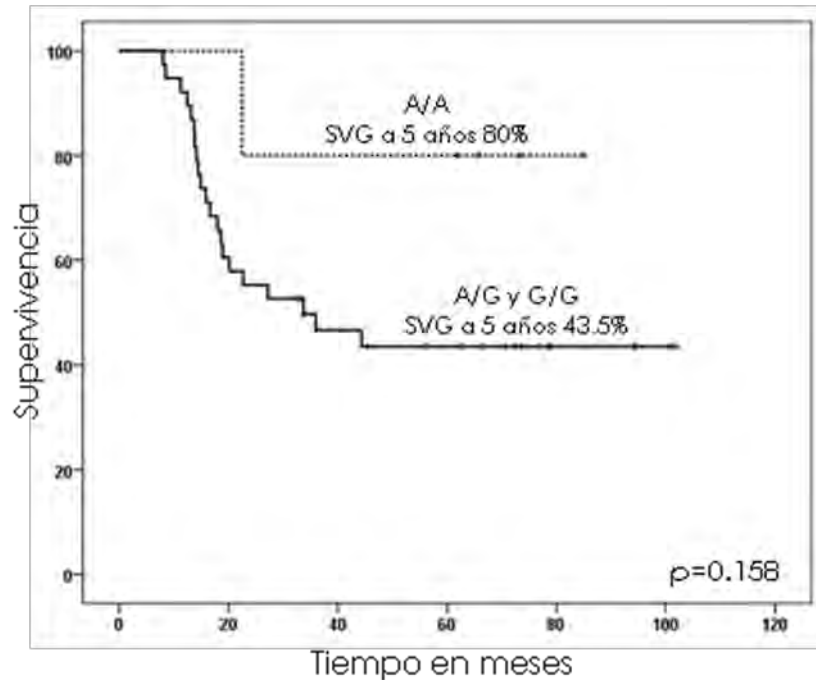
Cuadro 8. Respuesta al tratamiento con cisplatino en relación a genotipos de polimorfismo 5'UTR de XPA.

En lo que respecta a la SVG observamos que el 83.3% (IC 95% 73.2–93.3) de los pacientes genotipificados como A/A se encontraban a 5 años comparado con el 56.2% (IC 95% 49.34–63.06) de los pacientes con los genotipo A/G y G/G ($p=0.225$) (Gráfica 7).

Al analizar únicamente a los pacientes con intermedio y pobre pronóstico, observamos que esta diferencia en la SVG se hace más notoria, sin embargo, no llega a ser estadísticamente significativa ($p=0.158$), tenemos que para el genotipo A/A el 80% de los pacientes (IC 95% 67.35–92.64) se encontraba vivo a 5 años comparado con el 43.5% (IC 95% 34.94–52.06) de los genotipos A/G y G/G (Gráfica 8).

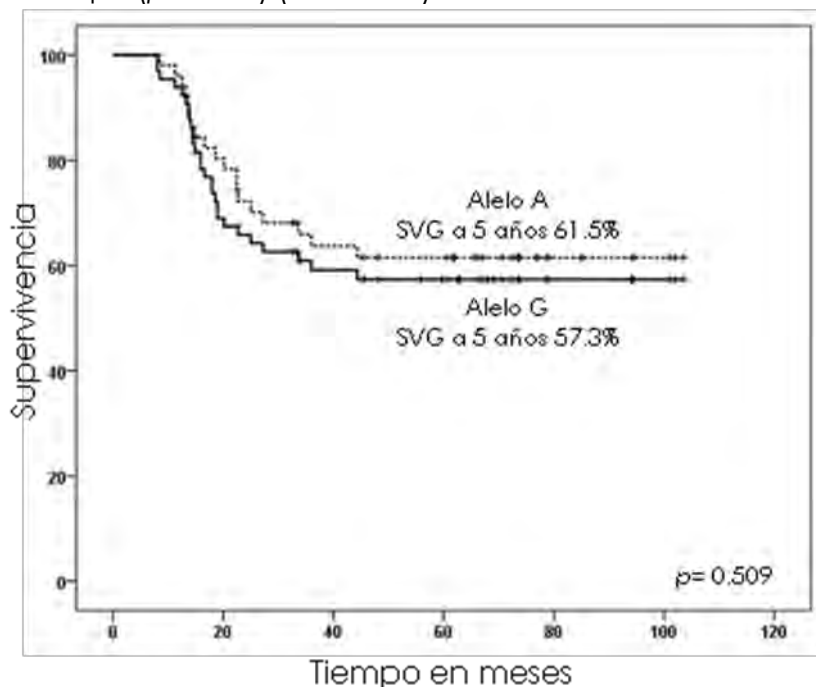


Gráfica 7. Curva Kaplan-Meier de Supervivencia Global en relación al genotipo del polimorfismo 5'UTR de XPA.



Gráfica 8. Curva Kaplan-Meier de Supervivencia Global en función al polimorfismo 5'UTR de XPA, excluyendo grupo de Buen Pronóstico.

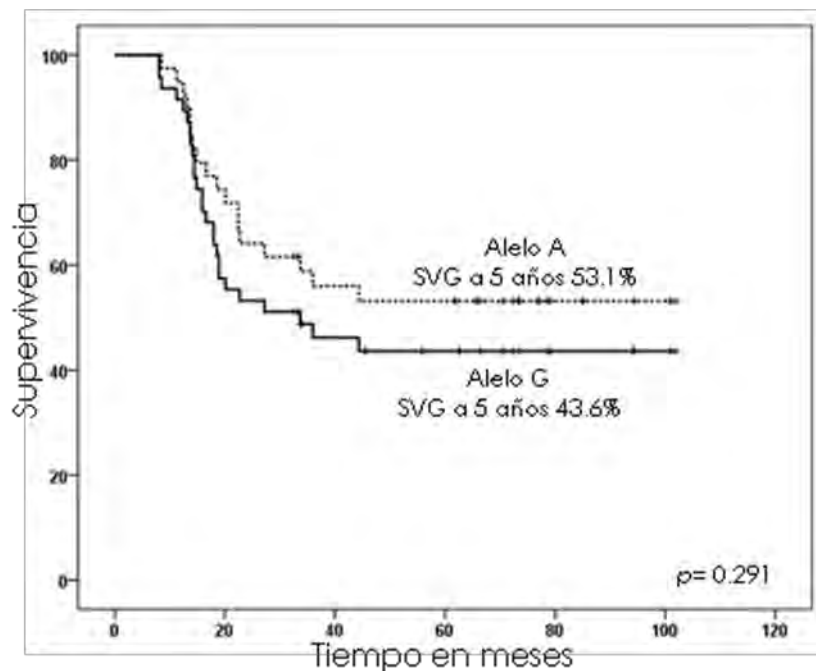
Al considerar los tres grupos pronóstico, el 61.5% (IC 54.7-68.3) de los pacientes que presentaron el alelo A estaban con vida a 5 años, mientras que aquellos pacientes que presentaron el alelo G sólo el 57.3%(IC 95% 50.8-63.7) presentaron una SVG a 5 en este mismo rango de tiempo ($p=0.509$) (Gráfica 9).



Gráfica 9. Curva Kaplan-Meier de Supervivencia Global en relación a alelos A y G del polimorfismo 5'UTR de XPA

Como se puede observar en la siguiente gráfica, esta diferencia encontrada en la población con los 3 grupos pronóstico, se hace más evidente cuando se excluye al grupo de buen pronóstico, observando una mayor SVG a 5 años de los pacientes con el alelo A (53.1%; IC 95% 44.6-61.6) comparado con los pacientes que poseen el alelo G (43.6%; IC 95% 36.6-50.6) ($p=0.291$)(Gráfica 10).

En ambos análisis no encontramos una diferencia estadísticamente significativa, sin embargo, es evidente una mayor diferencia en el análisis en el que fue excluido el grupo de buen pronóstico.

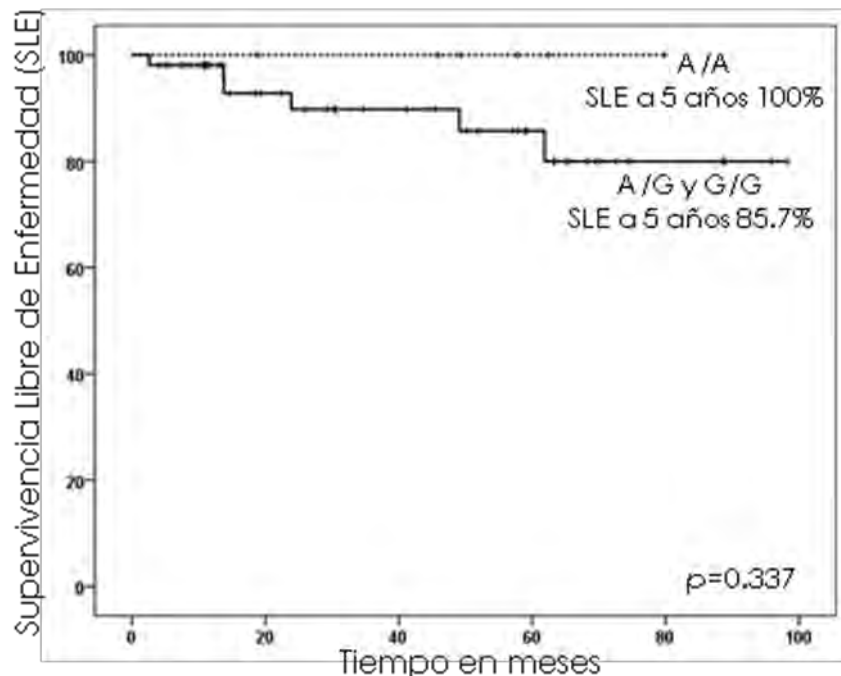


Gráfica 10. Curva Kaplan-Meier de Supervivencia Global en relación a alelos A y G del polimorfismo 5'UTR de XPA excluyendo al Grupo de Buen Pronóstico.

Adicionalmente la SLE fue analizada en primera instancia en función a cada uno de los grupos pronóstico, encontrando que en el grupo de buen pronóstico no se presentó ningún paciente con enfermedad recurrente, mientras que en el caso de los pacientes con pronóstico intermedio y pobre se presentaron 3 recurrencias en cada uno, evidentemente el 100% de los pacientes tuvieron una SLE en el grupo de buen

pronóstico, mientras que el 81.9% (IC 95% 73.96-89.83) y 84.8% (IC 95% 76.34-93.26) fue el caso de SLE a 5 años de los grupos de intermedio y pronóstico pobre respectivamente ($p=0.302$).

Por otra parte, al relacionar la SLE con los genotipos analizados en el presente estudio se encontró que aquellos pacientes genotipificados como A/A no presentaron recurrencia de la enfermedad, en cambio, los 6 casos de recurrencia se presentaron en los pacientes con el genotipo A/G y G/G los cuales tuvieron una SLE a 5 años del 85.7% (IC 95% 79.3-92.11) ($p=0.337$) (Gráfica 11). Cuando se realizó el análisis para evaluar la SLE en función a los alelos, no encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p=0.805$)



Gráfica 11. Curva Kaplan-Meier de SLE en relación a Genotipos.

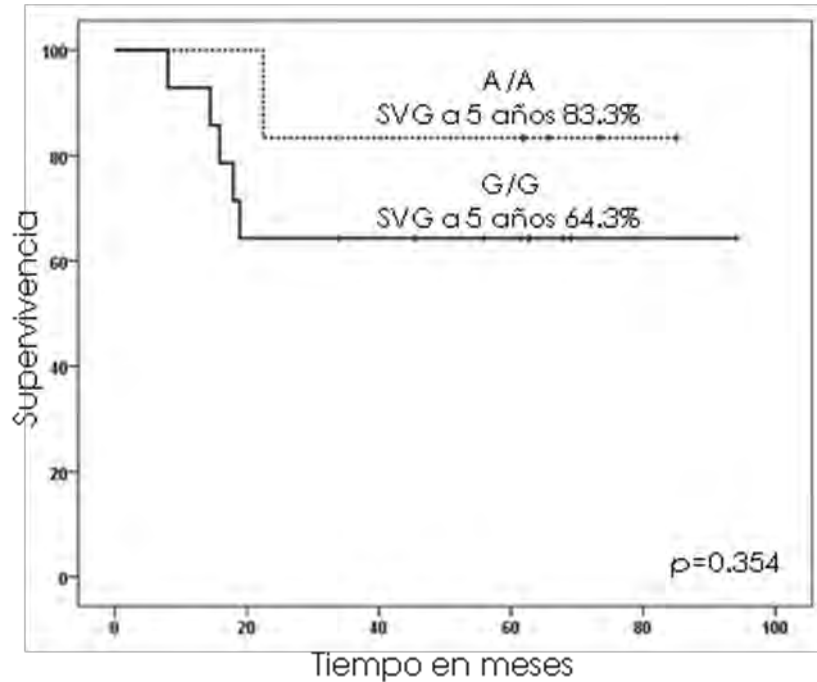
Paralelamente, decidimos evaluar solo los genotipos homocigos, silvestres y polimórficos (A/A vs G/G) excluyendo al genotipo heterocigo (A/G) con la finalidad de comparar las características clínicas particulares que estos pacientes.

Al evaluar la respuesta de los pacientes en relación al polimorfismo 5'UTR de XPA, encontramos que la mayoría de los pacientes resultaron ser sensibles al tratamiento, sin embargo, no encontramos diferencias estadísticamente significativas (Cuadro 9).

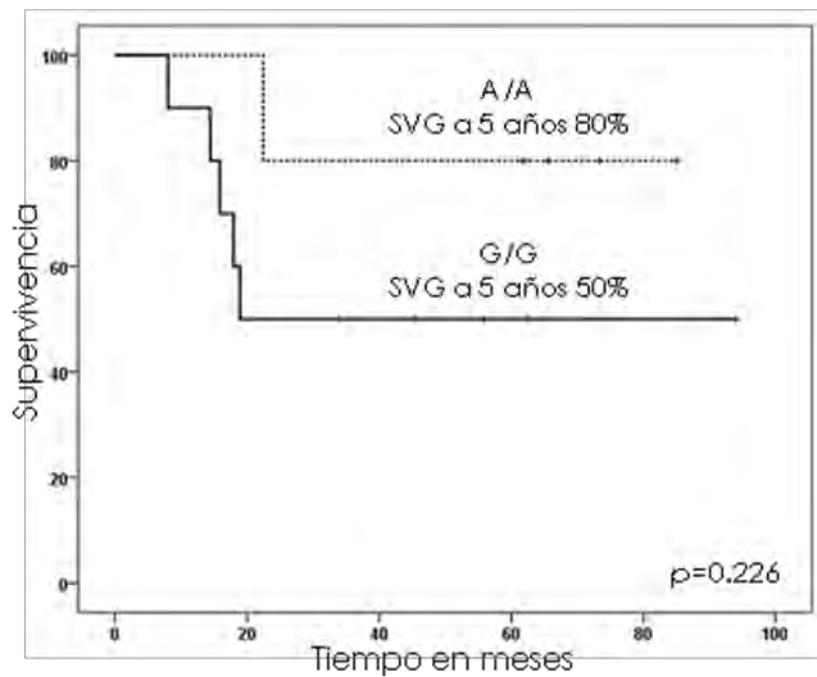
Genotipo	Resistentes		Sensibles		
	n	%	n	%	p=0.573
A/A	1	20.0	5	33.3	
G/G	4	80.0	10	66.7	

Cuadro 9. Respuesta al tratamiento con cisplatino y recurrencia de la enfermedad en relación a genotipos del polimorfismo 5'UTR de XPA.

Continuamos evaluando la SVG a 5 años, y obtuvimos que el 83.3% (IC 95% 66.2-100.4) de los pacientes con el genotipo A/A y el 64.3% (IC 95% 48.6-80.0) con el genotipo G/G se encontraban vivos en este intervalo de tiempo, aunque la diferencia no es estadísticamente significativa ($p=0.354$) se evidencia que existe un menor porcentaje de pacientes con SVG a 5 años con el genotipo homocigo polimórfico (G/G) (Gráfica 12), esta característica resalta más al excluir a aquellos pacientes clasificados en el grupo de buen pronóstico ($p=0.226$), en este caso encontramos que el 80% (IC 95% 58.6-101.4) y 50% (IC 95% 29.9-70.1) de los pacientes con genotipo A/A y G/G respectivamente tuvieron una SVG a 5 años (Gráfica 13).

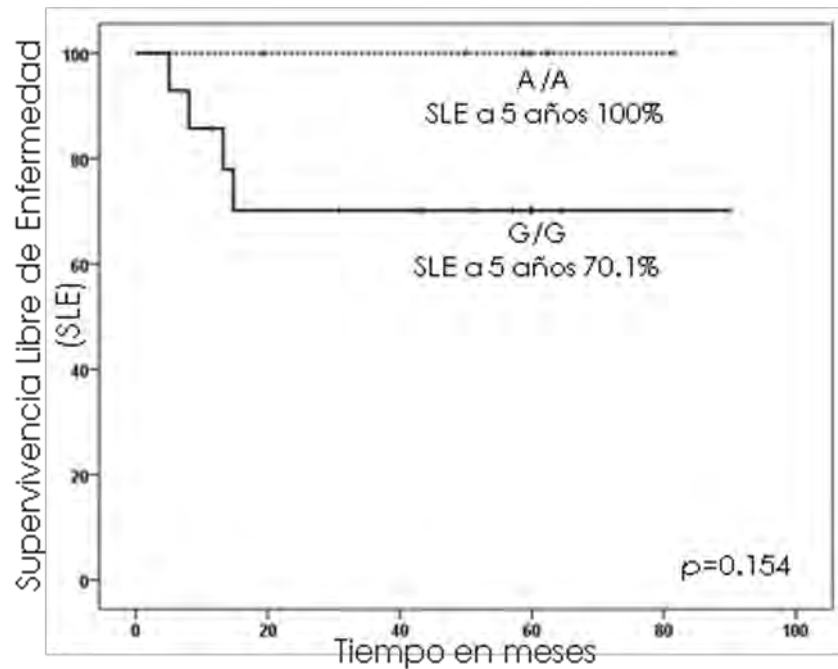


Gráfica 12. Curva Kaplan-Meier de Supervivencia Global en función del polimorfismo 5'UTR de XPA, excluyendo al aenotipo heteróciaio (A/G).



Gráfica 13. Curva Kaplan-Meier de Supervivencia Global en función del polimorfismo 5'UTR de XPA, excluyendo al genotipo heteróciaio (A/G) y grupo de buen pronóstico.

Por otro lado, al evaluar la SLE en relación al polimorfismo 5'UTR de XPA (Gráfica 14) tenemos que ningún paciente con genotipo A/A tuvo recurrencia de la enfermedad a diferencia del genotipo G/G, cuyos pacientes presentaron una SLE del 70.1% (IC 95% 54.5-125.6) ($p=0.154$).



Gráfica 14. Curva Kaplan-Meier de SLE en función del polimorfismo 5'UTR de XPA, excluyendo al genotipo heterocigoto (A/G).

Discusión y Conclusión

Los TCGT representan un modelo de quimiosensibilidad en cáncer, sin embargo, los mecanismos que determinan esta característica se desconocen. No obstante, se propone que deficiencias en los mecanismos de reparación pudieran estar involucrados en la sensibilidad inusual de los TCGT ^{45,69,70}.

La piedra angular de la terapia de TCGT es el cisplatino, el cual actúa mediante la formación de aductos, en su mayoría intracatenarios, con el DNA ^{8,51,55}. El principal mecanismo encargado de la reparación del daño provocado por el cisplatino es NER ^{45,71}, el cual es un proceso complejo que involucra el reconocimiento del DNA dañado, desenrollamiento del DNA, excisión de la región dañada y finalmente, la reparación de esta ^{95,89}.

Existen diversos estudios que relacionan NER con la sensibilidad de células de TCGT al cisplatino. Los estudios pioneros en esta área, determinaron que las células de TCGT poseen una reducida capacidad de reparación vía NER ^{69,70,76,77}, confirmándose así, que esta característica puede contribuir a la hipersensibilidad al cisplatino de células derivadas de TCGT.

Al analizar los niveles de todas las proteínas involucradas en NER se encontraron niveles bajos de la proteína XPA y el complejo de nucleasas ERCC1-XPF en células de TCGT comparados con diversas células derivadas de diferentes tipos de cáncer, sugiriendo así, que los niveles inusuales de estas proteínas pueden ser las responsables de limitar la capacidad de NER en TCGT ^{78,96}.

Cuando las proteínas XPA y ERCC1-XPF fueron adicionadas en cultivos *in vitro* deficientes de ambas proteínas (TCGT), se restauró la capacidad de NER a niveles normales con la proteína XPA, dichos resultados llevaron a proponer que XPA probablemente sea uno de los factores determinantes en la sensibilidad al cisplatino ⁷⁸. Aunado a ello, existen reportes clínicos que sugieren la importancia de la expresión de XPA como factor determinante en la respuesta de pacientes con cáncer de ovario tratadas con quimioterapia a base de cisplatino ⁸⁴. Tenemos entonces, que la sensibilidad de las células tumorales al cisplatino es inversamente proporcional a la capacidad de reparación vía NER.

A pesar de los hallazgos *in vitro* que confirman a XPA como pieza clave para explicar la sensibilidad de las células de TCGT a la quimioterapia, existen estudios contradictorios, en los que se reportan por una lado que la sobreexpresión de la proteína XPA en líneas celulares de TCGT no muestra un efecto impactante en la sensibilidad de estas células al tratamiento con cisplatino ⁸⁵; y por otro lado un estudio realizado con muestras de pacientes diagnosticados con TCGT sugiere que la presencia de la proteína XPA no correlaciona con la respuesta a la quimioterapia, concluyendo así, que XPA no juega un papel crítico en la sensibilidad de TCGT ⁹⁷.

No obstante, recientemente nuestro grupo de trabajo encontró que en nuestra población de estudio sí existe una relación entre la expresión de la proteína XPA mediante inmunohistoquímica y una mayor supervivencia global (manuscrito en revisión) ⁹⁸.

Las razones por las que los estudios se contraponen no se conocen, sin embargo, podemos resaltar que los estudios fueron realizados en diferentes poblaciones

(holandesa y mexicana), lo que significa que existen diversas variaciones genéticas, probablemente ambientales e incluso de estilo de vida que pudieran explicar las diferencias en cuanto a los resultados, por otro lado, podemos discutir en cuanto al estudio *in vitro*, que al ser realizado en diferentes líneas celulares de TCGT se debe considerar que estas pueden tener diversas variaciones y alteraciones genéticas acumuladas por el simple hecho de encontrarse inmortalizadas, por tal motivo es posible que estudios realizados *in vivo* tengan un mayor impacto y relevancia en el entendimiento de la sensibilidad de este tipo de tumores.

Los hallazgos encontrados en nuestro grupo de trabajo nos llevaron a plantear la relevancia de XPA en la respuesta y supervivencia global de pacientes con TCGT tratados con cisplatino, por lo que se consideró el estudio de un polimorfismo como una herramienta importante para el mejoramiento del pronóstico en cuanto a la supervivencia y respuesta al tratamiento de este padecimiento.

Las variaciones genéticas, tales como los SNPs, en secuencias codificantes o regulatorias en la secuencia del gen XPA puede resultar en alteraciones estructurales sutiles en la proteína y subsecuentemente en la modulación de la capacidad de NER. En el año 2000 se identificó un sitio polimórfico, localizado 4 nucleótidos río arriba del codón de inicio del gen XPA, es decir, en la región no codificante (UTR), se trata de una transición de Adenina a Guanina (A→G) cuya función se desconoce. Sin embargo, se ha reportado un estudio en el que se asocia el polimorfismo 5'UTR de XPA con la supervivencia y SLE en pacientes con cáncer de ovario tratadas con cisplatino ⁹⁴.

Nuestro análisis se enfocó en un estudio retrospectivo que evaluó la asociación entre el polimorfismo 5'UTR de XPA y la respuesta clínica en una cohorte de pacientes diagnosticados con TCGT con enfermedad avanzada.

En primera instancia la media de edad (25.2 ± 5.3 años) de los pacientes de nuestra población de estudio, refleja la incidencia de este padecimiento en adultos jóvenes, así mismo, encontramos que el 60.3% de los pacientes se encontraban vivos hasta el año 2009, mismo porcentaje de pacientes que resultaron ser sensibles a la quimioterapia, estos resultados difieren de la mayoría de los estudios que reportan un porcentaje de respuesta de alrededor del 80-95%, lo que nos habla de una característica peculiar de la población mexicana¹¹⁻¹⁴.

En cuanto a la SVG encontramos que más de la mitad de la población (58.6%) se encontraba viva a 5 años después del diagnóstico, dicha SVG correlaciona significativamente con el grupo pronóstico ($p=0.005$), es decir, pacientes con buen pronóstico tiene mayor SVG (92.3%) a diferencia del grupo de pronóstico pobre (40.9%), en el que la SVG disminuye dramáticamente.

Para evaluar la respuesta al tratamiento con cisplatino, los pacientes fueron clasificados como platino-sensibles y platino-resistentes en base a la respuesta al tratamiento; dicha respuesta se refleja en la SVG, aquellos pacientes que respondieron favorablemente a la terapia resultaron tener una SVG a 5 años del 96.4%, porcentaje muy superior comparado con la de los pacientes platino resistentes que fue de tan solo 13.8% ($p<0.001$), el mismo caso se presentó en la SLE, que a pesar de no tener un resultado estadísticamente significativo ($p=0.119$), es evidente la correlación entre

pacientes platino-resistentes y menor tiempo de SLE, cabe resaltar que solo 6 (10.34%) pacientes presentaron recurrencia de la enfermedad.

Al parecer, las características clínicas de los pacientes correlacionan con los resultados tanto en la SVG como en la SLE, mostrando que el grupo de pronóstico pobre y los pacientes que no respondieron favorablemente a la quimioterapia tienen una SVG y SLE menor.

Aunado al estudio realizado en pacientes, fueron analizadas muestras de población mexicana aparentemente sana, debido a que no existen estudios previos que analicen el polimorfismo en nuestra población, los resultados exponen que tanto la población sana como los pacientes diagnosticados con TCGT poseen frecuencias similares, en los que tanto el genotipo heterocigoto (A/G) como el alelo G son los más frecuentes.

Al comparar estos resultados con los previamente reportados en otras poblaciones podemos apreciar que las frecuencias alélicas para el polimorfismo 5'UTR de XPA en la gran mayoría de los estudios son muy parecidas (Cuadro 7), obteniendo que el alelo G es el más frecuente en todos los casos, excepto en población americana con ascendencia mexicana (mexicanos-americanos) con cáncer de pulmón, la cual presenta mayor frecuencia para el alelo A.

Por otro lado, la frecuencia prevalente de los genotipos varía en algunas poblaciones, tenemos por ejemplo, que en el caso de la población africana americana, la mayor frecuencia se presenta en el genotipo homocigoto polimórfico (G/G) ⁹³, al igual que la población evaluada en el estudio de cáncer de ovario ⁹⁴, además de ello, se presenta también el caso de mexicanos-americanos, los cuales curiosamente presentan una frecuencia genotípica variable, en el caso de la población con cáncer de pulmón, el

genotipo más frecuente fue el homócigo silvestre (A/A) y en el caso de su población control, se observa que tanto el genotipo A/G como G/G presentan la misma frecuencia ⁹³, estos resultados difieren de los encontrados en el presente estudio, evidenciando la variación en el "acervo genético" de cada población, además de ello, el hecho de haber encontrado una mayor frecuencia del genotipo A/A en la población mexicana-americana que padece cáncer de pulmón nos habla de cierta susceptibilidad a padecer esta enfermedad, puesto que el hecho de presentar el alelo polimórfico confiere un riesgo menor de incidencia de cáncer de pulmón ⁹³.

Los resultados anteriores son un claro ejemplo de la variación genética entre poblaciones, lo que evidencia la complejidad de cada población y hace necesario un estudio particular para analizar dichas variaciones.

Una vez obtenidas las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo 5'UTR de XPA en nuestra población de estudio se analizaron la respuesta al tratamiento, SVG y SLE de dichos pacientes respecto al polimorfismo y a pesar de no encontrar diferencias estadísticamente significativas, existe una clara tendencia de que aquellos pacientes genotipificados como homócigos silvestres (A/A) presenten una mayor SVG y un mayor intervalo de SLE comparados con los pacientes con genotipo A/G y G/G, estos resultados se evidencian más al excluir al grupo de buen pronóstico, el hecho de haber apartado a este grupo se debió a que estos pacientes responden mejor comparado con los grupos de pronóstico intermedio y pobre, debido a las características inherentes del propio tumor, esto puede confirmarse en la SVG encontrada en el presente estudio en el que el grupo de buen pronóstico tiene una SVG a 5 años muy superior a los dos grupos restantes.

Paralelamente se realizó el mismo análisis tomando en cuenta solo los genotipos homocigos, silvestres y polimórficos (A/A vs G/G) y encontramos que la diferencia, aunque no significativa, se incrementa tanto en SLE como en SVG comparado con el análisis en el que se tomó en cuenta el genotipo heterocigo, de igual forma sucede cuando además excluimos el grupo de buen pronóstico.

Cabe resaltar que todos los casos de enfermedad recurrente se presentaron en los pacientes con genotipo A/G y G/G, y la mayoría, es decir, cuatro de estos seis casos se presentaron el genotipo G/G.

Al realizar el análisis por alelos tanto en SVG y SLE tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas, sin embargo, también se puede observar una tendencia de que los pacientes que presentaron el alelo silvestre (A) observaron una mayor SVG que aquellos con el alelo polimórfico (G), el hecho de que la mayoría de los pacientes presentaran mayor frecuencia del genotipo heterocigo (A/G) pudo haber influenciado en estos resultados.

El hecho de encontrar resultados que muestran tendencias muy evidentes pero que a pesar de ello no sean estadísticamente significativas, refiere al tamaño de muestra limitado, el cual fue una restricción en el presente estudio; como cualquier otro estudio retrospectivo, nos enfrentamos a dificultades, tales como la obtención de información para el seguimiento, y sobre todo, en muchos de los casos no se obtuvo el bloque de parafina con la muestra de TCGT, lo que restringió aun más el tamaño de la muestra, no obstante la prevalencia del polimorfismo en los pacientes no difirió del encontrado en la población mexicana general.

El presente estudio es el primero en determinar la frecuencia del polimorfismo 5'UTR de XPA presente tanto en población mexicana aparentemente sana como en pacientes diagnosticados con TCGT, a su vez, en este último caso, se asoció dicho SNP a la SVG, SLE y respuesta al tratamiento basado en cisplatino. Sin embargo, debido a las limitaciones descritas, no fue posible delinear conclusiones definitivas.

La evaluación de polimorfismos, marcadores predictivos para evaluar la respuesta al tratamiento en cáncer, puede ayudarnos a entender el significado de estos en la identificación de individuos con alto riesgo a desarrollar resistencia a la quimioterapia.

Los resultados expuestos en el presente estudio sugieren que el polimorfismo 5'UTR de XPA funcione como posible modulador que influye en la SVG y SLE; este polimorfismo podría proponerse como una herramienta en el pronóstico clínico, y de este modo poder predecir la respuesta de los pacientes a la quimioterapia, evitando someter al paciente que podría no funcionar, por tanto, pudiera llegar a ser utilizado en el área clínica para proveer terapia individualizada a los pacientes en función de su acervo genético previamente conocido, de tal manera que eventualmente, se pudiera aumentar la tasa de SVG en pacientes con TCGT y posteriormente extrapolarse a otras neoplasias sólidas.

No obstante aún se requieren estudios prospectivos que puedan proveer resultados concluyentes, así como el entendimiento del significado funcional de este polimorfismo y de este modo conocer el papel que juega en la vía NER.

ANEXO I

Definición de variables

Las variables consideradas en el presente trabajo fueron definidas de la siguiente forma:

Edad: Edad del paciente al momento del diagnóstico.

Estado del paciente: En este caso se refiere a si el paciente se encuentra con vida o muerto.

Seminoma/No Seminoma: Clasificados de acuerdo a la histología del tumor.

Clasificación histológica: Tomada en base a la clasificación internacional de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la cual divide a los tumores en aquellos de un solo tipo histológico (seminoma); y aquellos de más de un tipo histológico (no seminoma).

Los TCGT no seminomas exhiben patrones de diferenciación embrionaria y extra-embrionaria, los tipos tumorales más diferenciados encuentran su contraparte de tejidos normales en tejidos derivados del desarrollo embrionario, tales como el propio embrión (teratoma), el saco vitelino (tumores del saco vitelino), y la placenta (coriocarcinoma) ⁹⁹.

Carcinoma Embrionario (CE). Es el tipo celular más indiferenciado, con capacidad totipotencial. Las características celulares correlacionan con su comportamiento más agresivo y contiene células anaplásicas con características embrionarias. Los ECs tienen el índice mitótico y apoptótico más alto de todos los componentes

histopatológicos de los TCGT, y se piensa que es el precursor para la mayoría de los subtipos no-seminomatosos diferenciados ^{10,19,99}.

Coriocarcinoma (CC). Consiste de células del citotrofoblasto y del sincitiotrofoblasto. Es el más agresivo de los TCGT no seminoma, dado que tiene diseminación hematógica temprana a pulmones, hígado, cerebro, y otros sitios viscerales ^{10,99}.

Tumores del saco vitelino (TSV). Exhiben morfología parecida a tejidos diferenciados extra-embrionarios. Los TSV puros se presentan frecuentemente en TCGT que surgen en el mediastino ^{10,17}.

Teratoma (TER). Está compuesto de tipos celulares somáticos de una o más capas germinales (ectodermo, mesodermo o endodermo). Sus componentes evocan tejidos no diferenciados (inmaduros) o bien diferenciados (maduros) que tienden a tener índices mitóticos y apoptóticos bajos^{10,19}.

Marcadores tumorales: La mayoría de los TCGT producen marcadores tumorales, tales como α -Fetoproteína (AFP), Gonadotropina corionica humana (HCG) y Lactato Deshidrogenasa (LDH), estos marcadores son útiles para las siguientes situaciones:

- diagnóstico y estadificación de la enfermedad;
- para el monitoreo de la respuesta a la terapia;
- para la detección de recurrencia tumoral.

El incremento de los niveles de los marcadores tumorales durante el seguimiento, es un indicativo de que la terapia debe ser iniciada, incluso si no se encuentra enfermedad evidente. La vida media de los marcadores debe ser tomada en consideración cuando se evalúa la respuesta del paciente a la terapia.

AFP Es una glicoproteína normalmente producida por el saco fetal vitelino, el hígado y el tracto gastroenterico. La AFP no solo se incrementa en tumores del saco vitelino y carcinoma embrionario, sino también en hepatocarcinoma, enfermedades infecciosas-degenerativas del hígado, y en la regeneración hepática después de un daño toxico. Si un incremento de AFP es encontrado en seminoma puro, el tumor debe ser considerado y tratado como si fuera un tumor no seminomatoso. La vida media de la AFP es de 5 a 7 días.

HCG Glicoproteína producida por células del sincitiotrofoblasto y consiste de dos subunidades, α y β . Solo la subunidad β (β -HCG) es medida, esta es altamente específica para cáncer de testículo: esta es producida específicamente por células de coriocarcinoma, pero pueden ser encontradas en 5-10% de seminomas puros. La vida media de β -HCG es de 18 a 36 h.

LDH Refleja 'el peso del tumor', tasa de crecimiento y proliferación celular. Tiene un significado pronóstico independiente. La LDH se incrementa en alrededor del 80% de seminomas avanzados y en cerca del 60% de TCGT no seminoma ²¹.

Estadio clínico: El siguiente paso después de la confirmación histológica de presencia de TCG es la determinación de la magnitud de la enfermedad (estadificación) para que pueda brindarse la terapia apropiada. Esta variable fue definida según el Sistema de Estadificación Royal Marsden, en el que los TCGT son clasificados de la siguiente forma: ^{10,99}

Estadio	Definición
I	Enfermedad confinada al testículo, sin metástasis evidente.
II	Denota tumores con metástasis en nodos linfáticos del retroperitoneo, estos a su vez son subdivididos: <ul style="list-style-type: none"> • IIA Nodos con diámetro máximo <2cm • IIB Nodos entre 2-5cm • IIC Nodos con diámetro >5cm
III	Enfermedad metastásica en retroperitoneo, usualmente a nodos linfáticos supra-diafragmáticos, parénquima pulmonar, u otros sitios incluyendo hígado, hueso o cerebro
IV	Enfermedad metastásica extranodal

Tabla 9. Esquema de estadificación clínica para TCGT propuesto por el Hospital Royal Marsden, Reino Unido.

Grupo Pronóstico (Grupo Px): Definido de acuerdo a la clasificación del Grupo de Colaboración Internacional de Tumores de Células Germinales (Tabla 2) ^{10,17}.

Grupo de riesgo	TCGT seminoma	TCGT no seminoma	
Buen Pronóstico (91%)	Niveles normales de AFP, β-HCG, LDH	AFP <1000 ng/ml β-HCG <5000mIU/ml LDH <1.5 veces más de los niveles normales	Marcadores tumorales
	Sin presencia de enfermedad metastásica	Metástasis pulmonar y visceral ausente	Sitios de metástasis
	Cualquier sitio primario	Tumores primarios gonadales o retroperitoneales	Localización del tumor primario

Pronóstico Intermedio (79%)	Niveles normales de AFP, β -HCG, LDH	AFP ≥ 1000 ng/ml y $\leq 10,000$ ng/ml	Marcadores tumorales
		β -HCG ≥ 5000 mIU/mL y $\leq 50,000$ mIU/mL	
		LDH ≥ 1.5 y ≤ 10 veces más de los niveles normales	
	Metástasis pulmonar y visceral ausente	Metástasis pulmonar y visceral ausente	Sitios de metástasis
	Cualquier sitio primario	Tumores primarios gonadales o retroperitoneales	Localización del tumor primario
Pobre Pronóstico (48%)	No existe pobre pronóstico en pacientes con TCGT seminoma	AFP $> 10,000$ ng/ml	Marcadores tumorales
		β -HCG $> 50,000$ mIU/mL	
		LDH > 10 veces más del límite normal	
	Metástasis pulmonar y visceral.	Metástasis pulmonar y visceral.	Sitios de metástasis
		Tumor primario en mediastino	Localización del tumor primario

Tabla 10. Clasificación del Grupo de Colaboración Internacional de Tumores de Células Germinales (1997) y supervivencia a 5 años para TCG metastásicos.

Genotipo XPA: Se refiere a las posibles combinaciones alélicas para el polimorfismo 5'UTR de XPA presente en cada individuo: Homócigo silvestre (AA); Heterócigo (AG); y Homócigo polimórfico (GG).

Alelos XPA: Uno de los posibles alelos localizados en el sitio del polimorfismo 5'UTR de XPA, ya sea, silvestre (A) o polimórfico (G).

Número de ciclos de BEP: Número de ciclos de quimioterapia con BEP que recibió el paciente. De acuerdo a los criterios establecidos en el INCan los pacientes reciben los ciclos de quimioterapia cada 21 días y el número de ciclos se determina a partir del estadio del paciente (Fig. 17) el tratamiento de cada ciclo consiste de:

- Bleomicina (30U los días 2, 3 y 4),
- Etopósido (100mg/m² de los días 1 al 5) y
- Cisplatino (100 mg/m² dividido en 5 días o 20 mg/m² cada día por los 5 días de quimioterapia)

En el presente estudio solo se consideraron aquellos pacientes con enfermedad avanzada que recibieron 3 o 4 ciclos de BEP.

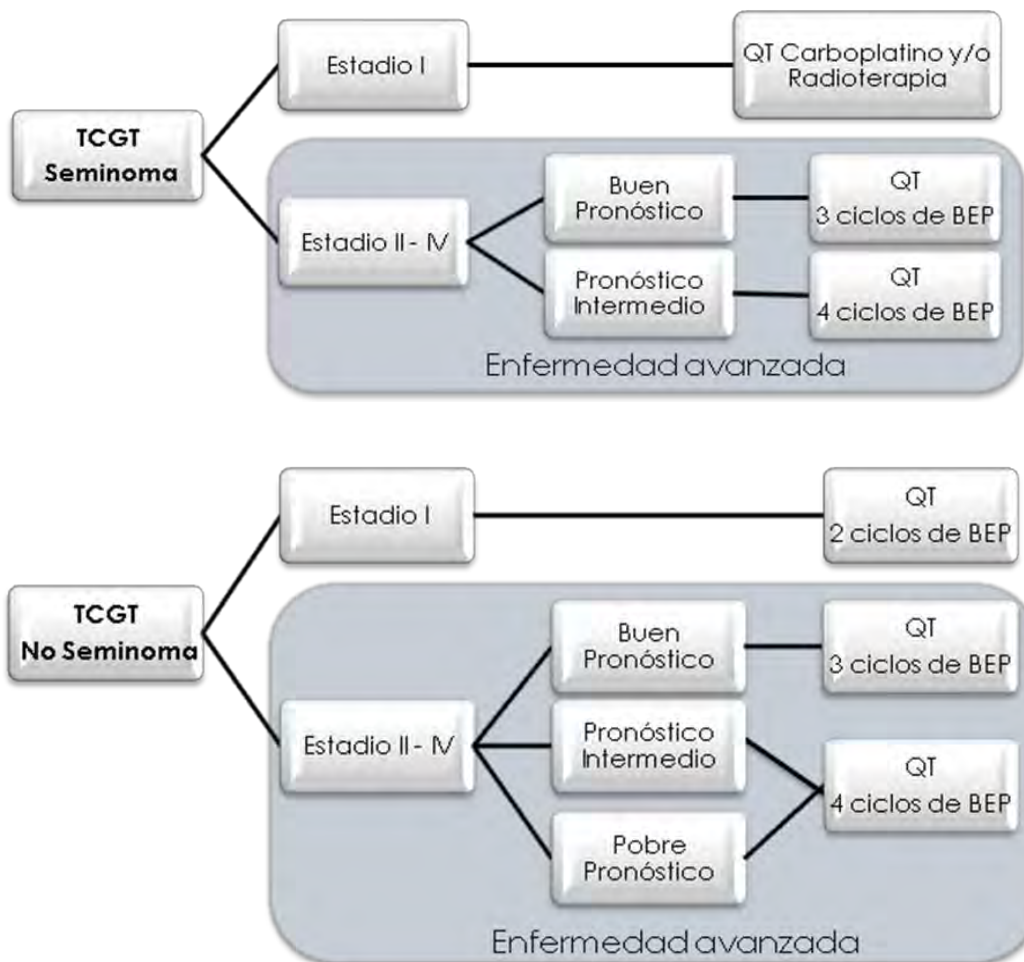


Figura 17. Esquema de quimioterapia empleada en el INCan para pacientes diagnosticados con TCGT.

Respuesta al tratamiento: Esta variable se fue dividida en dos grupos: Sensibles y Resistentes, definidos de acuerdo a la respuesta que presento el paciente al tratamiento basado en cisplatino, para ello se toman en cuenta los marcadores tumorales, si estos negativizan significa que el paciente es sensible al tratamiento.

Toxicidad: Las mayores limitaciones asociadas con el tratamiento de pacientes con cisplatino son los efectos secundarios tales como toxicidad aguda y crónica que en el caso de TCGT se resumen a continuación aquellas evaluadas en el presente estudio:

SVG: Intervalo de tiempo entre la fecha de diagnóstico y la fecha de defunción, de no ser el caso, se toma en cuenta hasta la fecha de la última revisión médica llevada a cabo en el INCan.

SLE: Definida como el intervalo de tiempo entre la fecha del último ciclo de QT y la fecha de la primer recurrencia, en caso de no haber ocurrido, se tomo en cuenta la fecha de la ultima revisión.

Recurrencia: Definida como la aparición verificada por biopsia, de una nueva lesión, reaparición del cáncer que ya había desaparecido, el desarrollo de sintomatología relacionada al tumor, o incremento de marcadores tumorales.

ABREVIATURAS EMPLEADAS EN EL TEXTO

AFP	α -Fetoproteína
BEP	Bleomicina, Etopósido y Cisplatino
BrEt	Bromuro de Etidio
CC	Coriocarcinoma
CE	Carcinoma Embrionario
CGP	Células Germinales Primordiales
CSA	Síndrome de Cocaine grupo A
CSB	Síndrome de Cocaine grupo B
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
GGR	Reparación del Genoma Global
HCG	Gonadotropina corionica humana
HMG	Grupo de Alta Movilidad
HSP	Proteínas de Choque Térmico
IGCNU	Neoplasia Intratubular de Células Germinales de tipo No clasificado
INCan	Instituto Nacional de Cancerología
LDH	Lactato deshidrogenasa
Luz UV	Luz Ultravioleta
NER	Reparación por Escisión de Nucleótidos
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
RFLP	Polimorfismo del tamaño de los Fragmentos de Restricción
RNA Pol	Polimerasa de Ácido Ribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAm	Mensajero de Ácido Ribonucleico

RPA	Proteína de Replicación A
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
TCG	Tumor(es) de Células Germinales
TCGT	Tumor(es) de Células Germinales de Testículo
TCR	Reparación Acoplada a la Transcripción
TER	Teratoma
TSV	Tumores del Saco Vitelino
UTR	Región No codificante
XPA	Xeroderma pigmentosa grupo A
XPC	Xeroderma pigmentosa grupo C

ABREVIATURAS DE MEDIDAS Y REACTIVOS

dNTP	deoxiribonucleótidos
EDTA	Ácido Etilen Diamino-Tetra-Acético
EtOH	Etanol
h	horas
H ₂ O	Agua
KDa	Kilo Daltones
M	Molar
min	minutos
ml	mililitros
mM	milimolar
MQ	Mili Q
pb	pares de bases
rpm	revoluciones por minuto
s	segundos
TBE	Tris-Borato-EDTA
HCl	Ácido Clorhídrico
U	Unidades
μl	microlitros
μm	micras

GLOSARIO

Aducto: Complejo que se forma cuando un compuesto inorgánico (compuesto químico) se une a una molécula biológica (DNA, proteínas)

Alelo: Uno de los posibles estados mutacionales de un gen, que se distingue de otros alelos por sus efectos fenotípicos.

Antineoplásico: Sustancia que impiden el desarrollo, crecimiento, y/o proliferación de células tumorales malignas. Estas sustancias pueden ser de origen natural, sintético o semisintético.

Apoptosis: La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso celular genéticamente controlado por el que las células inducen su propia muerte en respuesta a determinados estímulos.

Atrofia: En términos biológicos consiste en una disminución importante del tamaño de la célula y del órgano del que forma parte, debido a la pérdida de masa celular. Las células atroficas muestran una disminución de la función pero no están muertas.

Blastocito: Es una estructura embrionaria presente en las etapas tempranas del desarrollo embrionario. Las células del blastocisto son pluripotentes, es decir las células de la masa celular interna pueden convertirse en cualquier tipo de tejido, excepto la placenta

Células anaplásicas: Células que han revertido a un estado embrionario, células no diferenciadas, características de neoplasias malignas.

Citotrofoblasto: Es un término que se emplea para la capa más interna del trofoblasto, funciona como un anclaje para el corión embrionario al endometrio materno.

Criptorquidia: Es la ausencia de uno o ambos testículos en el escroto, lo que representa una falla al momento de su descendimiento durante el desarrollo fetal.

Electroforesis: Es la técnica por la cual mezclas complejas de moléculas como proteínas, DNA o RNA se separan gracias a su diferente movilidad en un campo eléctrico, de acuerdo a su tamaño y su carga eléctrica. Se realiza habitualmente sobre un gel (de poliacrilamida o agarosa).

Enzima de restricción: Es una enzima que puede reconocer una secuencia característica de nucleótidos dentro de una molécula de ADN y cortar el ADN en ese punto en concreto

Enlace Intercatenario: Se refiere a la unión entre cadenas de DNA.

Enlace Intracatenario: Enlaces formados en la misma cadena de DNA.

Etiología: Es el estudio de las causas de las enfermedades.

Farmacocinética: Se refiere a los procesos a los que un fármaco es sometido a través de su paso por el organismo, desde el momento en el que es administrado hasta su total eliminación del cuerpo.

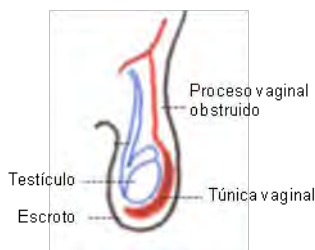
Fenotipo: Propiedades observables de un organismo influenciadas genéticamente y por factores ambientales.

Genoma: Dotación de genes que lleva un individuo.

Grupo saliente: Es un átomo o grupo de átomos que se desligan de una sustancia química.

Helicasas: Esta enzima participa en los procesos de replicación, transcripción, recombinación y reparación del ADN, su misión es romper los puentes de hidrógeno que unen las bases nitrogenadas.

Hernia inguinal: Una hernia inguinal se deriva de la persistencia total o parcial del proceso vaginal, el tubo de peritoneo que antecede el testículo dentro del escroto durante el octavo mes de embarazo. Después que los testículos caen dentro del escroto, el proceso vaginal se atrofia y cierra formando la túnica vaginal que yace debajo del testículo en el escroto. Cuando esto no sucede, el líquido desde el abdomen o un órgano abdominal (usualmente los intestinos) es forzado dentro de ella causando un abultamiento o una masa que se puede detectar al tacto. El proceso vaginal puede extenderse parcialmente desde el canal inguinal o completamente dentro del escroto.



Escroto normal: el proceso vaginal y la túnica vaginal son obliterados y no contienen líquido ni materia intestinal.



Hernia inguinal: el proceso vaginal ha permanecido abierto permitiendo el ingreso de materia intestinal (líquido y curvaturas del intestino) dentro del escroto.

Locus: Lugar del cromosoma en donde se localiza un gen dado.

Mediastino: Espacio comprendido entre ambas pleuras en la línea media de la jaula torácica que se divide en dos partes: mediastino anterior se encuentran el timo, el corazón, el pericardio, grandes vasos y bifurcación de la tráquea. En el mediastino posterior están comprendidos la aorta, esófago, y el conducto torácico,

Metástasis: Es la propagación de de células cancerosas de un órgano tejido a otro distinto de aquel en que se inició el cáncer, ocurre generalmente por vía sanguínea o linfática.

Mutación: Proceso que da lugar a una alteración en el DNA o en la estructura de un cromosoma; el origen de la mayoría de los alelos.

Neoplasia: Proliferación de células, de manera persistente y anormal, relativamente autónoma de una serie de alteraciones estructurales en determinadas células con capacidad de transmisión a otras células. En el cáncer una célula modifica su composición genética de manera que ese cambio genera un clon que se multiplica y forma la masa tumoral.

Nodos linfáticos: Son pequeñas agrupaciones celulares con forma de frijol que se encuentran en todo el cuerpo y se conectan mediante los vasos linfáticos, son acúmulos de linfocitos bien definidos contenidos en una malla de fibras reticulares.

Nucleasa: Son enzimas hidrolasas que catalizan la ruptura de los enlaces fosfodiéster.

Nucleófilo: Es una especie que reacciona cediendo un par de electrones libres a otra especie (el electrófilo), combinándose y enlazándose covalentemente con ella.

Nucleótido: Son moléculas orgánicas formadas por la unión covalente de un monosacárido de cinco carbonos (pentosa), una base nitrogenada y un grupo fosfato. Los nucleótidos son las piezas básicas para la construcción de los ácidos nucleicos.

Orquiectomía: Cirugía que consiste en la extirpación total o parcial del testículo.

Polimerasa: Enzimas que catalizan la formación de DNA y de RNA a partir de desoxirribonucleótidos y de ribonucleótidos, respectivamente.

Polimorfismo del tamaño de los Fragmentos de Restricción (RFLP): Variación de la longitud de los fragmentos de DNA generados por enzimas de restricción. Estas variaciones están ocasionadas por mutaciones que crean o suprimen sitios de corte para las enzimas de restricción.

Quimioterapia: Es aquel tratamiento médico basado en la administración de sustancias químicas (fármacos), administrado para el tratamiento contra el cáncer.

Retroperitoneo: Es la región anatómica abdominopélvica, localizada por detrás del peritoneo, que contiene, entre otros órganos, el páncreas, los grandes vasos abdominales, los riñones y las glándulas suprarrenales.

Sincitiotrofoblasto: es la capa más externa del trofoblasto embrionario, adosada al citotrofoblasto, cuya función es erosionar los capilares del endometrio materno en el desarrollo de la circulación placentaria. El prefijo sincitio da alusión al hecho de que

son células que han perdido su membrana celular, por lo que les da la apariencia de ser multinucleadas.

Tioles: Son compuestos que contiene el grupo funcional formado por un átomo de azufre y un átomo de hidrógeno (-SH), tales como la Glutathione, esta es el principal antioxidante endógeno producido por la célula, participa en la neutralización de radicales libres, especies reactivas de oxígeno, y el mantenimiento de antioxidantes exógenos como las vitaminas C y E y sus formas reducidas.

Trofoblasto: Es un grupo de células que forman la capa externa del blastocito, que provee nutrientes al embrión y se desarrolla como parte importante de la placenta. El trofoblasto está compuesto por células invasivas, erosionantes y metastásicas de la placenta.

REFERENCIAS

1. García M et al. Global Cancer Facts and Figures 2007. Atlanta, GA: American Cancer Society (2007).
2. Stratton, M.R., Campbell, P.J. & Futreal, P.A. The cancer genome. *Nature* **458**, 719-724(2009).
3. Trichopoulos, D., Li, F.P. & Hunter, D.J. What causes cancer? *Sci. Am* **275**, 80-87(1996).
4. Futreal, P.A. et al. A census of human cancer genes. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 177-183(2004).
5. Souhami, R & Tobias, J Cancer and its Management 3rd edn. *Blackwell Science, Oxford* (1998).
6. Fact Sheets Twelve major cancers. *Scientific Am* **275**, 92-98(1996).
7. Rabik, C.A. & Dolan, M.E. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat. Rev* **33**, 9-23(2007).
8. Siddik, Z.H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* **22**, 7265-7279(2003).
9. Savage, P. et al. Why does cytotoxic chemotherapy cure only some cancers? *Nat Clin Pract Oncol* **6**, 43-52(2009).
10. Bosl, G.J. & Motzer, R.J. Testicular germ-cell cancer. *N. Engl. J. Med* **337**, 242-253(1997).
11. Mayer, F. et al. Towards an understanding of the biological basis of response to cisplatin-based chemotherapy in germ-cell tumors. *Ann. Oncol* **14**, 825-832(2003).
12. Rick, O., Siegert, W. & Beyer, J. Chemotherapy in patients with metastatic or relapsed germ-cell tumours. *Cancer Treat. Rev* **27**, 283-288(2001).
13. Einhorn, L.H. Curing metastatic testicular cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **99**, 4592-4595(2002).
14. Wang, X., Hafezparast, M. & Masters, J.R. Genetic basis of drug sensitivity in human testis tumour cells. *Int. J. Cancer* **65**, 426-431(1996).
15. Chaganti, R.S. & Houldsworth, J. Genetics and biology of adult human male germ cell tumors. *Cancer Res* **60**, 1475-1482(2000).
16. di Pietro, A. et al. Testicular germ cell tumours: the paradigm of chemo-sensitive solid tumours. *Int. J. Biochem. Cell Biol* **37**, 2437-2456(2005).
17. Horwich, A., Shipley, J. & Huddart, R. Testicular germ-cell cancer. *Lancet* **367**, 754-765(2006).

18. Giwercman, A., Müller, J. & Skakkebaek, N.E. Carcinoma in situ of the testis: possible origin, clinical significance, and diagnostic methods. *Recent Results Cancer Res* **123**, 21-36(1991).
19. Houldsworth, J. et al. Biology and genetics of adult male germ cell tumors. *J. Clin. Oncol* **24**, 5512-5518(2006).
20. Skakkebaek, N.E., Berthelsen, J.G. & Müller, J. Carcinoma-in-situ of the undescended testis. *Urol. Clin. North Am* **9**, 377-385(1982).
21. Gori, S. et al. Germ cell tumours of the testis. *Crit. Rev. Oncol. Hematol* **53**, 141-164(2005).
22. Looijenga, L.H.J. Human testicular (non)seminomatous germ cell tumours: the clinical implications of recent pathobiological insights. *J. Pathol* **218**, 146-162(2009).
23. Jemal, A. et al. Cancer Statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* **58**, 71-96(2008).
24. Registro Histopatológico Nacional de México. (2002).
25. Woodward PJ et al. Germ Cell Tumours. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of the Urinary System and Male Genital Organs* 218-249(2004).
26. Ferlay J et al. GLOBOCAN 2000: Cancer incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. (2001).
27. Giwercman, A. et al. Evidence for increasing incidence of abnormalities of the human testis: a review. *Environ. Health Perspect* **101 Suppl 2**, 65-71(1993).
28. Swerdlow, A.J. et al. Trends in cancer incidence and mortality in Scotland: description and possible explanations. *Br. J. Cancer* **77 Suppl 3**, 1-54(1998).
29. Reuter, V. Origins and molecular biology of testicular germ cell tumors. *Modern Pathology* **18**, S51-S60(2005).
30. Tollerud, D.J. et al. Familial testicular cancer and urogenital developmental anomalies. *Cancer* **55**, 1849-1854(1985).
31. Walsh, T.J. et al. Increased risk of testicular germ cell cancer among infertile men. *Arch. Intern. Med* **169**, 351-356(2009).
32. Jacobsen, R. et al. Risk of testicular cancer in men with abnormal semen characteristics: cohort study. *BMJ* **321**, 789-792(2000).
33. Gallagher, R.P. et al. Physical activity, medical history, and risk of testicular cancer (Alberta and British Columbia, Canada). *Cancer Causes Control* **6**, 398-406(1995).
34. Nichols, C.R. et al. Klinefelter's syndrome associated with mediastinal germ cell neoplasms. *J. Clin. Oncol* **5**, 1290-1294(1987).

35. Levin, H.S. Tumors of the testis in intersex syndromes. *Urol. Clin. North Am* **27**, 543-551, x(2000).
36. Satgé, D. et al. An excess of testicular germ cell tumors in Down's syndrome: three case reports and a review of the literature. *Cancer* **80**, 929-935(1997).
37. Chaganti, R.S., Rodriguez, E. & Bosl, G.J. Cytogenetics of male germ-cell tumors. *Urol. Clin. North Am* **20**, 55-66(1993).
38. Mostert, M.C. et al. Identification of the critical region of 12p over-representation in testicular germ cell tumors of adolescents and adults. *Oncogene* **16**, 2617-2627(1998).
39. Bosl, G.J. et al. Impact of delay in diagnosis on clinical stage of testicular cancer. *Lancet* **2**, 970-973(1981).
40. Williams, S.D. et al. Treatment of disseminated germ-cell tumors with cisplatin, bleomycin, and either vinblastine or etoposide. *N. Engl. J. Med* **316**, 1435-1440(1987).
41. Jones, R.H. & Vasey, P.A. Part II: testicular cancer--management of advanced disease. *Lancet Oncol* **4**, 738-747(2003).
42. Shelley, M.D., Burgon, K. & Mason, M.D. Treatment of testicular germ-cell cancer: a cochrane evidence-based systematic review. *Cancer Treat. Rev* **28**, 237-253(2002).
43. 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* **48**, 400-407(2005).
44. Sirohi, B. & Huddart, R. The management of poor-prognosis, non-seminomatous germ-cell tumours. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* **17**, 543-552(2005).
45. Jamieson, E.R. & Lippard, S.J. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem. Rev* **99**, 2467-2498(1999).
46. Rosenberg, B. et al. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature* **222**, 385-386(1969).
47. Lippert, B. *Cisplatin*. 563(Helvetica Chimica Acta: 1999).
48. Martin, L.P., Hamilton, T.C. & Schilder, R.J. Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. *Clin. Cancer Res* **14**, 1291-1295(2008).
49. Rosenberg Barnett & Lippert Bernhard Platinum Complexes for the Treatment of Cancer: Why the search Goes On. *Cisplatin* 563(1999).
50. Woźniak, K. & Błasiak, J. Recognition and repair of DNA-cisplatin adducts. *Acta Biochim. Pol* **49**, 583-596(2002).
51. Kelland, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 573-584(2007).

52. Dabholkar, M. et al. Cisplatin-DNA damage and repair in peripheral blood leukocytes in vivo and in vitro. *Environ. Health Perspect* **98**, 53-59(1992).
53. Malinge, J.M., Giraud-Panis, M.J. & Leng, M. Interstrand cross-links of cisplatin induce striking distortions in DNA. *J. Inorg. Biochem* **77**, 23-29(1999).
54. Takahara, P.M. et al. Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin. *Nature* **377**, 649-652(1995).
55. De Vita et al. DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles and Practice of Oncology. 3200(2005).
56. Zamble, D.B. et al. Repair of cisplatin--DNA adducts by the mammalian excision nuclease. *Biochemistry* **35**, 10004-10013(1996).
57. Masters, J.R.W. & Köberle, B. Curing metastatic cancer: lessons from testicular germ-cell tumours. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 517-525(2003).
58. Kartalou, M. & Essigmann, J.M. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat. Res* **478**, 23-43(2001).
59. Brabec, V. & Kasparkova, J. Molecular aspects of resistance to antitumor platinum drugs. *Drug Resist. Updat* **5**, 147-161(2002).
60. Walker, M.C., Parris, C.N. & Masters, J.R. Differential sensitivities of human testicular and bladder tumor cell lines to chemotherapeutic drugs. *J. Natl. Cancer Inst* **79**, 213-216(1987).
61. Fry, A.M. et al. Relationship between topoisomerase II level and chemosensitivity in human tumor cell lines. *Cancer Res* **51**, 6592-6595(1991).
62. Oosterhuis, J.W. et al. Effects of cis-platinum on embryonal carcinoma cell lines in vitro. *Int. J. Cancer* **34**, 133-139(1984).
63. Sark, M.W. et al. Cellular basis for differential sensitivity to cisplatin in human germ cell tumour and colon carcinoma cell lines. *Br. J. Cancer* **71**, 684-690(1995).
64. Masters, J.R. et al. Sensitivity of testis tumour cells to chemotherapeutic drugs: role of detoxifying pathways. *Eur. J. Cancer* **32A**, 1248-1253(1996).
65. Richards, E.H. et al. Effect of overexpression of the small heat shock protein HSP27 on the heat and drug sensitivities of human testis tumor cells. *Cancer Res* **56**, 2446-2451(1996).
66. Hettinga, J.V. et al. Heat-shock protein expression in cisplatin-sensitive and -resistant human tumor cells. *Int. J. Cancer* **67**, 800-807(1996).
67. Kersemaekers, A.F. et al. Role of P53 and MDM2 in treatment response of human germ cell tumors. *J. Clin. Oncol* **20**, 1551-1561(2002).
68. Mayer, F. et al. Molecular determinants of treatment response in human germ cell tumors. *Clin. Cancer Res* **9**, 767-773(2003).

69. Köberle, B. et al. DNA repair capacity and cisplatin sensitivity of human testis tumour cells. *Int. J. Cancer* **70**, 551-555(1997).
70. Köberle, B. et al. DNA repair in cisplatin-sensitive and resistant human cell lines measured in specific genes by quantitative polymerase chain reaction. *Biochem. Pharmacol* **52**, 1729-1734(1996).
71. Nospikel, T. DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell. Mol. Life Sci* **66**, 994-1009(2009).
72. Sugasawa, K. et al. A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair. *Genes Dev* **15**, 507-521(2001).
73. Park, C. & Choi, B. The protein shuffle. Sequential interactions among components of the human nucleotide excision repair pathway. *FEBS J* **273**, 1600-1608(2006).
74. Hoeijmakers, J.H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**, 366-374(2001).
75. Gillet, L.C.J. & Scharer, O.D. Molecular Mechanisms of Mammalian Global Genome Nucleotide Excision Repair. *Chemical Reviews* **106**, 253-276(2006).
76. Bedford, P. et al. Differential repair of platinum-DNA adducts in human bladder and testicular tumor continuous cell lines. *Cancer Res* **48**, 3019-3024(1988).
77. Hill, B.T. et al. Deficient repair of cisplatin-DNA adducts identified in human testicular teratoma cell lines established from tumours from untreated patients. *Eur. J. Cancer* **30A**, 832-837(1994).
78. Köberle, B. et al. Defective repair of cisplatin-induced DNA damage caused by reduced XPA protein in testicular germ cell tumours. *Curr. Biol* **9**, 273-276(1999).
79. Camenisch, U. & Nägeli, H. XPA gene, its product and biological roles. *Adv. Exp. Med. Biol* **637**, 28-38(2008).
80. Satokata, I. et al. Three nonsense mutations responsible for group A xeroderma pigmentosum. *Mutat. Res* **273**, 193-202(1992).
81. Nakane, H. et al. High incidence of ultraviolet-B-or chemical-carcinogen-induced skin tumours in mice lacking the xeroderma pigmentosum group A gene. *Nature* **377**, 165-168(1995).
82. de Vries, A. et al. Increased susceptibility to ultraviolet-B and carcinogens of mice lacking the DNA excision repair gene XPA. *Nature* **377**, 169-173(1995).
83. Zhen, W. et al. Deficient gene specific repair of cisplatin-induced lesions in Xeroderma pigmentosum and Fanconi's anemia cell lines. *Carcinogenesis* **14**, 919-924(1993).
84. Dabholkar, M. et al. Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy. *J. Clin. Invest* **94**, 703-708(1994).

85. Köberle, B. et al. Elevation of XPA protein level in testis tumor cells without increasing resistance to cisplatin or UV radiation. *Mol. Carcinog* **47**, 580-586(2008).
86. Sachidanandam, R. et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* **409**, 928-933(2001).
87. Wang, D.G. et al. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* **280**, 1077-1082(1998).
88. Syvänen, A.C. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nat. Rev. Genet* **2**, 930-942(2001).
89. Gowda, S. et al. Single nucleotide polymorphism analysis of the nucleotide excision repair genes XPC, XPA, and XPG in the Indian population. *Hum. Biol* **79**, 545-562(2007).
90. Butkiewicz, D. et al. Identification of four single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes: XPA and XPB (ERCC3) in Polish population. *Hum. Mutat* **15**, 577-578(2000).
91. Kiyohara, C. & Yoshimasu, K. Genetic polymorphisms in the nucleotide excision repair pathway and lung cancer risk: a meta-analysis. *Int J Med Sci* **4**, 59-71(2007).
92. Park, J.Y. et al. Polymorphisms of the DNA repair gene xeroderma pigmentosum group A and risk of primary lung cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* **11**, 993-997(2002).
93. Wu, X. et al. XPA polymorphism associated with reduced lung cancer risk and a modulating effect on nucleotide excision repair capacity. *Carcinogenesis* **24**, 505-509(2003).
94. Saldivar, J.S. et al. Moving toward individualized therapy based on NER polymorphisms that predict platinum sensitivity in ovarian cancer patients. *Gynecol. Oncol* **107**, S223-229(2007).
95. Friedberg, E.C. How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat. Rev. Cancer* **1**, 22-33(2001).
96. Welsh, C. et al. Reduced levels of XPA, ERCC1 and XPF DNA repair proteins in testis tumor cell lines. *Int. J. Cancer* **110**, 352-361(2004).
97. Honecker, F. et al. Xeroderma pigmentosum group a protein and chemotherapy resistance in human germ cell tumors. *Lab. Invest* **83**, 1489-1495(2003).
98. Mendoza, J. et al. Association between Polymorphism and Expression of ERCC1 and XPA on Cisplatin Response, and Prognosis in Patients with Nonseminomatous Germ Testicular Cell Cancer. *Manuscrito en revisión* (2009).
99. Ryan, C.J., Small, E.J. & Torti, F.M. Testicular Cancer, en Abeloff, D. et. al. (Eds.) *Abeloff's Clinical Oncology*. Elsevier, Estados Unidos. 2175-2216(2008).