



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO 8092C→A DE ERCC1  
CON LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON CISPLATINO,  
ESTUDIO IN VITRO**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
BIÓLOGA**

**PRESENTA:**

**AUREA BERENICE GARCÍA JASSO**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

1. Datos del Alumno

García  
Jasso  
Aurea Berenice  
56101411  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
303680705

2. Datos del tutor

Dr.  
Luis Alonso  
Herrera  
Montalvo

3. Datos del sinodal 1

Dr.  
Emilio  
Rojas del Castillo

4. Datos del sinodal 2

Dra.  
Regina Dorinda  
Montero  
Montoya

5. Datos del sinodal 3

Biól. Miguel  
Santibañez  
Andrade

6. Datos del sinodal 4

Biól. Marco Alonso  
Andonegui  
Elguera

7. Datos del trabajo escrito

Asociación del polimorfismo 8092cA de ERCC1(excision repair cross complementation group 1) con la respuesta al tratamiento con cisplatino, estudio in vitro  
84p  
2013

## DEDICATORIAS

### A MI MADRE:

Gracias por darme la vida y permitirme ser una mujer con valores y principios. Por ser un ejemplo a seguir. Porque has dedicado cada minuto de tu vida a luchar para salir a delante ante cualquier situación. Porque me has inculcado que la satisfacción se encuentra en mis propios logros y no en las apreciaciones de los demás. Por anteponerme antes incluso de ti misma. Porque aunque la caída sea muy dolorosa me has enseñado a levantarme y seguir con la frente en alto. Porque por ti he aprendido de mis errores. Porque eres y serás siempre lo mejor que tengo en mi vida. Gracias por compartir todas mis alegrías y por brindarme todo tu apoyo siempre sin defraudarme. Gracias por enseñarme que con esfuerzo y dedicación siempre se logran todos los objetivos. Gracias por todo esto y mucho más, simplemente por ser mi madre.....

A ti te dedico todas mis victorias, mi vida y mi ser.....

A mi tía **CHINA**, porque has sido para mí como una segunda madre. Gracias por velar por mí, por brindarme siempre tu apoyo incondicional. Por estar siempre que lo he necesitado y aun cuando no lo he necesitado incondicionalmente estas ahí. Por ser mi cómplice y confidente en todas mis aventuras. Por ser una guía y un pilar en mí camino. Por enseñarme que el amor y cariño verdadero se manifiestan sin esperar nada a cambio. Gracias por ser una persona tan importante, que valoro y agradezco a la vida tener una tía como tú. Las vida no me alcanzaría para agradecerte todo lo que me has ayudado, pero espero al menos que este logro más que he tenido en mi vida, sirva para que te sientas muy orgullosa de mí y sea una manera de retribuirte por todo lo que me has dado.....

Te quiero mucho

A **GEPE**.... Por ser un ejemplo de padre, que siempre estuvo y sé que estará en cada momento de mi vida. Porque me has sacado a delante en las situaciones más difíciles, por creer en mí y en mis locuras. Porque siempre has sido un ejemplo digno de superación y entrega. Porque eres el pilar de todos nosotros, ya que sin ti no estaríamos ni tendríamos todo lo que tenemos, una gran familia. Gracias por todo lo que me has dado y enseñado sin tener obligación alguna, A pesar de todo lo que pasaste y sufriste hace unos meses siempre

tuviste tiempo para nosotros y disposición en todo momento. Solo te puedo decir que te agradezco infinitamente todo lo que has hecho por mí y mi mamá,

Te quiero mucho y GRACIAS.....

A **Leonardo**.....No sabes cuánto agradezco tener a un primo hermano como tú, porque así te considero yo, como un hermano. Gracias por todo tu cariño y apoyo siempre. Por ser un ejemplo de nobleza y ser siempre compartido con los demás. Por todas las aventuras y travesuras que hemos vivido juntos, por ser mi confidente y nunca dejarme sola. Porque desde que tengo memoria siempre hemos estado juntos, y nunca nos hemos separado. Gracias por cuidarme y preocuparte por mí. Gracias por ser mi hermano, mi amigo, mi confidente, mi compañero, mi ángel de la guarda; por esto y mucho más gracias. Estoy muy orgullosa de que seas mi hermano y agradezco a la vida el tenerte a mi lado.....

Te quiero mucho.....

A mi tío **Sergio**. Gracias por brindarme todo tu apoyo y consejos. Porque siempre te has preocupado por mí mamá y por mí. Porque desde pequeña me has cuidado y aconsejado en todo momento y más aún siempre me has tenido presente. Muchas gracias por todo lo que me has enseñado y aportado. Agradezco en todo momento tenerte en mi vida y contar contigo siempre. Muchas gracias!

A mi profesor **Fede** por ser un gran ejemplo de dedicación y esfuerzo. Por ser una guía durante la decisión más difícil de mi vida, la de elegir qué carrera estudiar y por ser una fuente de conocimientos interminable.

Gracias a Dios y a la vida por un logro más en mi formación académica

*Aurea Berenice García Jasso*

## AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo** por brindarme su apoyo y permitirme realizar este proyecto de tesis en su laboratorio. Gracias por sus consejos y aportaciones para que este proyecto fuera posible. Por tener el tiempo y disposición para convivir con todos y estar al pendiente de cada uno de nosotros. Muchas Gracias!

A la **M en IIB** Clementina Castro Hernández. Por todos sus consejos y compromiso que siempre manifestaste conmigo y con los demás compañeros de trabajo. Por ser más que una compañera de trabajo, siempre me brindaste tu apoyo y amistad en todo momento. Por hacer que el ambiente del laboratorio sea armonioso y cordial. Por tu paciencia y aportaciones para poder llevar a cabo mi tesis. Muchas Gracias!

Al **Dr. Diddier Giovanni Prada-Ortega**. Gracias por ser más que un compañero de trabajo y brindarme todo tu apoyo tanto académico como no académico. Por todos tus consejos y regaños. Gracias por tu amistad incondicional. Muchas gracias!

Al **Biól. Miguel Santibáñez Andrade** por los consejos y apoyo que me ofreciste en todo momento durante la realización de este proyecto. Porque la relación tutor-alumno fue más allá y se convirtió en una bonita amistad. Muchas gracias!

Al **Biól. Marco Andonegui Elguera**. No me queda más que agradecerte por todo tu apoyo, por tu paciencia y entusiasmo al momento de enseñarme a lo largo de todo el trabajo de mi tesis. Por todas esas horas que dedicaste a instruirme para poder manejar adecuadamente

el citómetro de flujo. Por brindarme tu ayuda en los momentos que más necesite y por ofrecerme tu amistad. Muchas Gracias!

A la **Biól. Julia Mendoza Pérez**. Por ser compañera, amiga y colega. Gracias por tu apoyo académico durante todo este tiempo. Por tus consejos, regaños, recomendaciones y travesuras. Gracias por brindarme tu amistad y sobre todo ayudarme en todo momento. Muchas gracias!

A mis amigos, compañeros y colegas del laboratorio de carcinogénesis, por el esfuerzo y apoyo para la elaboración de este proyecto de tesis, ya que sin su ayuda esto no hubiera sido posible.....Muchas gracias.....

## ÍNDICE

1.- RESUMEN .....	10
2. Abreviaturas y siglas .....	12
3. INTRODUCCIÓN .....	16
4. DNA: su estructura y función.....	16
5. Ciclo celular.....	18
6. Mecanismos de síntesis del DNA.....	19
7. Tipos de daño al DNA	
7.1 Factores endógenos.....	21
7.2 Factores exógenos.....	22
8. Mecanismos de reparación del DNA	
8.1 Reparación por escisión de bases (BER).....	23
8.2 Reparación por escisión de nucleótidos (NER).....	23
8.3 Reparación de bases mal apareadas (MISMATCH) .....	24
8.4 Reparación por recombinación homóloga .....	25
9. Componentes de la vía NER y función.	
9.1 GGR.....	27
9.2 TCR.....	28
10. Agentes antineoplásicos y vía NER.....	29
10.1 Platinos: Características principales.....	31
10.2 Cisplatino. Mecanismo de acción.....	33
11. Genes de reparación NER y polimorfismos.....	34
11.1 Definición polimorfismo.....	35
11.2 SNPs.....	35
11.3 Polimorfismos del gen ERCC1.....	36

12. Polimorfismo 8092 C→A de ERCC1. Antecedentes.....	38
13. Justificación.....	40
14. Pregunta de investigación.....	40
15. Hipótesis.....	40
16. Objetivo general.....	40
17. Objetivos particulares.....	41
18. Materiales y métodos	
18.1 Determinación del polimorfismo Ercc1 8092 C→A en muestras de sangre periférica de individuos.....	41
18.2 Parámetros de selección de individuos sanos.....	41
18.3 Aislamiento de DNA.....	42
18.4 Cuantificación de cantidad y pureza de DNA.....	44
18.5 Amplificación del fragmento 3' UTR de Ercc1 mediante PCR.....	44
18.6 RFLP y genotipificación del polimorfismo Ercc1 8092 C→A.....	46
18.7 Viabilidad celular.....	47
18.8 Aislamiento de linfocitos de sangre periférica.....	47
18.9 Condiciones de cultivo de linfocitos.....	49
18.10 Ensayo de proliferación celular (WST – 1).....	50
18.11 Análisis de la viabilidad celular y determinación de la IC50 en linfocitos tratados con cisplatino.....	51
18.12.- Tinción con Ioduro para evaluación del ciclo celular.....	52
18.13. Daño al DNA por medio de la técnica de conteo de micronúcleos (MN) por bloqueo de citocinesis.....	52
19. Análisis estadístico.....	54
20. Resultados.....	55
21. Discusión.....	67

22. Conclusión..... 70

20. Referencias..... 71

## 1. RESUMEN

**Introducción:** Entre los mecanismos de reparación del DNA se encuentra la vía de reparación NER, que involucra varios pasos: reconocimiento del daño, apertura de la burbuja de desnaturalización, incisión de la cadena dañada, la re – síntesis, y la ligación. Esta vía se encarga de reparar lesiones covalentes que forman aductos en el DNA. En mamíferos la vía NER es el principal sistema que remueve aductos en el DNA generados por agentes quimioterapéuticos. El cisplatino daña el DNA por la formación de aductos, entre los principales se encuentran los intracatenarios e intercatenarios con el DNA. ERCC1 forma un heterodímero con la proteína XPF, que tiene la actividad de exonucleasa catalizando la incisión en dirección 5', y repara entrecruzamientos intercatenarios. El polimorfismo 8092C→A de ERCC1 es un cambio de una C por una A, y se encuentra en la región 3' no codificante UTR. El polimorfismo 8092C→A de ERCC1 predice mejor supervivencia para el tratamiento con cisplatino en cáncer de pulmón de células no pequeñas y puede afectar la estabilidad del mRNA de ERCC1.

**Hipotesis:** La presencia del polimorfismo de ERCC1 8092C→A genera una menor reparación del DNA, por lo cual habrá una menor viabilidad celular con el tratamiento con cisplatino.

**Objetivo:** Estudiar la asociación del polimorfismo 8092C→A del gen ERCC1 con la respuesta celular al tratamiento con cisplatino.

**Métodos:** Se extrajo DNA de individuos sanos y se determinó la presencia de la proteína por medio de PCR y de los genotipos correspondientes por medio de la técnica de RFLP: heterócigo CA, polimórfico AA y silvestre CC. Se hicieron cultivos de linfocitos humanos tratados con CDDP a las 24h de los individuos de interés, para establecer la IC50 y observar la viabilidad celular en función del genotipo. Se evaluó el daño al DNA mediante el ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis.

**Resultados:** Fueron analizadas un total de 86 muestras de las cuales 13 (15%) fueron polimórficos (AA), 41 (48%) heterócigos (CA) y 32 (37%) silvestres (CC). Células que presentan al menos un alelo polimórfico presentan una IC50 menor en comparación con las células portadoras del genotipo homócigo silvestre. Las IC50 fueron las siguientes: homócigos polimórficos 70µM, heterócigos 80µM y homócigos silvestres 91µM. La viabilidad

celular fue menor en el genotipo AA respecto a los otros genotipos (CA, CC) a las 24h de tratamiento con CDDP. Células con genotipos AA presentaron mayor daño al DNA, lo cual se ve reflejado en un conteo mayor de micronúcleos, a diferencia de células con genotipo CC.

**Conclusión:** La presencia del polimorfismo 8092C→A del gen *ERCC1*, se asocia con una disminución en la viabilidad celular de cultivos de linfocitos y una mayor respuesta al tratamiento con cisplatino, así mismo este polimorfismo se asoció con un incremento en la generación de MN evidenciando mayor daño al DNA.

## 2.- SIGLAS Y ABREVIATURAS

<b>A</b>	Adenina
<b>APE1</b>	Endonucleasa Apurinca/apirimidinica 1
<b>BER</b>	Reparación por escisión de bases
<b>C</b>	Citosina
<b>CBMN</b>	Micronúcleos por bloqueo de la citocinesis
<b>CDDP</b>	Cis-diamino-dicloro-platino. Cisplatino
<b>CPD<sub>s</sub></b>	Dímeros de ciclo butano
<b>CSA</b>	Síndrome de Cocaine grupo A
<b>CSB</b>	Síndrome de Cocaine grupo B
<b>DBS</b>	Rompimientos de doble cadena
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>DNA Lig</b>	Ligasa de DNA
<b>DNA Pol</b>	Polimerasa de DNA
<b>DNA-PKc</b>	Proteína cinasa dependiente de DNA, subunidad catalítica.
<b>ERCC1</b>	Excision repair cross-complementing 1
<b>EXO1</b>	Exonucleasa 1
<b>FEN-1</b>	Endonucleasa Flap 1
<b>G</b>	Guanina
<b>GGR</b>	Reparación global del genoma
<b>HHR</b>	Reparación por recombinación homóloga

<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>IC50</b>	Concentración inhibitoria 50
<b>INCAN</b>	Instituto Nacional de Cancerología
<b>MMR</b>	Reparación de bases mal apareadas
<b>MRN</b>	Complejo de reconocimiento de daño en la vía HR (MRE11-RAD50-NBS1)
<b>MSH2/MSH6</b>	Heterodímero de reconocimiento de las bases mal apareadas
<b>MLH1/PMS2</b>	Segundo heterodímero de reconocimiento de bases dañadas
<b>NER</b>	Reparación por escisión de nucleótidos
<b>O<sub>2</sub></b>	Súperoxido
<b>OH<sup>·</sup></b>	Hidroxilo
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PCNA</b>	Antígeno nuclear de células en proliferación
<b>Radiación UV</b>	Luz ultravioleta
<b>RAD51</b>	Proteína de reparación del DNA Rad51
<b>RAD52</b>	Proteína de reparación del DNA Rad52
<b>RFLP</b>	Polimorfismo de tamaño de fragmento de restricción
<b>RNA Pol</b>	Polimerasa de Ácido Ribonucleico
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico
<b>RNA<sup>m</sup></b>	Mensajero de Ácido Ribonucleico
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>RPA</b>	Proteína de Replicación A

<b>SNP</b>	Polimorfismo de un solo nucleótido
<b>T</b>	Timina
<b>TCR</b>	Reparación acoplada a la transcripción
<b>TFIIH</b>	Factor de transcripción II H
<b>UTR</b>	Región no codificante
<b>XPA</b>	Xeroderma pigmentoso grupo A
<b>XPB</b>	Xeroderma Pigmentoso grupo B
<b>XPC</b>	XerodermaPigmentoso grupo C
<b>XPD</b>	XerodermaPigmentoso grupo D
<b>XPF</b>	XerodermaPigmentoso grupo F
<b>XPG</b>	XerodermaPigmentoso grupo G
<b>XRCC1</b>	X-ray repair complementing 1
<b>XRCC4</b>	X-ray repair complementing 4

## REACTIVOS

<b>μl</b>	micro litros
<b>μM</b>	micro Molar
<b>ANE</b>	Aminoácidos no esenciales
<b>Anti-Anti</b>	Antibiótico-antimicótico
<b>dNTP's</b>	Deoxiribonucleótidos
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>h</b>	Horas
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Agua
<b>kb</b>	Kilo bases
<b>kDA</b>	Kilo Daltones
<b>M</b>	Molar
<b>mg</b>	Miligramos
<b>mg/ml</b>	Miligramos/mililitros
<b>ml</b>	Mililitros
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de Magnesio
<b>min</b>	Minutos
<b>mM</b>	mili Molar
<b>MQ</b>	Mili Q
<b>ng</b>	nanogramos
<b>nm</b>	nanometros
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>r.p.m.</b>	Revoluciones por minuto
<b>seg</b>	Segundos
<b>SBF</b>	Suero bovino fetal
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>SSC1x</b>	Citrato de Sodio Salino
<b>Taq Pol</b>	Taq polimerasa
<b>Tris-EDTA</b>	Tris- Ácido Etilen Diamino-Tetra-Acético
<b>μM</b>	micromolar

### 3.- INTRODUCCIÓN

#### 4.- DNA. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

En 1953 James Watson y Francis Crick descubrieron la estructura del DNA. Ellos se basaron en los estudios que Rosalind Franklin y Maurice Wilkins realizaron para analizar las fibras del DNA mediante el uso de rayos X. Fue entonces que J. Watson y F. Crick propusieron su modelo de la doble hélice del DNA, recibiendo el premio nobel (2). A partir de este momento se empezó a descifrar de manera más detallada la composición y estructura de la molécula del DNA.

El DNA al ser una molécula crucial en los organismos vivos, se encuentra compactado en varios niveles. En el caso de los organismos eucariontes el DNA esta compartimentalizado en el núcleo. Dentro del núcleo el DNA interacciona con proteínas histonas y no histonas para formar una estructura conocida como cromatina (4) y son las principales responsables del plegamiento y empaquetamiento del DNA (1). Hay cinco tipos de histonas: H1, H2A, H2B, H3 y H4. La cromatina tiene como unidad funcional al nucleosoma, donde se forman unidades repetidas de octámeros de histonas y 200 pares de bases de DNA (5). Los nucleosomas generan arreglos en los que la cromatina forma fibras de 30 nanómetros (nm) (1). Estas fibras de nucleosomas pueden formar solenoide (modelo en el cual la conformación de cuentas en un hilo se empaqueta y forma la fibra de 30 nanómetros), o dominios de bucles (1). Cada dominio de bucles se va enrollando en ramilletes condensados formando cromosomas compactos que se ven durante la mitosis y meiosis (1).

El DNA puede tomar una conformación A, B o Z. En la conformación A la doble hélice es dextrógira, tiene un diámetro de  $\sim 26\text{\AA}$  y sus pares de bases por vueltas son 11. En la conformación B el sentido de la hélice es dextrógiro, presenta alrededor de 10 pares de bases por cada vuelta y tiene un diámetro de  $\sim 20\text{\AA}$ . En la conformación Z la doble hélice es levógira, tienen un diámetro de  $\sim 18\text{\AA}$  y los pares de bases por vuelta son 12 (2).

## La estructura primaria

El DNA es una larga cadena constituida por nucleótidos; cada nucleótido consiste en un azúcar desoxirribosa, un grupo fosfato y una base nitrogenada. Existen 4 bases nitrogenadas: adenina (A) y guanina (G) (purinas), cada una con un doble anillo en su estructura, y timina (T) y citosina (C) (pirimidinas) o uracilo en el RNA, más pequeñas y con un solo anillo cada una (3).

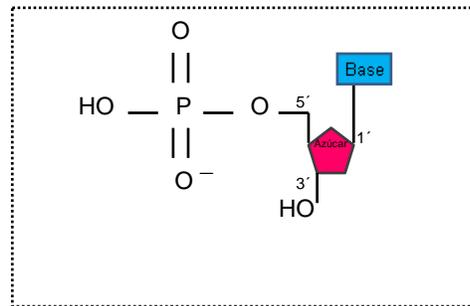


Fig1. Nucleótido

La base nitrogenada está unida covalentemente por el N-1 en las pirimidinas y el N-9 de las purinas a través de un enlace *N* –  $\beta$  Glucosídico con el carbono 1' de la pentosa y el fosfato está esterificado con el carbono 5'. Este tipo de enlace glucosídico se forma por la eliminación del agua (2). Cada nucleótido está unido covalentemente al siguiente nucleótido mediante puentes de grupos fosfatos, donde el grupo hidroxilo 5' de un nucleótido está unido al grupo hidroxilo 3' del siguiente nucleótido, mediante un enlace fosfodiéster (2).

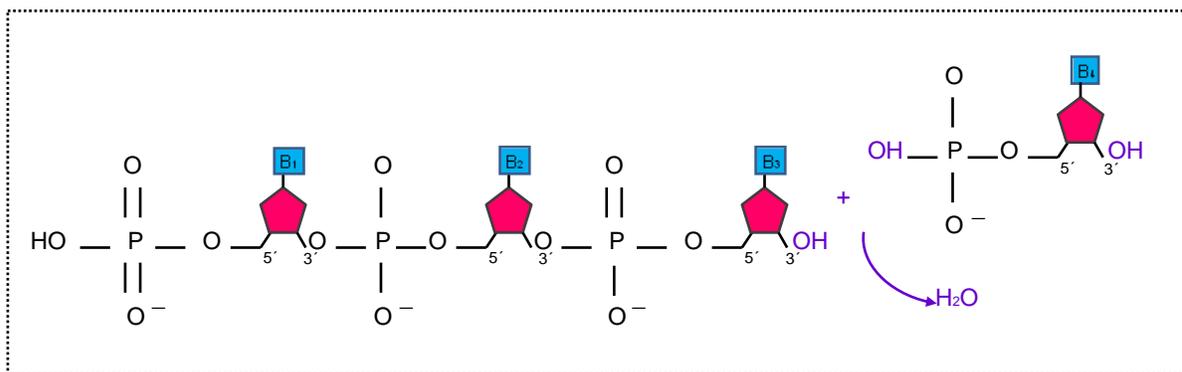


Fig2. Ácido nucleico

## La doble hélice

La estructura de la doble hélice se demostró por Rosalind Franklin y Maurice Wilkins por los estudios que realizaron empleando la difracción de rayos X para analizar cada cadena del DNA (2). En la molécula del DNA se forman dos cadenas antiparalelas (3). Una característica del modelo de doble hélice es que todas las bases nitrogenadas se encuentran con dirección hacia el interior, mientras que los grupos fosfatos y azúcares se disponen hacia el exterior (2). El apareamiento de las bases complementarias se da, entre una A y T y entre G y C. (3). Y es importante el hecho de que la relación espacial entre las dos cadenas de DNA permite la formación de un surco mayor y un surco menor (3).

Una de las principales características de la hélice de DNA es la facilidad con que las cadenas se separan y juntan continuamente, es decir, se desnaturaliza o renaturaliza (2). Las cadenas de DNA se pueden separar cuando se rompen sus enlaces de hidrógeno, esto al tratarlo con altas temperaturas o por medio de titulación con ácidos o bases. Del modo contrario las cadenas se pueden volver a asociar cuando se les trata con temperaturas por debajo de la  $T_m$ , ya que llega un momento en que puede volver a formarse la doble hélice (3).

## 5.- CICLO CELULAR Y DUPLICACIÓN DEL DNA

El ciclo celular es un mecanismo esencial mediante el cual las células se reproducen. Este ocurre cuando una célula duplica su contenido de DNA y luego se divide en dos (3). Una función del ciclo celular es duplicar con exactitud el material genético de los cromosomas y luego segregar las copias con precisión en dos células hijas idénticas (3).

Existen tres fases principales del ciclo celular: interfase, mitosis y citocinesis (1). Durante la interfase ocurre la duplicación del DNA, síntesis de histonas y otras proteínas asociadas con el DNA de los cromosomas, producción de reserva de organelos para las dos células hijas y ensamblaje de estructuras necesarias para que se lleven a cabo la mitosis y citocinesis (1).

En la interfase ocurre la síntesis del DNA o *Fase S*: Durante esta fase se da la replicación del DNA, al igual que son sintetizadas histonas y otras proteínas asociadas al DNA (3).

Existen algunas señales mediadas por complejos ciclinas/Cdk (quinasas dependientes de ciclinas) que regulan el ciclo celular. Cada Cdk necesita unirse a una ciclina para ser activa y diferentes complejos Cdk/ciclina actúan durante distintas fases del ciclo celular. En la fase S las principales ciclinas involucradas son Cdk2 – ciclina A (111). Se conoce que algunos agentes antineoplásicos pueden arrestar a las células, tal es el caso del cisplatino que arresta a las células en fase S, inhibiendo la duplicación y por consiguiente a lo largo del tiempo la muerte (102).

## 6.- MECANISMOS DE SÍNTESIS DEL DNA

Una característica muy importante en el DNA es que existe complementariedad entre sus cadenas, es decir que cada base de la cadena molde determina la base complementaria de la nueva cadena, entonces se dice que existe fidelidad de la replicación del DNA (4). Esto le ha permitido a cada cadena de DNA la capacidad de transmitir la información genética, así como permite explicar los procesos de replicación y transcripción (3).

La replicación es un proceso semiconservativo en dirección  $5' \rightarrow 3'$ , donde cada cadena de DNA actúa como molde para la síntesis de una nueva cadena. El resultado son dos moléculas de DNA nuevas, cada una con una cadena nueva y una conservada del ciclo anterior. (2).

La síntesis de una molécula de DNA se da en tres etapas: iniciación, elongación y terminación (3).

*Iniciación.* La replicación del DNA puede comenzar en distintos sitios de origen. El complejo del reconocimiento de origen (ORC) se une a varias secuencias dentro del replicador, se estima que en humanos existen 10000 orígenes de replicación (4). Este ORC interacciona con secuencias de replicación autónoma (ARS) y es regulado por diversas proteínas (2). Para que el DNA comience a sintetizarse se requiere de una secuencia de oligonucleótidos o cebador, el cual es colocado por la DNA polimerasa  $\alpha$  (4). Primero se requiere la apertura de la doble hélice, por acción de helicasas, y para evitar un superenrollamiento actuarán las topoisomerasas, después para mantener a las cadenas de DNA separadas participará la proteína de replicación A (RPA), esta se une a ambas cadenas del DNA y posteriormente

solo queda en la hebra rezagada, permitiendo la separación de las cadenas sencillas del DNA (1). Durante la *elongación* se da la síntesis de ambas cadenas, la líder o continua y la retrasada o discontinua (2). A partir del extremo 3´OH libre dejado por la DNA polimerasa  $\alpha$ , ocurre la polimerización por la DNA polimerasa  $\delta$  en ambas cadenas (la líder y retrasada) (3). La síntesis de la cadena retrasada requiere de más de un cebador, para la síntesis de los Fragmentos de Okazaki en dirección 5´ $\rightarrow$ 3´, por la misma DNA polimerasa  $\delta$ . Al final de la fase de elongación, ocurre el retiro de cebadores por las proteínas RNAsa H, FEN1 y DNA 2, y se da la síntesis de los fragmentos sueltos durante el proceso por acción de las DNA polimerasas  $\delta$  y  $\epsilon$  (2). Por último en la fase de *termino*, actuará la DNA ligasa I para unir los fragmentos restantes (1).

#### *De la proteína al DNA: El papel del RNA*

La expresión de la información genética requiere de la síntesis de una molécula de RNA, transcrita a partir de una cadena de DNA (2). El RNA (ácido ribonucleíco) es una cadena de nucleótidos que igual que el DNA tiene bases nitrogenadas, un grupo fosfato, y un azúcar, solo que en lugar de tener una timina (T) se presenta un uracilo (U) y el grupo hidroxilo se encuentra en la posición 2´ y no en la 5´ (2).

Existen tres clases principales de RNA: el RNA mensajero (mRNA) que codifica la secuencia de aminoácidos de un gen o por un conjunto de genes. El RNA de transferencia (tRNA) es el encargado de leer la información genética contenida en el mRNA y transportar el aminoácido correcto a la cadena polipeptídica durante la síntesis proteica y el RNA ribosómico (rRNA) forma parte de los ribosomas, que es donde se sintetizan las proteínas (1,3).

El ribosoma eucarionte está constituido por dos subunidades el 60S y el 40S. Cada ribosoma tiene dos sitios de unión al tRNA, un sitio peptidílico (P) y un sitio aminoacílico (A), y es en esta estructura donde se lleva a cabo la síntesis de proteínas (1).

La traducción es el proceso por medio del cual ocurre la síntesis de proteínas mediada por el mRNA (2). Dicho en otras palabras es traducir el lenguaje de nucleótidos al lenguaje de los aminoácidos (1).

## 7.- TIPOS DE DAÑO AL DNA

El DNA de todos los organismos está bajo permanente daño, ya sea por factores endógenos o por factores exógenos (7).

### 7.1.- Factores endógenos

Los agentes endógenos son aquellos producidos por las mismas células, y dentro de estos están: las alteraciones espontáneas de bases en el DNA, ya sea por hidrólisis o por las especies reactivas de oxígeno, además de la metilación enzimática de bases, y errores durante la replicación del DNA (8). La hidrólisis de la citosina, adenina y guanina produce uracilo, hipoxantina y xantina respectivamente. La hipoxantina tiene alta afinidad para aparearse con la citosina generando mutaciones. (9). Otro ejemplo de alteración espontánea en el DNA es la hidrólisis del enlace *N – glucosídico* entre purinas y pirimidinas, que origina sitios abásicos en el DNA (9).

Una consecuencia del metabolismo aerobio de las células es la generación de las especies reactivas de oxígeno ( $O_2$ ,  $OH^-$ ,  $H_2O_2$ ), las cuales originan rompimientos en la cadena del DNA y modificaciones en las bases del DNA (9 - 10). Un ejemplo de modificación de bases es daño por oxidación, incluyendo a la 8 – oxoguanina, que se forma como producto de la oxidación del  $O_2$  con la guanina y es frecuentemente utilizada como un biomarcador de daño oxidativo al DNA (8).

La metilación ocurre en las bases del DNA, ya sea por rutas enzimáticas o no enzimáticas (9). La metilación no enzimática ocurre por pequeñas moléculas, como las poliaminas, y uno de los productos de este tipo de metilación es la  $O_6$  – *metilguanina*, el cual es altamente mutagénico y se aparea con la timina (10). La metilación enzimática se da por las enzimas metiltransferasas en la citosina en el carbono 5, formándose la 5-me-C, y aunque no es considerado como agente de daño, al aparearse con la timina presenta un alto grado de desaminación teniendo importantes implicaciones para mutaciones potenciales en *hotspots* del genoma (9).

## 7.2.- Factores exógenos

Los agentes exógenos son producto del ambiente al que están expuestas todas las células. Dentro de estos agentes están los físicos y los químicos, que al entrar a las células pueden causar daño al DNA (9).

Uno de los principales agentes físicos es la luz UV producto de la exposición solar, a la que la mayoría de los organismos vivos estamos expuestos y dependemos de ella para la supervivencia (11).

La luz UV forma dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs) y los fotoproductos de pirimidina – pirimidona (6 – 4 PPs) (12). Otro ejemplo de daño físico es la radiación ionizante, ya sea de manera natural o por rayos X. Este tipo de daño puede ser de manera directa, (absorbiendo energía del DNA) o de manera indirecta (interacción de productos de radiolisis, por ejemplo el radical OH<sup>•</sup>), atacando el doble enlace entre los carbonos 5 – 6 de las pirimidinas, ocasionando rompimientos de cadena sencilla del DNA (9).

Dentro de los agentes químicos ambientales que pueden causar daño al DNA están los agentes alquilantes. Un ejemplo es el gas mostaza, que hace entrecruzamientos covalentes con el DNA a través de guaninas (9). Siguiendo esto, los hidrocarburos aromáticos policíclicos son otro ejemplo de agentes químicos que causan daño al DNA, formando aductos covalentes con el DNA, el más conocido es el benzo /a/ pireno, producido por el tabaco y por la ingesta de comida y agua contaminadas por efluentes de combustión (13).

Un agente bifuncional importante es el fármaco antineoplásico *cis – diamino – dicloro – platinado II* (Cisplatino), que modifica al DNA, uniéndose covalentemente y formando entrecruzamientos intra e intercatenarios entre guaninas adyacentes (14).

## 8.- MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL DNA

Debido a todo este daño al que se encuentran expuestas las células, existen mecanismos de reparación del DNA con el propósito de mantener la integridad del genoma y por lo tanto la supervivencia celular (15).

La reparación del DNA opera como un componente general de respuesta al daño del DNA y se sabe que defectos en estos mecanismos de reparación conllevan a ciertas enfermedades, tales como: Xeroderma pigmentoso, Síndrome Cockayne, Tricotiodistrofia, Ataxia telangiectasia, etc. Las células censan el daño en el DNA transitoriamente y bloquean la progresión del ciclo celular, para detener la replicación del DNA y la segregación cromosómica (16).

De esta manera la célula cuenta con el tiempo para reconocer y reparar el daño ocasionado, antes de que se convierta en una mutación (15 – 16). Sin embargo cuando el daño es demasiado grave, las células se programan para una muerte celular, conocida como apoptosis (16).

Dentro de los principales mecanismos de reparación están:

- ❖ La reparación por escisión de bases (BER)
- ❖ La reparación por escisión de nucleótidos (NER)
- ❖ La reparación de bases mal apareadas
- ❖ Recombinación homóloga.

### **8.1 Reparación por escisión de bases (BER)**

Este tipo de reparación actúa cuando ocurren lesiones en las bases del DNA originadas por desaminación hidrolítica, agentes alquilantes, radiación ionizante (RI), y por diferentes metabolitos celulares, y aun en forma indirecta por radiación UV vía generación de ROS (especies reactivas de oxígeno) (29). La base modificada o anormal en el DNA es removida por una glicosilasa. El papel de las DNA glicosilasas es primordial en esta ruta, ya que son las encargadas de dar la especificidad y eficiencia de reparación, removiendo diferentes tipos de bases modificadas (29). Una DNA glicosilasa hidroliza la unión glicosídica, el sitio abásico resultante (AP) es removido por un par de endonucleasas AP, que corta 3' (AP liasa) y 5' (AP hidrolasa) al sitio AP y el nucleótido se reemplaza (27). En mamíferos la principal endonucleasa es la Ape1, ésta hidroliza el enlace 5'fosfodiéster del sitio AP (8). BER cuenta con dos subrutas que involucran la participación de diferentes enzimas, teniendo como resultado el reemplazamiento de un nucleótido (short – patch BER) o de dos o más nucleótidos (long – patch BER) (8). Este mecanismo de reparación consta de 4 pasos

principales: a) incisión enzimática del sitio AP, b) la escisión del sitio AP unido a la cadena sencilla fragmentada, c) la reparación de síntesis del DNA y d) la ligación del corte en el fragmento del DNA que se dañó (27).

## **8.2 Reparación por escisión de nucleótidos (NER)**

NER es una vía de reparación que es capaz de remover una variedad de lesiones en el DNA, entre las principales están, fotolesiones por luz UV, aductos y entrecruzamientos en el DNA (31). Esta compleja vía se ha conservado a lo largo de la evolución y exige la acción coordinada de cerca de 20 proteínas en células humanas (30). Consta de dos subvías para realizar una reparación más eficiente, la reparación acoplada a la transcripción (TCR) y la reparación global del genoma (GGR). Las dos subvías difieren solo en el paso inicial del reconocimiento de daño. Consta de 5 pasos generales: a) el reconocimiento del daño, b) desenrollamiento de la hélice alrededor de la lesión del DNA, c) la incisión dual de la cadena dañada, d) la escisión del fragmento dañado y e) la síntesis de novo (18, 31). Se detallará más adelante sobre este mecanismo de reparación, sus componentes y sus alteraciones.

## **8.3- Reparación de bases mal apareadas (MISMATCH repair)**

MISMATCH es un sistema esencial en todos los organismos porque mantiene la estabilidad del genoma durante la duplicación repetida. Se encarga de remover bases mal apareadas debido a la desaminación de bases inducida o espontánea, oxidación, metilación y errores en la replicación (21). Los principales blancos de MISMATCH son los apareamientos erróneos en bases como: G/T (proveniente de la desaminación de 5 – metilcitosina), G/G, A/C y C/C. Este mecanismo de reparación también se asocia con lesiones en el DNA inducidas químicamente, tal es el caso de la alquilación de timina o citosina que induce O6 – metilguanina, los entrecruzamientos intracatenarios 1,2 (GpG) generados por cisplatino, los fotoproductos originados por UV y aductos en purinas ocasionados por el benzopireno (21).

Esta vía de reparación se compone de pocas proteínas bien conservadas que participan en otros procesos, tales como: la actividad de antirrecombinación entre secuencias divergentes, promoción de cruces meióticos, vigilancia del DNA dañado, y diversificación de

inmunoglobulinas (28). En organismos eucariontes las proteínas altamente conservadas son las MSHs (MSH2 a la MSH6) (28).

Consta de 4 pasos principales: a) Reconocimiento de la lesión del DNA, b) discriminación de la cadena con la base mal apareada, c) escisión de la cadena con la base mal apareada y d) y síntesis de reparación (21, 28).

#### **8.4.- Recombinación homóloga**

Mecanismo por medio del cual se reparan rompimientos de doble cadena en el DNA (DSBs), como resultado de radiación ionizante (RI), radiación UV, ROS y químicos genotóxicos terapéuticos. Este tipo de daño al DNA requiere de la participación de múltiples proteínas que se encuentran altamente conservadas en todos los organismos eucariontes y deficiencias en esta vía de reparación pueden causar enfermedades hereditarias (29).

Para la reparación de DSB se requiere un gran fragmento de secuencias homólogas entre la cadena dañada y la cadena templado. Actúan genes del grupo “RAD 52” involucrados en la supervivencia celular, y dentro de este grupo se encuentra RAD51, que es uno de los mejores genes de recombinación (en eucariontes), además mantiene la integridad del genoma en meiosis y mitosis. En mamíferos se sabe que este tipo de reparación actúa en la fase S y G2 del ciclo celular (29).

Existen 3 pasos para reparar los DSBs: presinapsis, sinapsis y postsinapsis. En la fase presinaptica rad51 se ancla a la cadena sencilla del DNA (ssDNA), que se genera por la degradación de la región 5´ de los DSBs o por perturbación de la replicación. Surge el filamento rad51 – ssDNA, se estira la cadena del DNA con este nuevo filamento para hacer una búsqueda más rápida y eficiente de su homólogo. Durante la sinapsis rad51 facilita la formación de una conexión física entre el sustrato de DNA “invadido” y el templado de DNA homologo, llevando a la generación del heterodúplex de DNA (D – loop). Se forman filamentos en la doble cadena (Rad51 – dsDNA), tanto por cadenas invasoras y donadoras ssDNA. Finalmente durante la postsinapsis cuando se sintetiza el DNA, se utiliza como cebador a un invasor y Rad51 se disocia del DNA de cadena doble (32).

## 9.- COMPONENTES DE LA VÍA NER Y FUNCIÓN

La vía NER se encarga de reparar lesiones covalentes en el DNA (17). Entre los agentes que causan daño al DNA están la radiación UV que forma entrecruzamientos entre dos pirimidinas adyacentes para formar un dímero de ciclobutano (CPDs) o un fotoproducto (6 – 4PPs) (19), también algunos agentes químicos como el benzo [a] pireno diol – epóxido, aminas aromáticas y algunas nitrosaminas (21). Existen otra clase de productos químicos, como los agentes crosslinking, que tienen la capacidad de formar dos enlaces covalentes con el DNA, uno en la misma cadena (enlaces intracatenarios) y otro en ambas cadenas (enlaces intercatenarios), un ejemplo de ello es el cisplatino (cis – dicloro – diaminoplatino) (14).

La reparación por escisión de nucleótidos consta de dos rutas para reparar el daño en el DNA, la reparación global del genoma (GGR) y la reparación acoplada a la transcripción (TCR) (24, 26). La reparación acoplada a la transcripción (TCR) asegura que la hebra transcrita de genes activos se repare con mayor prioridad que el resto del genoma, por medio de la RNA polimerasa II, mientras que la reparación del genoma global abarca partes no codificantes del genoma, en genes silenciados y en la cadena no transcrita de genes activos (20, 26).

Los mecanismos en NER involucran varios pasos: reconocimiento del daño, apertura de la burbuja de desnaturalización, incisión de la cadena dañada y el reemplazo de la cadena que contiene el daño, la resíntesis, y la ligación (18).

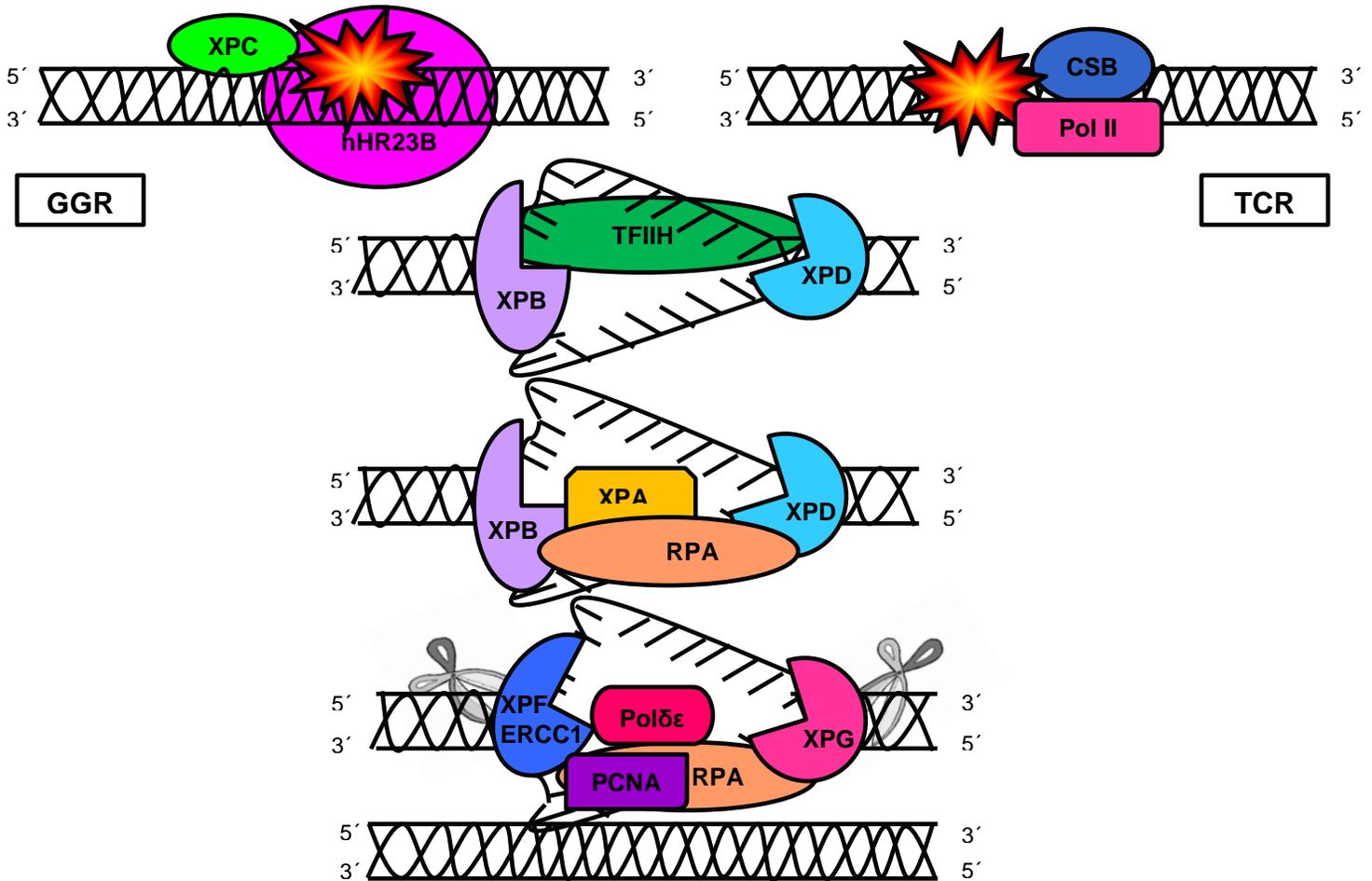


Fig3. Vía de reparación por escisión de nucleótidos

### 9.1 Reparación global del genoma (GGR)

En la reparación global del genoma el DNA dañado induce una distorsión de la hélice y este daño es reconocido por el complejo XPC – hHR23B y centrina 2, además la proteína de replicación A (RPA) y la proteína XPA que tiene afinidad al DNA (22). Estos factores llegan de manera secuencial al sitio dañado y constituyen el complejo de preincisión (22). La apertura de la burbuja de desnaturalización es llevada a cabo por el factor de replicación IIH (TFIIH), que tiene a las subunidades ciclina H, cdk 7 y MAT 1, formando al complejo cinasas activadas por ciclinas (CAK) que fosforilan la subunidad grande de la RNA polimerasa II (26), además contiene a las helicasas XPD y XPB que median la separación de la cadena al sitio de la lesión (25). La incisión de la cadena dañada es llevada a cabo por la endonucleasa XPG en dirección 3' - 5' y por el heterodímero XPG – ERCC1 que actúa como exonucleasa en dirección 5' - 3' (23, 26). La resíntesis de la nueva brecha en formación en el DNA se da

por las DNA polimerasas delta y épsilon y el antígeno nuclear de proliferación celular PCNA (16). Finalmente la ligación es llevada a cabo por la DNA ligasa I (16).

## 9.2 Reparación acoplada a la transcripción (TCR)

En la reparación acoplada a la transcripción (TCR), la RNA polimerasa II se estanca por lesiones en la cadena transcrita de genes activos y atrae a enzimas de NER. NER procede como en la reparación del genoma global pero con la participación de otras enzimas adicionales, CSA (necesaria para reclutar sustratos específicos) y CSB están implicados en la activación de la cascada de reparación del DNA (24). Estas proteínas remueven eficazmente lesiones que bloquean la transcripción del DNA y que no están siendo removidas por NER normal. También ayudan a la RNA Pol II cuando pasa por alto sitios dañados en el templado dentro de la reparación o desempeñan un papel en la liberación de complejos bloqueados de la transcripción durante el daño (22 - 24).

A continuación se enlistan las principales proteínas de NER, características y función (Tabla 1).

Proteínas	Subunidades	Propiedades y actividades	Funciones en NER
XPC – hHR23B CSB	XPC (p125) HR23B CSB	Se une al DNA Estabiliza el heterodímero Se une al DNA	Reconocimiento del daño primario
XPA	XPA (p36)	Contiene dedos de Zn <sup>2+</sup> y también se une al DNA	Participa en el ensamblaje del heterodímero, en el reconocimiento y verificación del daño
RPA	RPA 70 (p70) RPA 32 (p32) RPA 14 (p14)	Contiene dedos de Zn <sup>2+</sup> y se une al DNA Se une al DNA Ensambla heterodímero y se une al DNA	Ambos estabilizan la cadena sencilla del DNA y participan en el reconocimiento del daño.
TFIIH	XPB (p89)	ATPasa dependiente de DNA	Las subunidades participan en

<b>XPG</b>	XPD (p80)	y tiene función de helicasa en 3' → 5' ATPasa dependiente de DNA y tiene función de helicasa en 5' → 3'	el desenrollamiento del DNA, detectan el daño y participan en el ensamblaje del complejo
	P62	Subunidad nuclear	
	P52	Subunidad nuclear	
	P44	Contiene dedos de Zn <sup>2+</sup>	
	P34	Contiene como dominio al "ring finger"	
	CDK7 (p40)	Proteína cinasa	
	Ciclina H (p36)	Subunidad regulatoria de proteína cinasa	
	MAT1 (p32)		
	P8	Estabiliza el complejo	Incide el daño en dirección 3'
	XPG (p33)	Endonucleasa estructura específica	
<b>ERCC1 - XPF</b>	ERCC1 (p40)	Estabiliza el heterodímero	Inciden el daño en dirección 5'
	XPF (p115)	Endonucleasa estructura específica	

Tabla1. Principales componentes de NER y función (114)

## 10.- AGENTES ANTINEOPLÁSICOS Y NER

Retomando que NER es una vía que se encarga de reparar varios tipos de lesiones en el DNA y dentro de las cuales están la formación de aductos, ya sean producto de carcinógenos químicos o por entrecruzamientos, los agentes antineoplásicos toman gran importancia, y en particular los agentes platinados (33).

Conociendo que la proliferación neoplásica se caracteriza por la aparición de clonas celulares que se reproducen con aparente insensibilidad a los mecanismos de regulación del

crecimiento celular, esta cualidad se aprovecha en la práctica clínica para mejorar la especificidad de los agentes antineoplásicos (34). Con frecuencia se emplean los fármacos antineoplásicos para erradicar metástasis establecidas, prevenir recurrencia de la enfermedad después del tratamiento local o reducir el tamaño del tumor antes del tratamiento local (35).

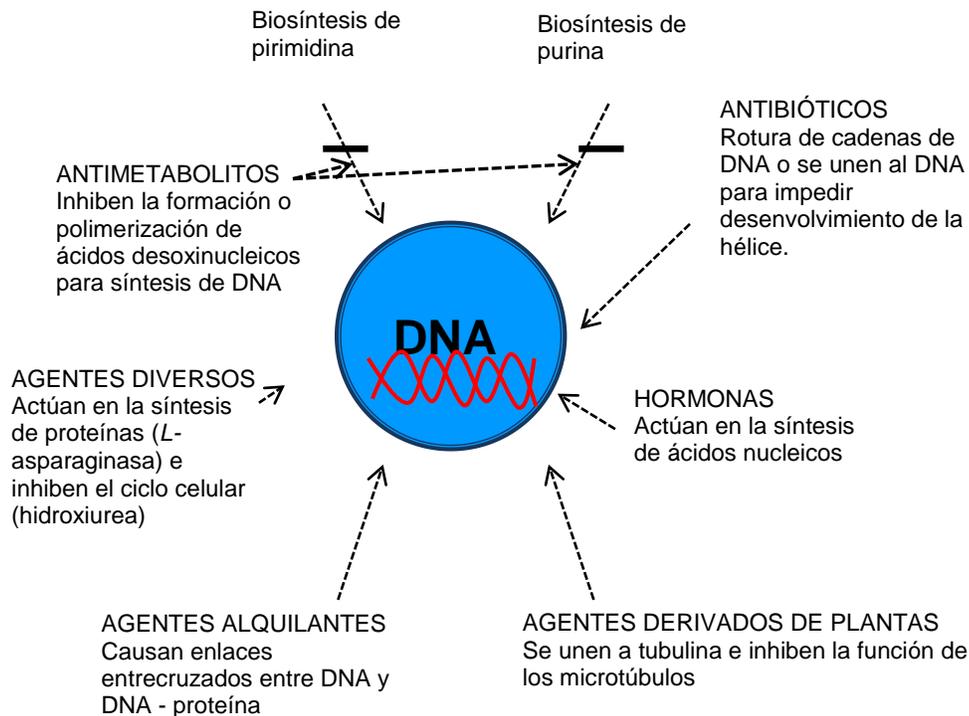


Fig4. Mecanismo de acción de los principales grupos de fármacos antineoplásicos

En condiciones sanas, cuando se alcanza una masa crítica, el conjunto de células deja de multiplicarse, sin embargo este mecanismo parece no actuar en la proliferación cancerosa. En tejidos sanos existe un desarrollo según la curva de Gompertz, es decir, en un principio se espera que exista un crecimiento exponencial y durante la fase logarítmica la fracción de crecimiento es elevada, el tiempo de duplicación es breve y un gran número de células es sensible a los fármacos específicos. Al crecer una masa tumoral, la velocidad de crecimiento disminuye y la curva de crecimiento puede alcanzar la fase de meseta. Esta fase estacionaria es la que ha alcanzado la mayoría de los tumores humanos en el momento de su diagnóstico, se caracteriza por su baja frecuencia de crecimiento, por su largo tiempo de duplicación y por una escasa sensibilidad a los fármacos específicos (34).

Los fármacos antineoplásicos se clasifican con base en su mecanismo de acción y su origen. Se pueden designar seis clases: Agentes alquilantes y de unión al DNA (ej. Platinos, ciclofosfamida, mitomicina C, etc), antimetabolitos (Metotrexato, 5 – fluoruracilo, gemcitabina, etc), antibióticos (Actinomomicina D, doxorubicina, bleomicina, etc), derivados de plantas (vincristina vinblastina, etopósido, etc), hormonas (tamoxifeno, glucocorticoides, antiandrógenos, etc), y agentes diversos (L – asparaginasa y hidroxiurea).

### 10.1.- Platinos: Características principales

La mayoría de los compuestos platinados usados contra el cáncer exhiben la fórmula general *cis* – [PtX<sub>2</sub> (NHR<sub>2</sub>)<sub>2</sub>], en donde R = fragmento orgánico y X = grupo saliente (ej. Cloro) (36).

El factor clave que explica por qué el Pt es claramente más útil se relaciona con su cinética de intercambio de ligando. Una importante propiedad de los componentes de platino, es el hecho de que el enlace Pt – ligando, que es termodinámicamente más fuerte que un enlace típico, es mucho más débil que enlaces covalentes dobles o sencillos C – C, C - N y C – O. El intercambio de los componentes ligando de los compuestos platinados, es muy lento permitiéndoles una alta estabilidad cinética (36).

Otro fenómeno inusual entre los platinos hace referencia a sus ligandos preferidos. Pt (II) tiene una fuerza termodinámica preferente para enlaces S – ligando donador, por esta razón se podría predecir que los compuestos platinados nunca alcanzarían al DNA debido a la presencia de platinófilos celulares (S – ligando donador, tal es el caso de la glutatión o la metionina) que compiten por ligandos en el citosol (36).

Los compuestos platinados forman entrecruzamientos intracatenarios en el N7 de guaninas adyacentes en el DNA (d (G\**p*G\*)), se piensa que esta lesión es crítica para la actividad *cisbifuncional* de sus análogos (37). Según su estructura química se clasifican en forma *cis* y forma *trans*. Los ligandos L de los agentes *cis* – activos (ej. Oxaliplatino) tienen relativamente menos volumen en la proximidad de de las dos G\*. Sin embargo cuando L es voluminoso la actividad disminuye y aumenta la toxicidad (37).

Se conoce que los compuestos *cis* bloquean el crecimiento celular y dentro de estos el más activo es el cisplatino, que tiene actividad antitumoral, mientras que los compuestos *trans* no

muestran tal actividad (36, 37). Una característica de los ligandos *trans* es que son más rápidamente sustituidos que los ligandos *cis* (36).

A continuación se enlistan algunos de los principales agentes platinados (Tabla 2).

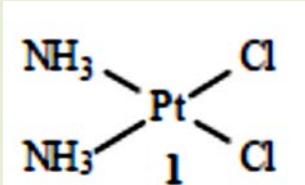
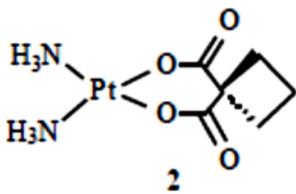
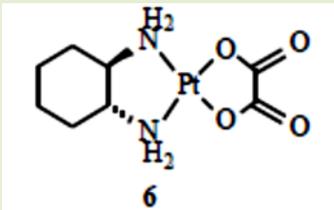
Compuesto	Mecanismo de acción	Fórmula química
<b>Cisplatino</b>	Se activa en medio intracelular pobre en Cl, sufre hidrólisis y se une al DNA, alterando su configuración e inhibiendo su replicación. También puede ejercer acción en determinadas proteínas (41).	
<b>Carboplatino</b>	Análogo al cisplatino. Su grupo saliente es un ligando de ciclobutanodicarboxilato menos lábil se al entrar a las células por difusión pasiva sufre hidratación más lentamente que los cloros del cisplatino (47).	
<b>Oxaliplatino</b>	Análogo al cisplatino. Requiere hidrólisis para estar en contacto con el DNA y al formar las especies reactivas (1,2-DACH diaqa platinum (II)) es un proceso más lento comparado con el cisplatino (47).	

Tabla 2. Principales agentes platinados

Considerando que el cisplatino es un agente muy utilizado en la práctica clínica contra el cáncer, enfatizaré más sobre este fármaco.

## 10.2.- Cisplatino: Mecanismo de acción

El *cis* – *Diaminodicloro* – *Platino (II)* fue primeramente descrito en 1845, sin embargo sus propiedades antineoplásicas fueron descubiertas hasta 1964, como un potente y efectivo agente antitumoral, descubierto por Barnett Rosenberg (36).

La efectividad de la droga ha sido reconocida en una gran cantidad de tumores sólidos: ovario (38), vejiga (36), de cabeza y cuello (36), testículo (34), cáncer de pulmón (34), cervical y linfoma (38).

El mecanismo de acción del cisplatino es entrar a la célula por difusión pasiva (39, 41), aunque también se cree que podrían estar involucrados ciertos canales transmembranales (40). Una vez dentro de la célula el cisplatino sufre hidrólisis y pierde los dos iones cloruro y obtiene dos moléculas de agua (38), lo cual lo hace más reactivo para blancos celulares (40).

Una vez que el cisplatino tiene carga positiva interacciona con moléculas nucleofílicas, como RNA, proteínas y cerca del 1% de este fármaco con el DNA (40), que es el blanco biológico más importante de esta droga (41). El átomo de platino del cisplatino forma uniones covalentes con el DNA generando aductos (41, 46). Estos aductos pueden ser monofuncionales o bifuncionales en el átomo N7 del anillo imidazol de purinas G8 y G9 (45), así como entre- cruzamientos DNA – proteína. Los aductos bifuncionales pueden tomar la forma de entrecruzamientos intracatenarios o intercatenarios, causando distorsiones en el DNA y alterando la doble hélice (42, 44). Los entrecruzamientos intracatenarios son los más frecuentes de los aductos formados entre el DNA con el cisplatino (90%). Estos aductos se pueden formar entre dos guaninas adyacentes, 1,2-d(GpG) con un 60 – 65% y entre una adenina y una guanina 1,2-d(ApG) que representan entre un 20 – 30% (38 - 48). Los entrecruzamientos intercatenarios 1,3-d(GpXpG), que corresponden al 8 -10%, entre una base adyacente entre dos guaninas. Los aductos menos comunes son los monofuncionales, que comprenden entre un 2 – 3% (39).

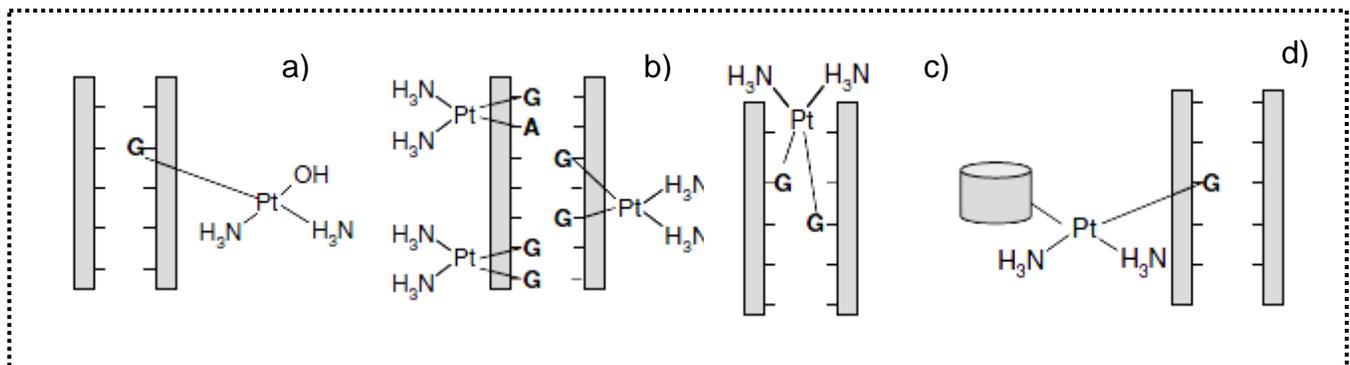


Fig. 5. Aductos DNA – cisplatino: a) DNA – monofuncional, b) intracatenario, c) intercatenario, d) DNA - proteína

La presencia de las proteínas de alta movilidad (HMG), que se asocian a la curvatura de la cromatina y son capaces de reconocer y unirse al DNA, específicamente en los entrecruzamientos intracatenarios 1,2-d(GpG), se piensa que son las responsables de la sensibilidad del cisplatino. En testículo, un tejido sensible al cisplatino, se expresan proteínas con dominios HMG (38).

Una vez que se ha producido el daño en el DNA se inhibe la síntesis y se puede alterar la replicación y la transcripción por medio de proteínas relacionadas con la cromatina, además se ha visto que también hay acortamiento y degradación de telómeros (39). Las señales de transducción vía p53 pueden mediar la citotoxicidad por cisplatino. Una vez activo p53 activa varios genes blanco río abajo (XPC, RPA, TFIIH, PCNA, BRCA1, CBS), p21/Waf1, MDM2, GADD45, y genes proapoptóticos, que activaran varios procesos celulares, dependiendo del daño, decidirán si la célula sigue un arresto celular y la consecuente reparación o si entra a apoptosis (41).

## 11.- GENES DE REPARACIÓN NER Y POLIMORFISMOS

NER es el principal mecanismo de reparación de aductos por platinos, y los genes de reparación de dicha vía tienen un papel primordial en el reconocimiento del daño en el DNA. Tal es el caso de XPC, donde se conoce que defectos en esta proteína se asocian con alteraciones en proliferación y ciclo celular. Otras proteínas de gran importancia son XPA y ERCC1. La baja regulación de la expresión de XPA por una transfección de RNA antisentido

puede reducir la reparación del DNA y posteriormente ocasionar resistencia a cisplatino en células tumorales. Para el caso de ERCC1 se detallará y especificará más sobre este gen de reparación (47).

### **11.1 Polimorfismo**

Un polimorfismo es una variación genética, que se encuentra en al menos 1% de la población (6).

Existen varios tipos de polimorfismos, los de un solo nucleótido (SNP) y los de repetidos en tándem (VNTR) (6).

### **11.2 Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's)**

Un SNP es un cambio en un solo nucleótido de una secuencia de DNA en el genoma, que difiere entre miembros de especies biológicas o pares de cromosomas en humanos. Estos cambios se encuentran por lo general cada 300 – 1000 pares de bases (pb) (49) y se encuentran entre cerca del 1 – 2% de una población (51).

El uso de polimorfismos para el estudio de organismos y de humanos ha tenido gran auge. Los SNP's son considerados buenos marcadores genéticos para estudios de población y evolución (49).

Es muy importante hacer la asociación que existe en la literatura sobre la importancia de los SNP's como marcadores predictivos para respuesta al tratamiento, toxicidad y supervivencia en pacientes con cáncer (50). Se sabe que cerca del 20 – 30% de SNP's no sinónimos en regiones codificantes de genes de NER pueden alterar la estructura, función, plegamiento y estabilidad de una proteína.

### 11.3 Polimorfismos del gen ERCC1

ERCC1 es un gen muy importante en NER ya que junto con XPF, se encarga de incidir la cadena dañada. Se encuentra en el cromosoma 19q13.2 – 13.31126380 y tiene 10 exones. ERCC1 tiene dos dominios: el dominio HhH<sub>2</sub> HhH<sub>2</sub> (residuos 220 – 297) con el que interacciona con XPF y un dominio central (residuos 91 – 118aa) que le permite su interacción con XPA (113).

El promotor de ERCC1 se encuentra en una región altamente conservada a 5kb (497pb) río arriba del exón 1 (112).

Actualmente existe interés particular en estudiar genes involucrados en vías de reparación del DNA, especialmente en los polimorfismos de genes de reparación de la vía NER (de la cual ya se habló anteriormente), y particularmente SNP's del gen ERCC1 que se asocian con pronóstico de cáncer gástrico y colorrectal (11615C→T) (58), respuesta a radioterapia en cáncer de esófago y pulmón (C118T) (56 - 57), riesgo en cáncer colorrectal (19007T→C) (54) y glioma (8092C→A) (55), supervivencia en cáncer de pulmón (8092C→A – 118Asn→Asn) (52), ovario (8092C→A) (53), y citotoxicidad a CDDP a nivel de RNAm de ERCC1 en glioma (50).

A continuación se enlistan los polimorfismos de ERCC1 que más se han estudiado en (Tabla 2), así como las frecuencias del genotipo polimórfico de ERCC1 8092C→A en diferentes poblaciones (tabla 3).

<b>Polimorfismo ERCC1</b>	<b>Tipos de Cáncer</b>
<b>8092C→A</b>	Pulmón, glioma, ovario, cabeza y cuello, colorrectal
<b>19007G→A</b>	Colorrectal
<b>118Asn→Asn</b>	Pulmón, esófago
<b>19007T→C</b>	Colorrectal
<b>15310G→C</b>	Colorrectal
<b>17677A→C</b>	Colorrectal

<b>19716G→C</b>	Colorrectal
<b>11615C→T</b>	Colorrectal y gástrico
<b>15310G→C</b>	Colorrectal
<b>17677A→C</b>	Colorrectal
<b>19716G→C</b>	Colorrectal
<b>11615C→T</b>	Colorrectal y gástrico

Tabla 3. Polimorfismos del gen ERCC1 y tipos de cáncer donde se han estudiado.

Ref.	Grupo étnico	Población de estudio	n	C/C	C/A	A/A
<b>55</b>	Caucásicos	Control	159	81	70	8
		Glioblastoma	122	73	43	6
<b>105</b>	Canadiense	Ca. de mama	56	56	32	7
<b>106</b>	Caucásicos	Control	1358	56	38	6
		Ca. de pulmón	1752	56	37	7
<b>107</b>	Caucásicos	Control	454	57	37	6
		Ca. esofageal	312	50	41	9
<b>108</b>	Norteamericana	Control	1994	57	38	6
		Tumores cerebrales	1015	57	37	6
<b>98</b>	Europea	Ca. de próstata	376	56	35	9
<b>70</b>	Eslava	Ca. de ovario	104	61	37	6
<b>100</b>	Mexicana	Control	126	34	64	28
		Ca. de testículo	124	33	64	27
<b>109</b>	Caucásicos	Control	823	432	344	47
	Europeos	Ca. de Cabeza y cuello	1169	638	427	104

Tabla 4. Frecuencias genotípicas del polimorfismo 8092C→A del gen ERCC1 reportadas en diversas poblaciones

El polimorfismo 8092C→A se ha asociado con supervivencia y respuesta al tratamiento con platinos en varios tipos de cáncer, por lo que sería importante estudiar los procesos moleculares y celulares, así como los efectos que ocurren durante los mecanismos de reparación.

## **12.- POLIMORFISMO 8092C→A DEL GEN ERCC1: ANTECEDENTES**

*ERCC1* es un gen crucial para la vida que al estar conservado en varios organismos, como por ejemplo plantas (*AtERCC1*) (77, 78), las bacterias (*UvrB*, *UvrC*, *UvrA*) y las levaduras (*RAD10*), así como en humanos, habla del papel primordial de este gen a lo largo de la evolución (60, 61, 62, 63). Dada su importancia en la vía NER, dicho gen ha sido objeto de estudio para poder entender su funcionamiento.

Se conoce que los ratones knockout de *ERCC1* mueren tempranamente después del destete (64). En condiciones normales, en modelos de ratón, *ERCC1* participa en el envejecimiento, desarrollo normal cerebral y en los procesos de las inmunoglobulinas (64).

Alteraciones en este gen pueden ocasionar defectos en la vía NER y por tanto en la reparación del DNA (64). En tejidos sanos (ovario, pulmón, mama, próstata, estómago, intestino, vejiga, colon, riñón, hígado, testículo, bazo y linfocitos) se sabe que la expresión de genes de reparación asociados a la vía NER están activamente transcritos, y que la expresión de *ERCC1* es alta en comparación con otros genes de reparación. Lo cual refleja el importante papel de este gen en la vía NER (67). *ERCC1* es muy importante en la vía NER, ya que participa en la de reparación de aductos en el DNA ocasionados por compuestos platinados (68). Se sabe que en el caso de tejido de cáncer de ovario, y líneas celulares de cáncer de ovario, niveles de expresión del mRNA de *ERCC1* y XPA se asocian a respuesta a tratamiento con platinos, por lo que un aumento en la expresión del mensajero incrementará la eliminación del DNA dañado (69). De manera similar se sabe que bajos niveles de expresión de *ERCC1* se asocian a mejor respuesta a quimioterapia con cisplatino en carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (71).

Ante este panorama se ha propuesto que variaciones en la capacidad de reparación del DNA a través de la presencia de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) de genes de

reparación del DNA se asocian con inestabilidad genética y alto riesgo de desarrollar procesos carcinogénicos (65).

Uno de los principales polimorfismos del gen *ERCC1*, es el 8092C→A. Existen varios estudios donde se observa la asociación de este polimorfismo con sobrevida global y respuesta ante el tratamiento con platinos y para ciertos tipos de cáncer (64).

En cáncer de ovario el genotipo wild type (CC) de *ERCC1*, predice mejor sobrevida global, a diferencia del genotipo polimórfico (AA), donde al menos con tener un alelo AA o CA, indica mayor riesgo de progresión de la enfermedad y muerte, en pacientes con cáncer de ovario avanzado, con tratamiento conjunto de cisplatino y paclitaxel (53), de manera similar se ha visto que en adenoma esofagueal la presencia del polimorfismo 8092C→A de *ERCC1* se asocia con riesgo para presentar esta enfermedad (72). Este efecto podría correlacionarse con la toxicidad que ejerce el cisplatino en los pacientes con cáncer de ovario, donde el genotipo CA exhibe un alto riesgo de padecer nefrotoxicidad (70). Se ha visto de igual manera que la presencia del polimorfismo AA en cáncer de pulmón predice mayor supervivencia global (73).

Así mismo hay una relación entre el polimorfismo 8092C→A del gen *ERCC1*, y la presencia de tumores cerebrales, tal es el caso de los gliomas. Donde existe una fuerte relación de este polimorfismo AA con la presencia de tumores cerebrales (55).

Tomando en cuenta este efecto que tiene tanto el gen *ERCC1* como su polimorfismo, se enfocó el interés por conocer cómo se encuentra su mensajero. De acuerdo con ello existen estudios donde se observa que los niveles de expresión del mensajero de *ERCC1*, podrían estar modulando la función del gen y por tanto alterar la función de la proteína. Tal es el caso de cáncer de pulmón de células no pequeñas donde se observa que niveles bajos de expresión mRNA de *ERCC1* predice una mejor respuesta al tratamiento con cisplatino y mayor supervivencia (74). No obstante en cáncer de ovario se ha observado que niveles de mRNA de *ERCC1* aumentados se asocian con falta de respuesta y resistencia en pacientes con cáncer de ovario (69).

En líneas celulares de cáncer de testículo se ha observado que la expresión de la endonucleasa *ERCC1* – XPF tiene un papel primordial en la reparación del DNA y en específico de aductos intercatenarios ICL's, ya que en ausencia de este factor causa una

deficiencia en la reparación de este tipo de aductos, lo cual conlleva a la sensibilidad al cisplatino (59).

### **13.- JUSTIFICACIÓN**

Debido a todos estos antecedentes donde se observa el importante papel que tiene el gen *ERCC1* en la reparación por escisión de nucleótidos y que el polimorfismo 8092C→A tiene un efecto de respuesta y supervivencia en ciertos tipos de cáncer, se planteó la idea de estudiar este gen en condiciones sanas para observar si este efecto se da de manera similar en la viabilidad celular con el tratamiento con cisplatino.

### **14.- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuál es el efecto celular del polimorfismo de *ERCC1* 8092C→A ante el tratamiento con cisplatino?

### **15.- HIPÓTESIS**

Células con genotipo homocigo polimórfico tendrán menor capacidad de reparación del DNA y, por lo tanto, menor viabilidad y proliferación celular en comparación con las células portadoras del genotipo homocigo silvestre al tratarlas con cisplatino.

### **16.- OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la asociación que existe ante la presencia del polimorfismo de *ERCC1* 8092C→A en la viabilidad celular, así como la evaluación del daño al DNA en cultivos de linfocitos tratados con cisplatino.

## **17.- OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1.- Determinar el genotipo de individuos sanos del polimorfismo 8092C→A de *ERCC1*, para aislar y cultivar linfocitos
- 2.- Medir la proliferación de los linfocitos tratados con cisplatino.
- 3.- Establecer el IC50 en cultivos de linfocitos tratados con cisplatino.
- 4.- Determinar la viabilidad de los cultivos de linfocitos con el genotipo polimórfico (A/A), tratados con cisplatino, y hacer una comparación con los genotipos silvestres (C/C) y con los heterócigos (C/A).
- 5.- Analizar y comprobar el daño en el DNA de ambos genotipos por medio de la técnica de micronúcleos por bloqueo de citocinesis y correlacionar el polimorfismo con mejor respuesta al tratamiento.

## **18.- MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **18.1.- Determinación del polimorfismo del gen *ERCC1* 8092C→A en muestras de sangre periférica de individuos sanos.**

Se reclutaron a 86 individuos sanos de la Facultad de Ciencias de la UNAM y del Instituto Nacional de Cancerología de entre 20 y 30 años de edad, principalmente varones, evitando así, resultados inespecíficos generados por la edad y sexo.

### **18.2. Parámetros de selección de individuos sanos**

❖ Se obtuvieron un total de 86 muestras por donación voluntaria, 30 mujeres y 56 hombres sanos que fueran fumadores y bebedores de alcohol de manera poco frecuente o nula. Esto

para evitar enmascarar el efecto de los genotipos de interés con otras variables que no sean las elegidas para este estudio.

❖ Se realizaron encuestas a los donadores sobre su estado de salud, estilo de vida, y lugar de residencia. Individuos con enfermedades contagiosas y muy infecciosas como gripe, hepatitis o VIH, inmediatamente se descartaron para este estudio. La edad promedio que se tomó de referencia fue de entre 20 y 30 años, con el fin de mantener una población homogénea, previniendo los riesgos que conllevan los procesos celulares del envejecimiento.

❖ Los individuos incluidos para este estudio en su mayoría fueron hombres, aunque también se consideraron a mujeres.

❖ Los cultivos de linfocitos se realizaron en condiciones de ayuno para cada individuo de interés.

❖ Finalmente se corroboró que los donantes fueran de nacionalidad mexicana con un mínimo de tres generaciones (padres y abuelos).

### **18.3 Aislamiento de DNA**

Se obtienen 5 mL de sangre periférica en un Vacutainer™ con EDTA (Becton Dickinson, USA), después se traslada el volumen obtenido a un tubo Falcon™ de polipropileno de 15 mL y se almacena por 24h como mínimo a -70 ° C. Antes de empezar la extracción de DNA, se lleva la muestra a baño maría a 37 °C por 15 minutos para descongelar la sangre.

Cada tubo fue llevado a 13mL con buffer de lisis SSC 1X (lisis de glóbulos rojos), se resuspendió por inmersión y se realizó una centrifugación a 3500 G por 5 min (LaboFuge 400, Heraeus Instruments).

❖ Se retiró el sobrenadante una vez terminada la centrifugación y se desechó en un vaso de precipitados con cloro para inactivar la sangre. Solamente se retira ese volumen porque existe el riesgo de no observar el pellet.

- ❖ Se adicionó 13mL de buffer SSC 1X como en un inicio, se resuspendió perfectamente y se realizó otra centrifugación a 3500 G por 5 min. Este paso se llevó a cabo las veces que fueran necesarias hasta observar que la coloración rojiza en el tubo disminuía lo más posible
- ❖ Una vez retirado todo el sobrenadante de la última centrifugación se adicionó 500 µl de acetato de sodio 0.2 M y se mezcló perfectamente.
- ❖ Se adiciona 1.4 mL de acetato de sodio 0.2 M, 125 µl de SDS al 10% y 30 µl de proteinasa K (20 mg/mL en agua). Mezclar ligeramente e incubar durante 24h en un baño maría a 55°C
- ❖ Trancurridas las 24h, se añadió 600 µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (en una proporción de 25/24/1) y mezcló durante 10 minutos en rotator (ORBITRON ROTATOR I<sup>TM</sup>. Modelo 260200. BOEKEL INDUSTRIES, INC.)
- ❖ Se recuperó la capa acuosa en un tubo nuevo, se adicionó 600 µl de cloroformo y se centrifugó a 3500 G por 5 min.
- ❖ Se removió la fase acuosa a un tubo nuevo y se agregó 2 ½ vols. de etanol absoluto frío (-20°C) para precipitar y recuperar el DNA.
- ❖ Se hizo el spooling y se pasó el material a un tubo eppendorf<sup>TM</sup> de 1.5mL, se llenó el tubo con EtOH al 70% frío y se mezcló perfectamente (esto se lleva a cabo para lavar el DNA de sales), posteriormente se centrifugó a 12000 r.p.m. por 2 min.
- ❖ Se retiró el EtOH y se dejó secar a 55°C o a temperatura ambiente en un lugar sin flujo de aire (aprox. 5 min.), se resuspendió en Tris – EDTA (10/0.1M) y se incubó a 55°C durante 24h y finalmente se guardó el DNA a -20°C para procedimientos posteriores.

## 18.4 Cuantificación de la cantidad y pureza del DNA

Terminada la extracción de DNA se procedió a cuantificar la muestra en un espectrofotómetro (ND – 1000, Nanodrop Technologies, Inc., USA).

La evaluación de la pureza se consideró en un rango de lectura de 260/280nm. El DNA es leído a 260nm y las proteínas a 280nm. Es importante tomar en cuenta que para determinar la pureza de extracción se considera la proporción 260/280, esto nos permite evaluar el contenido de DNA/proteínas, una proporción ideal es a 1.8, ya que una proporción menor indica contaminación con proteínas.

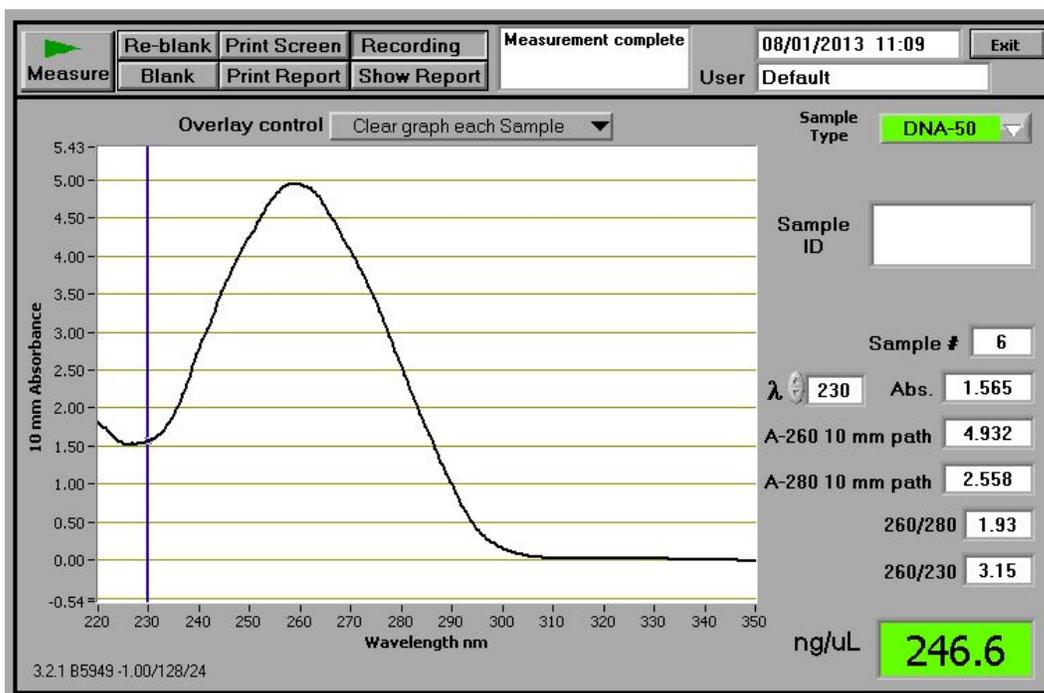


Fig. 6. Cuantificación del DNA a partir de su extracción en sangre periférica.

## 18.5.- Amplificación del fragmento 3'UTR del gen ERCC1 mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

A partir del DNA extraído de la sangre periférica se realizó la amplificación del fragmento de interés mediante PCR

❖ Se obtuvieron las muestras de -4°C y se ponen a baño maría por 24h a 55°C.

- ❖ Se hicieron alícuotas de 10µL de DNA (aproximadamente de 200 ng DNA) de cada individuo para tener un stock de las muestras y evitar estar manipulando las muestras originales con el riesgo de contaminarse.
- ❖ Se tomó 1µL de cada muestra de DNA y se colocó en los tubos para PCR.
- ❖ Se preparó un tubo para un mix total (dependiendo del número de muestras que se vayan a realizar).

En el caso de ERCC1 se utilizaron los siguientes primers:

Forward: 5' - TAGTTCCTCAGTTTCCCG – 3'  
 Reverse 5' - TGAGCCAATTCAGCCACT – 3'

Reactivos:	Volumen (µL) por reacción
Para 1 reacción	
Buffer 10X	1µL
DNTP´S	0.2µL
MgCl	0.3µL
Forward	0.2µL
Reverse	0.2µL
Tap Polimerasa	0.1µL
Templado (DNA)	1µL
Agua destilada	<u>7µL</u>
	10µL

- ❖ Se colocaron los tubos en termociclador Gene Amp. PCR Systems 9700, Applied Biosystems (para 40 ciclos):

94°C por 3min	Iniciación
94°C por 45seg	Desnaturalización
55°C por 30seg	Alineación
72°C por 1min 30seg	Elongación
72°C por 10min	Elongación final
4°C	Mantener la reacción

❖ Se hizo un gel de agarosa al 3% con TBE al 0.5% para observar la amplificación del fragmento deseado. El fragmento de DNA del gen de ERCC1, producto de la PCR, tiene una longitud de 255pb.

### 18.6.- Polimorfismos por longitud de fragmentos de restricción (RFLP por sus siglas en ingles)

❖ Se preparó el mix de la digestión (considerando el número de muestras que se van a digerir)

Reactivos

Para 1 muestra a digerir

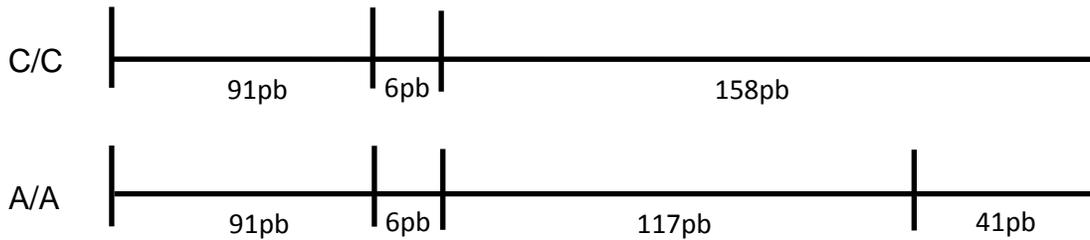
Buffer NEB <sub>2</sub>	1μL
Enzima MbolI	0.25μL
DNA	3μL
Agua bidestilada	5.75μL
	10μL

- ❖ Se incubó a 37°C por mínimo 16h las muestras de DNA por PCR.
- ❖ Posteriormente se guardaron las muestras a -20°C para los análisis posteriores.
- ❖ Se realizó un gel de agarosa al 1% con TBE 0.5% para observar los diferentes genotipos de ERCC1.

Se observaron diferentes fragmentos según el genotipo como a continuación se muestra:

Sitios de corte de la enzima de digestión MbolI GAAGA

Sitio de polimorfismo GAAGC cambia una C por una A y se genera el sitio en el que corta la enzima.



### 18.7.- Viabilidad celular

- ❖ Se obtuvo una muestra de sangre como se describe en el punto 15.3
- ❖ A partir de sangre total se aislaron linfocitos de sangre periférica para cultivarlos y realizar la medición de viabilidad celular por medio de la técnica de conteo con azul tripano.

### 18.8 Aislamiento de linfocitos de sangre periférica

- ❖ Se tomaron entre 25 y 60 mL de sangre periférica del individuo de interés (C/C, C/A o A/A) en un Vacutainer™ con heparina (Becton Dickinson, USA).
- ❖ Se añadió a un tubo cónico (50mL) 1 volumen de Ficoll™ (el volumen de Ficoll™ debe ser el mismo que el volumen de sangre total para el experimento). Posteriormente se adicionó 1 volumen de sangre total lentamente y apoyándose en la pared del tubo. Deben de mantenerse las dos fases en el tubo una vez añadida la sangre.
- ❖ Se centrifugó (centrífuga Eppendorf) en tubos cónicos a 1600 rpm por 30 min. Considerando aceleración 5 y freno 0.

❖ Terminada la centrifugación se extrajo la capa linfocitaria a un nuevo tubo cónico PET™ de 15mL (Becton Dickinson, USA). La distribución por densidad es de la siguiente manera: suero, linfocitos, Ficoll™ y eritrocitos.

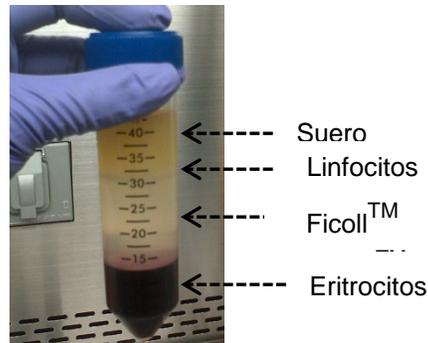


Fig. 7. Distribución de los componentes sanguíneos

❖ Se agregó PBS sin llenar totalmente el tubo (para evitar contaminación), se mezcló por inversión y se centrifugó a 1200 rpm por 10 min.

❖ Se retiró el PBS y se añadió al pellet un volumen arbitrario de medio RPMI (1% ANE, 1% Anti, y 10% SBF). Se repitió este paso dos veces.

❖ Para realizar el conteo de los linfocitos con la cámara Neubauer se preparó una dilución (1:3): 40μL de azul tripano y 20μL de células.

❖ Se realizó el conteo de los 4 cuadrantes principales y se llevó a cabo el siguiente cálculo: (No. de céls/ 4) X 10000 X No. de mL en los que se resuspendió el pellet. El resultado es el total de células con las que contamos.

❖ Se sembraron  $1.5 \times 10^6$  millones de células por cultivo. El volumen final de la caja T25 es de 10mL + 200μL de fitohemaglutinina (2%).

❖ Se dejó proliferar por 48h el cultivo de linfocitos a en una incubadora 37°C y con CO<sub>2</sub> 5% antes de poner el tratamiento.

## 18.9 Condiciones de cultivo de linfocitos.

### *Linfocitos: origen y uso como cultivo primario*

❖ Los linfocitos se desarrollan a partir de células madre. En esta fase de su desarrollo, las células son inmunológicamente incompetentes ya que carecen de la capacidad para iniciar una respuesta inmunitaria. Un cierto número de las células madre linfoides emigran del tejido mieloide hacia el timo. El timo experimenta un aumento debido a su proliferación y maduran para convertirse en células T, y solo una pequeña porción llega a los tejidos periféricos como células T maduras, capaces de efectuar una respuesta celular (75).

❖ Los linfocitos en cultivos primarios tienen ciertas características que los diferencian de las líneas celulares: conservan la morfología de las células del órgano del que fueron aislados, sus cromosomas tienen un número diploide (2n), su crecimiento *in vitro* es limitado y no hay inhibición por contacto (76). Además de que al estar más cerca de las células que los originaron, se ve reflejado en una mejor actividad y funcionalidad similar a su ambiente natural (76).

### *Requerimientos nutricionales*

❖ Se sembraron linfocitos en cajas T25 con cuello inclinado (CORNING), se cultivaron  $1.5 \times 10^6$  millones de linfocitos en 10mL de medio RPMI. El medio RPMI de 500mL viene adicionado con glutamina, para estimular el crecimiento de linfocitos T, además se suplementó con: 10% (56.5mL) de suero bovino fetal (SBF), 1% (5.7mL) de aminoácidos no esenciales (aa – NE) y 1% (5.7mL) de antibiótico antimetabólico (anti – anti). Cuando un medio se suplementa con SBF, se le adicionan hormonas proteicas y enzimas, factores específicos de promoción del desarrollo celular, factores de inhibición del desarrollo celular, hormonas no proteicas, lípidos esenciales para el desarrollo, diferenciación y multiplicación celular, minerales, metabolitos y nutrientes, inhibidores de proteasas, ligandos, inactivantes de materiales tóxicos, con el fin de mantener el crecimiento y energía celular.

❖ Se agregaron aa –NE para complementar los aminoácidos faltantes del medio de cultivo y para favorecer la síntesis de ácidos nucleicos y de proteínas.

- ❖ El empleo del antibiótico/antimitótico se añadió al medio para evitar cualquier tipo de contaminación ya sea por bacterias u hongos.
- ❖ La complementación con fitohemaglutinina, permitió aglutinar a los eritrocitos y leucocitos, además de estimular inespecíficamente la proliferación de células T (76).

#### *Requerimientos fisiológicos.*

- ❖ Los cultivos de linfocitos se mantuvieron a una temperatura de 37°C dentro de una incubadora, con CO<sub>2</sub> al 5% y con presión osmótica.

#### **18.10.- Ensayo de proliferación celular (CELL PROLIFERATION REAGENT WST – 1)**

- ❖ Se dejó proliferar a los linfocitos por 48h a 37°C y con CO<sub>2</sub> 5% (ver cultivo de linfocitos).
- ❖ Se sembraron linfocitos según su genotipo C/A, C/C y A/A en cajas de 96 pozos, 50 000 células X pozo X genotipo X triplicado.
- ❖ Se adicionó CDDP a varias concentraciones (2uM, 4uM, 8uM, 16uM y 24uM) para determinar la IC50 para los diferentes genotipos.
- ❖ Para facilitar el manejo de las células, se hizo un stock tanto de células como de CDDP para las diferentes concentraciones teniendo como volumen final para cada pozo 200µL.
- ❖ Se midió la viabilidad a las 24h.
- ❖ Se cuantificó el formazán metabolizado del WST – 1 de las células metabólicamente activas, en un lector de ELISA. Considerando que la absorbancia está directamente correlacionada con el número de células presente en cada pozo.

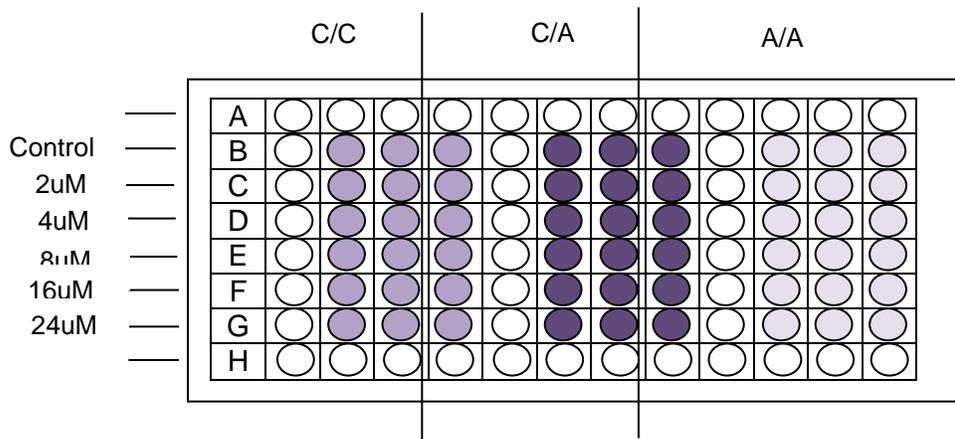


Fig. 8. Placa de 96 multipozos donde se esquematiza la posición de las concentraciones de cisplatino y de los diferentes genotipos del gen ERCC1.

### 18.11.-Análisis de la viabilidad celular y determinación de la IC50 en linfocitos tratados con cis – diaminodicloro platino (CDDP)

- ❖ Una vez cultivados los linfocitos según el punto 15.8, se dejaron proliferando 48h para permitir que la población celular se recuperara y homogenizara para obtener más linfocitos para los experimentos de interés.
- ❖ Pasadas las 48h se trataron a los linfocitos a diferentes concentraciones de cisplatino: 8µM, 16 µM, 32 µM, 64 µM y 96 µM.
- ❖ Se realizó un conteo con la técnica de azul tripano (descrito previamente, 15.8) de las células vivas y muertas para estimar la viabilidad celular a las diferentes concentraciones de cisplatino a 24h.
- ❖ La técnica de conteo con azul tripano se basa en el hecho de ser un colorante que entra por difusión pasiva a la célula que presenta roturas en la membrana celular. Así al contar las células en la cámara de Neubauer teñidas de color azul, son consideradas no viables. Las células viables se observarán como puntos más claros de tamaño similar a las no viables.

## 18.12- Tinción con Ioduro de propidio para evaluación del ciclo celular

### ❖ Solución Buffer de tinción

5 mL de Buffer de citratos al 2.2%

1mL de RNAsa 5mg/ml (0.05%mg/mL)

100 µL de ioduro de propidio (1mg/mL)

Aforar con agua

V= 10mL final

- ❖ Se lavó dos veces en PBS y se centrifugó por 10 min por 1200 rpm.
- ❖ Se resuspendió en 500 µL de Buffer de tinción
- ❖ Se incubó 1hr. a 37°C en oscuridad
- ❖ Se leyó en citometro de flujo

## 18.13- Detección del daño al DNA por medio de la técnica de conteo de micronúcleos por bloqueo de citocinesis (CBMN).

❖ Se obtuvieron de 10 a 20ml de sangre periférica (por venopunción de la región cubital del brazo) en tubos Vacutainer<sup>TM</sup> (Becton Dickinson, USA) con heparina como anticoagulante. Se realizó el cultivo de sangre total de la siguiente manera: 1ml de sangre en 10ml de medio RPMI suplementado con 10% SBF, 1% ANE y 1% Anti/Anti y se le adicionaron 200µl de fitohemaglutinina. Se dejó proliferando el cultivo durante 44 horas en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub> y 37°C.

❖ Una vez transcurrido el periodo de incubación se aplicó el tratamiento, se expuso a los cultivos a dosis crecientes de CDDP para determinar la condición idónea para la evaluación de micronúcleos. Las concentraciones de CDDP utilizadas fueron 0.5 µM, 5 µM, 10 µM, 15 µM y 20 µM.

❖ El tiempo de exposición a CDDP fue el mismo utilizado en los ensayos de IC50 y viabilidad celular, por lo cual la citocalasina B se adicionó al mismo tiempo que el tratamiento, esto para permitir que actúe sólo durante un ciclo de división celular, facilitando de esta forma, la

generación de un mayor número de células binucleadas. Se dejó proliferando el cultivo en la incubadora con 5% de CO<sub>2</sub> y 37°C.

### **Fijación de células con solución fijadora metanol- ácido acético (3:1).**

❖ Pasadas las 24 horas de tratamiento se re-suspendió cada caja de cultivo agitando suavemente. Se trasladó el medio a tubos de fijación (de preferencia tubos de cristal sellados perfectamente con papel Parafilm™ para evitar que se saliera la muestra). Se realizó una prefijación adicionando un volumen de pipeta Pasteur de nuestra solución fijadora tubo por tubo, agitando cada uno por inmersión suavemente.

**NOTA:** De preferencia se coloca la solución fijadora y se re-suspende cada tubo al instante, esto se realiza para evitar la formación de grumos de células.

❖ Posteriormente se llevó a cabo una centrifugación a 1200 rpm durante 8 minutos. Una vez terminada la centrifugación se retiró el sobrenadante con pipetas de 5 o 10ml, según el volumen de medio presente en los tubos. Al pellet se le adicionaron 5ml de solución fijadora, se sellaron con papel Parafilm™ y se agitaron por inmersión. Los tubos se dejaron durante 20 minutos a -20°C.

❖ Transcurrido el tiempo, los tubos fueron centrifugados a 1200 rpm durante 8 minutos. Se retiró el sobrenadante cuidadosamente y se realizaron lavados con el mismo volumen de solución fijadora. Este proceso se realizó hasta observar una coloración transparente en los tubos. En el último lavado, se retiró la mayor cantidad de sobrenadante (dejando aproximadamente 1ml). Se resuspendió el pellet obtenido con una pipeta y el volumen se trasladó a tubos eppendorf de 1.5ml.

❖ Una vez obtenido nuestro pellet se realizaron laminillas mediante goteo.

**NOTA.** Las laminillas estaban en un frasco con etanol al 70% frío, y el goteo se realizó suavemente a poca distancia. Por último, se dejaron secar las laminillas en la campana de extracción durante 24 horas.

### **Tinción de laminillas con Eosina y Azul de metileno.**

❖ Se llevó a cabo una primera tinción con Eosina durante 30s, agitando suavemente. Posteriormente se realizó un lavado durante 5s en agua destilada. En seguida se hizo una segunda tinción con azul de metileno durante 3s. Se lavó durante 10s en agua destilada. Por último se secó la contraparte de cada laminilla y se dejó secar totalmente durante 24 horas para iniciar el conteo.

### **Conteo de laminillas. (Heterogeneidad de laminillas)**

❖ A partir de un conteo de 500 células en toda la laminilla se determinó el porcentaje de células mononucleadas, binucleadas, multinucleadas y apoptóticas.

**NOTA:** porcentaje óptimo de células binucleadas varía del 30 al 60% de total de células.

### **Conteo de micronúcleos.**

❖ Se realizó un conteo de 1000 células binucleadas para determinar el porcentaje de micronúcleos.

NOTA. Todos los conteos fueron realizados utilizando el objetivo de 100X del microscopio (Leica, Model DME microscope, modelo: 13595XXX ).

## **19.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se Obtuvieron 86 individuos mexicanos con información completa de edad, sexo, que no fueran fumadores ni bebedores. Se empleó la prueba de t de student para analizar los datos de daño al DNA.

Se utilizó la prueba de ANOVA de una vía para analizar los datos de viabilidad celular por genotipos.

## 20.- RESULTADOS

### 20.1.-Amplificación del gen ERCC1 por PCR

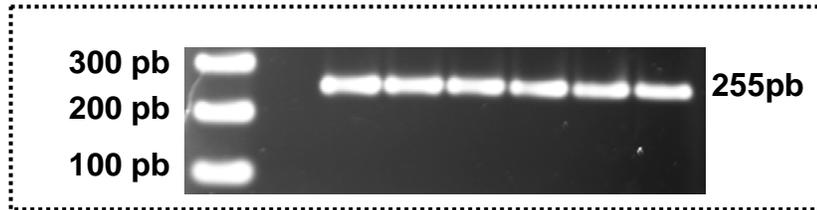


Fig 9. Amplificación del gen ERCC1.

A partir del DNA extraído de linfocitos de sangre periférica, se amplificó el fragmento de interés del gen ERCC1 por medio de PCR. Se observa que el fragmento mide 255pb. Esto se llevó a cabo para las 86 muestras obtenidas de cada individuo (Fig.9).

### 20.2.- Determinación de los polimorfismos del gen ERCC1 por medio de RFLP

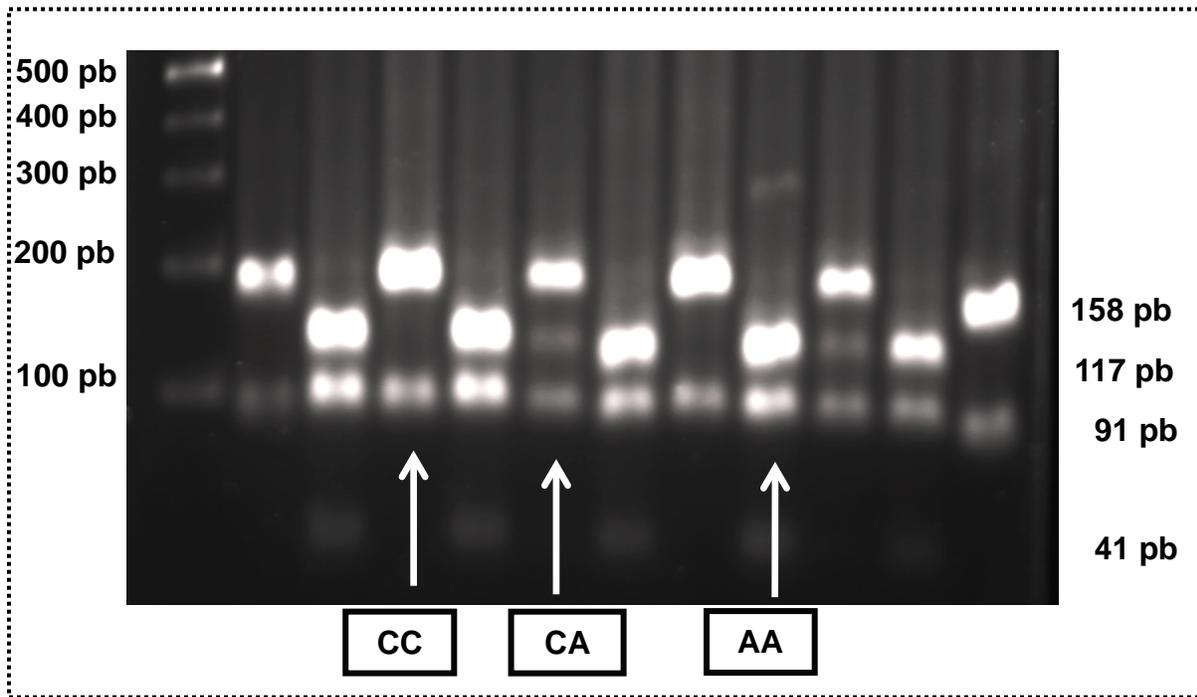


Fig 10. Determinación de los genotipos del gen ERCC1 por medio de la digestión con la enzima MBoll: CC silvestre, CA heterócigo y AA polimórfico en linfocitos de sangre periférica.

A partir del DNA extraído de linfocitos de sangre periférica se determinó la presencia de cada genotipo del gen *ERCC1*. Se empleó la técnica RFLP, donde por medio de una enzima de digestión MBoII, se digirieron las muestras de DNA de cada caso y se obtuvieron 3 diferentes genotipos como se muestra en la fig. 10.

Para el caso del genotipo silvestre CC se observa la presencia de dos bandas la de 158pb y la de 91pb, el genotipo heterócigo genera 3 bandas una de 158pb, otra de 117pb y la de 91pb. En el caso del genotipo polimórfico AA se observan las bandas 117pb (sitio de corte), 91pb y en ocasiones la de 41pb, ya que es un fragmento muy pequeño. En ambos genotipos (CC y CA) se observa la banda sin digerir de 158pb y la parental de 91pb.

### 20.3.- Frecuencia de los genotipos del gen ERCC1 en la población de estudio.

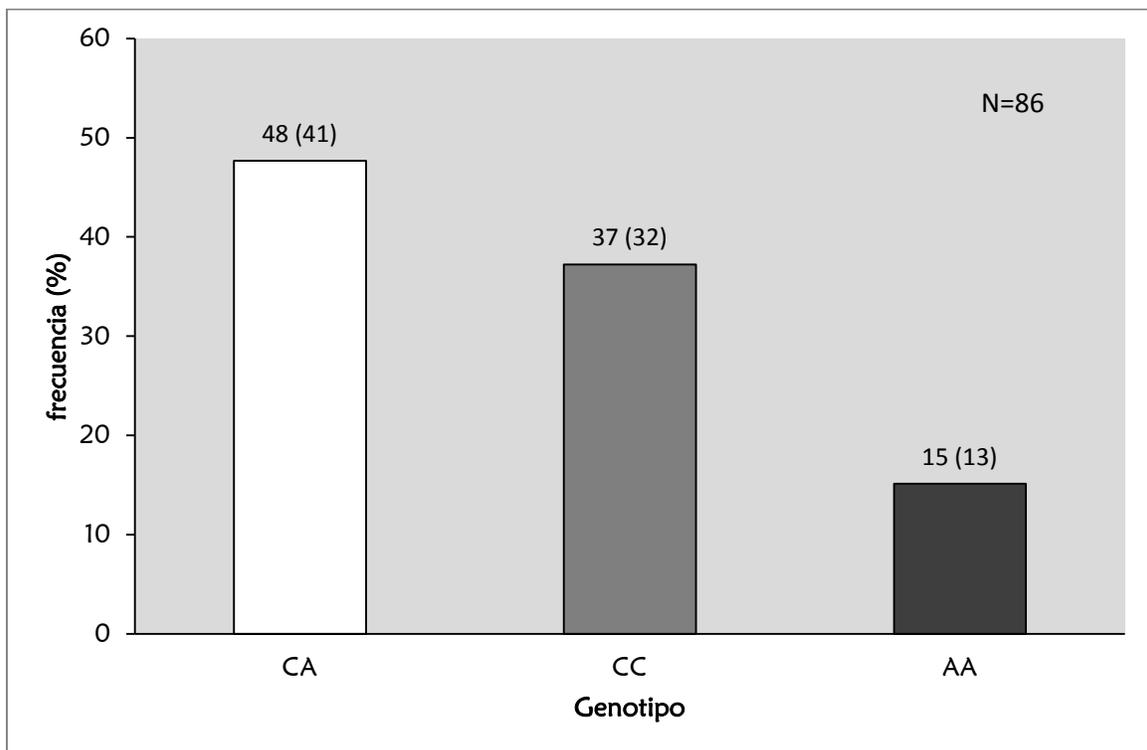


Fig. 11. Frecuencia de los genotipos del gen ERCC1 en población de estudio: 48% heterócigo (CA), 37% silvestre (CC) y 15% polimórfico (AA).

En la fig. 11 se presenta la frecuencia en porcentaje de los genotipos del gen ERCC1, donde se observa que el que es más común en población abierta es el genotipo heterocigoto (CA) con 48%, le sigue el genotipo silvestre (CC) con 37% y por último el genotipo polimórfico (AA) con un 15%. Los datos de las frecuencias de los genotipos de ERCC1 en población mexicana se parecen a las frecuencias de otras poblaciones, donde el genotipo AA tiene menor frecuencia en todas las poblaciones (tabla 3).

#### 20.4.- Medición de la proliferación en linfocitos de cada genotipo tratados con cisplatino.

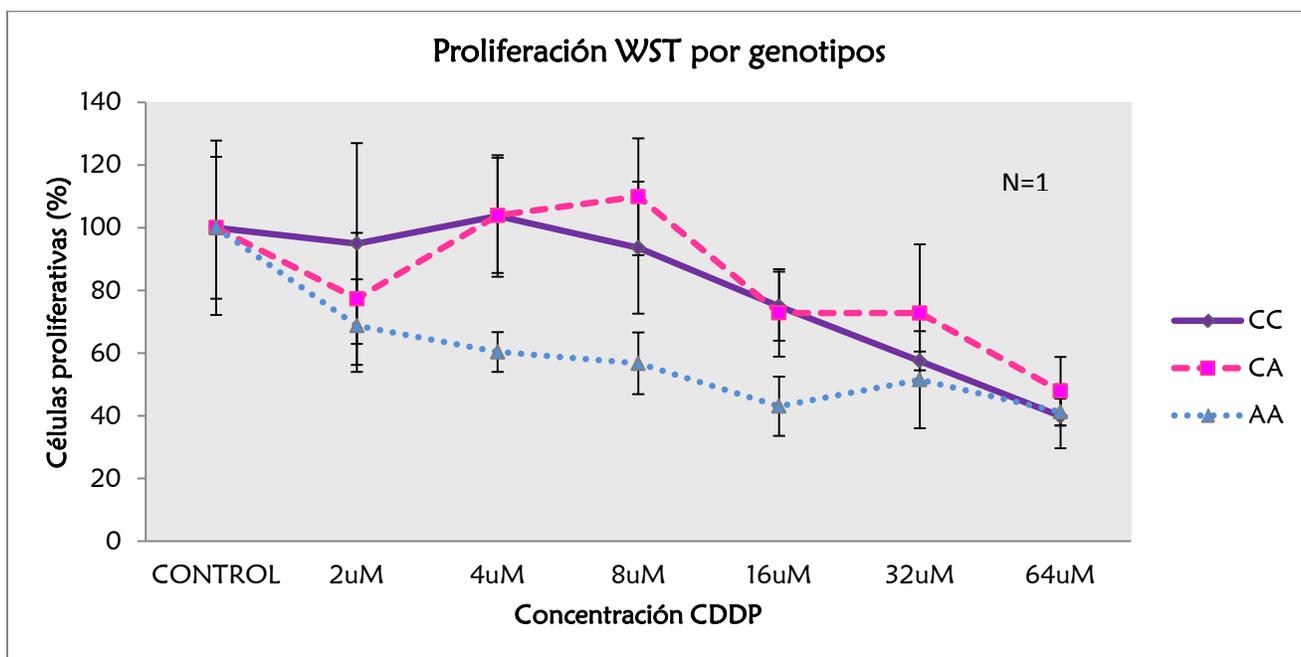


Fig. 12. Proliferación de linfocitos de cada genotipo del gen ERCC1 a las 24h por medio de la técnica WST.

Se midió la proliferación de los linfocitos tratados con cisplatino a las 24h. Se utilizaron los linfocitos de un individuo por triplicado para cada genotipo del gen ERCC. Se establecieron diferentes dosis de tratamiento: 2µM, 4µM, 8µM, 16µM, 32µM y 64µM, para observar la tendencia de proliferación de las células. En un principio se observa que a 2µM, en todos los genotipos hay una tendencia a disminuir de la población de linfocitos, sin embargo hay una marcada tendencia para cada genotipo y estas se conserva hasta la dosis más alta de 64µM. En el caso del genotipo CA y CC presentan mayor número de células proliferativas pero

donde se muestra menor número de células proliferativas, es en el genotipo AA. Considerando los grupos controles se observa que hay una pequeña diferencia en la proliferación de los 3 genotipos, aunque la mayor diferencia se da entre 4uM y 16uM de cisplatino (Fig. 12).

### 20.5.- Establecimiento de la IC50 en cultivos de linfocitos tratados con cisplatino

Con base en el ensayo de proliferación celular se establecieron las dosis a la cual se calcularía la IC50, ya que a partir de 8µM se observa una mayor diferencia en cuanto al comportamiento de los linfocitos para cada genotipo. Es por esta razón que se decidió utilizar dosis más altas para llevar a cabo la curva de diferentes concentraciones de cisplatino.

A partir de linfocitos extraídos de sangre periférica tratados con cisplatino a las 24h, se realizó ensayo por exclusión con azul tripano para medir la viabilidad celular por genotipos de ERCC1.

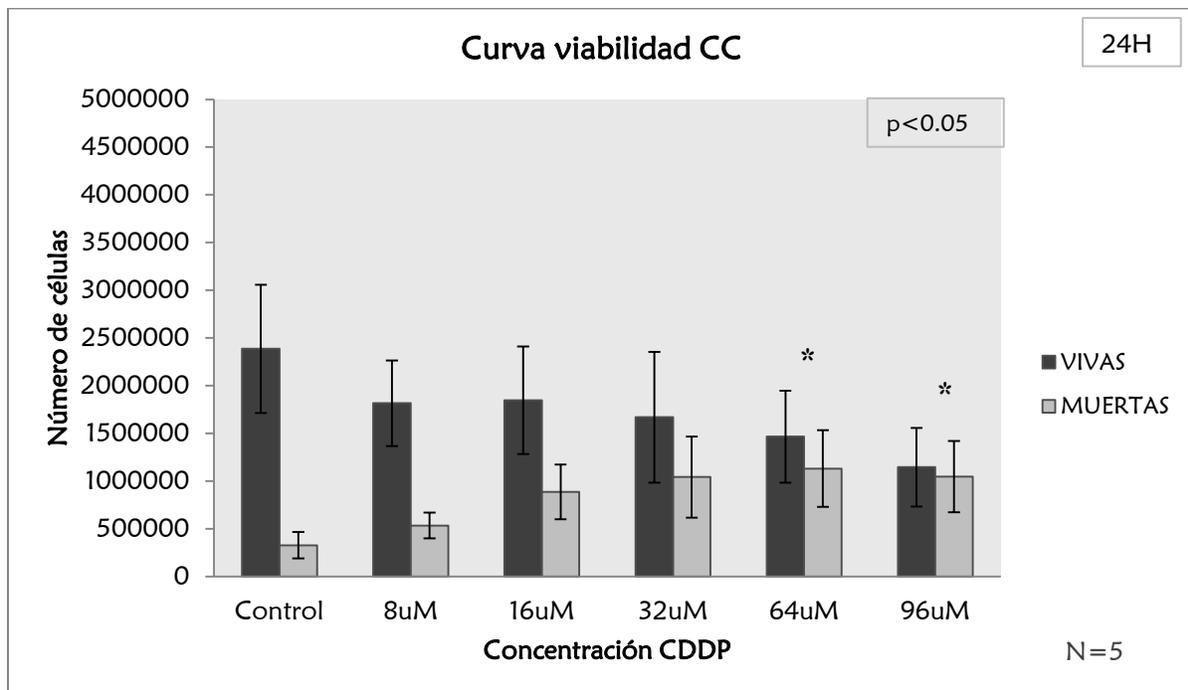


Fig.13. Curva de viabilidad celular para el genotipo CC

El genotipo silvestre CC muestra una tendencia esperada, manifestando una viabilidad mayor con respecto al genotipo AA. Considerando esta tendencia de los linfocitos, se realizó una prueba de ANOVA (one way) para determinar a qué concentración de cisplatino se observaban diferencias estadísticamente significativas. Las concentraciones de 64uM y 96uM fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) respecto al control, por lo que los linfocitos de este genotipo exhiben cierta resistencia al cisplatino porque se necesitó una dosis del fármaco mayor para observar una disminución de la viabilidad. En el caso de las células muertas se observa una relación directamente proporcional, ya que conforme aumenta la concentración de cisplatino aumenta el número de células apoptóticas. (Fig.13).

En el caso del genotipo heterocigoto CA, el comportamiento de la población de linfocitos muestra una tendencia similar al del genotipo CC, es decir, disminuye la viabilidad conforme aumenta la concentración del fármaco. A las concentraciones intermedias de la curva (32uM, 64uM y 96uM) la población mantiene un número de células similar a las 24h de tratamiento. Las células muertas presentan mayor número en el cultivo conforme aumenta la concentración de cisplatino, aunque cabe mencionar que donde se encontró una diferencia estadísticamente significativa (ANOVA,  $p < 0.05$ ) fue a una concentración de 96uM de cisplatino (Fig.14).

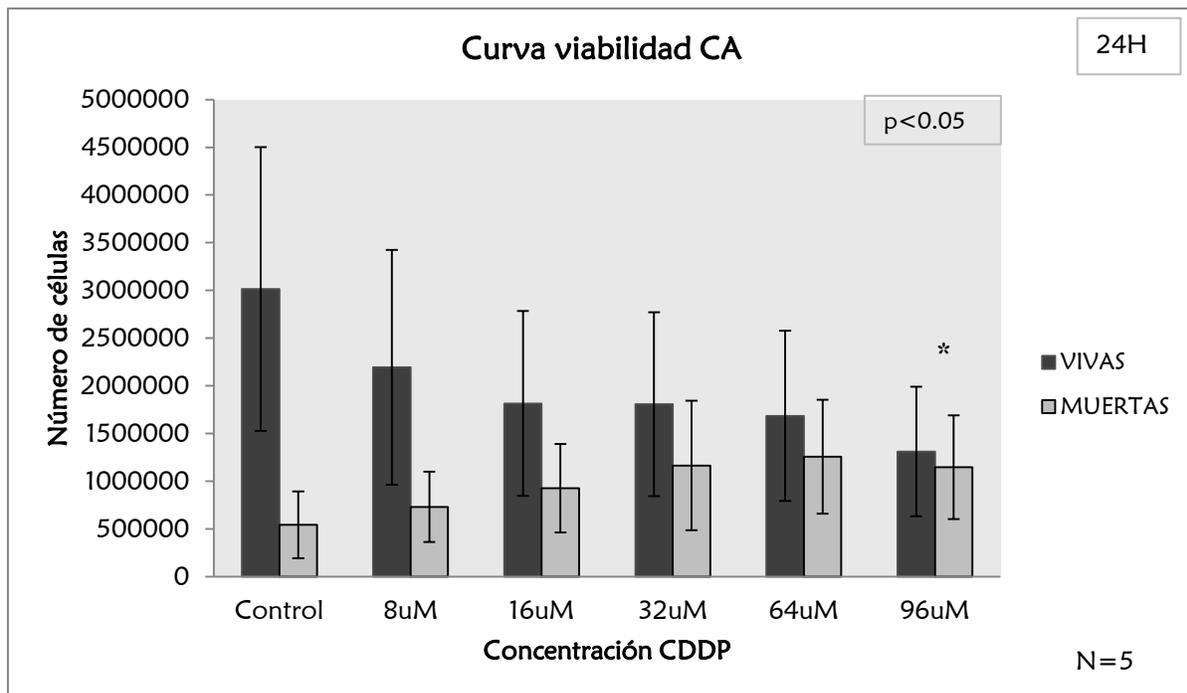


Fig.14. Curva de viabilidad celular para el genotipo CA

La población celular de linfocitos del genotipo polimórfico AA muestra un número de células viables menor desde una concentración baja del fármaco. Esto nos sugiere que se requiere una dosis menor de cisplatino para observar diferencias en la viabilidad y esto fue estadísticamente significativo (ANOVA,  $p < 0.05$ ) a 16 $\mu$ M, 32 $\mu$ M, 64 $\mu$ M y 96 $\mu$ M. El comportamiento del genotipo AA nos indica que dichas células son más sensibles al cisplatino a 24h de tratamiento con respecto al genotipo CC y CA. Con respecto a las células muertas se distingue que van aumentando conforme aumenta la dosis de cisplatino, sin embargo es notable mencionar que en este genotipo a partir de una dosis intermedia, de 32 $\mu$ M, la presencia de células no viables se va equiparando con el número de células viables (Fig.15).

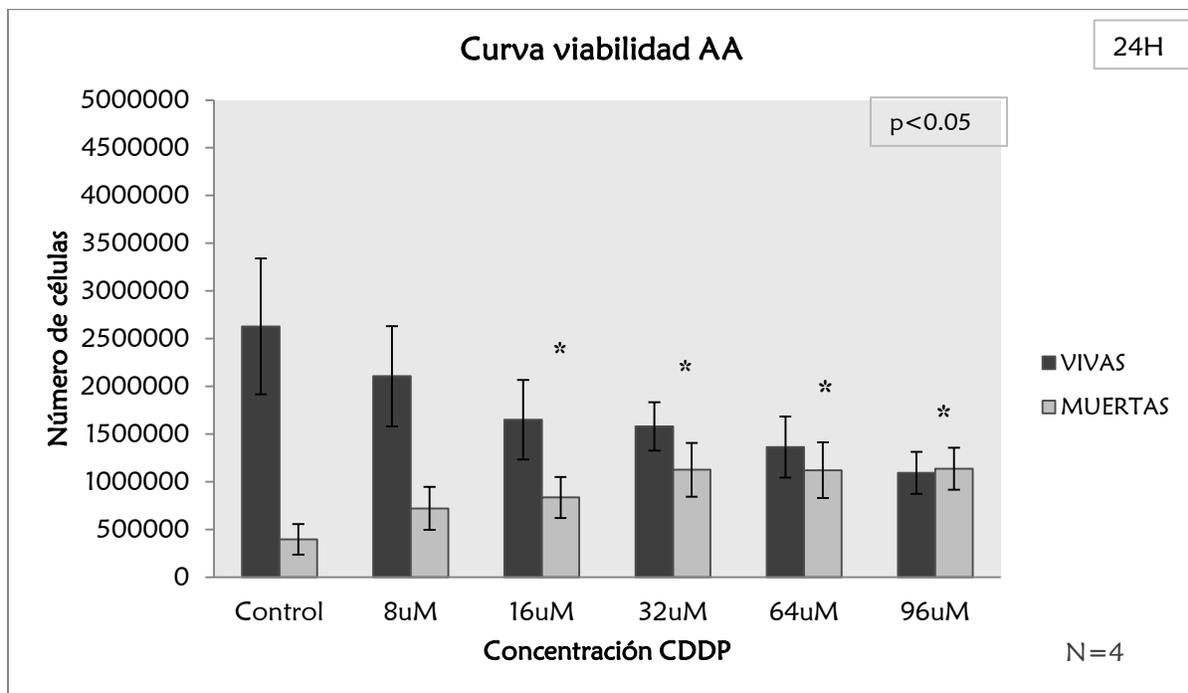


Fig.15. Curva de viabilidad celular para el genotipo AA

El comportamiento del cultivo de linfocitos para cada genotipo según la dosis fue diferente, ya que se observa una ligera diferencia en cuanto a la respuesta celular en las dosis más altas (32 $\mu$ M, 64 $\mu$ M y 96 $\mu$ M).

Con la técnica de exclusión por azul tripano se procedió a medir la viabilidad celular en los diferentes genotipos.

Se calculó la IC50 para cada genotipo según la fórmula de la pendiente:

$$m = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1}$$

En la siguiente tabla se enlistan las IC50 para los diferentes genotipos

Genotipo	IC50 (μM)
CC	91uM
CA	80uM
AA	70uM

Tabla 5. IC50 para los diferentes genotipos del gen ERCC1

**20.6.- Determinar la viabilidad de los cultivos de linfocitos con el genotipo polimórfico (AA), tratados con cisplatino y hacer una comparación con los genotipos silvestres (C/C) y con los heterócigos (C/A).**

Una vez que ya se conocía el comportamiento de los linfocitos a diferentes dosis de cisplatino se observó que existía un comportamiento diferente en la viabilidad celular para cada genotipo de ERCC1 (Fig. 13, 14 y 15). Conociendo estos datos anteriores se decidió hacer una gráfica de correlación lineal donde se compararán los 3 genotipos: CC, CA y AA y así poder determinar si existían diferencias estadísticamente significativas por dichos genotipos. El genotipo CC presenta mayor viabilidad ( $R^2=0.911$ ) 24h de tratamiento a diferencia de los otros genotipos, sin embargo los genotipos CA ( $R^2=0.8454$ ) y AA ( $R^2=0.9369$ ) muestran una viabilidad menor, aunque en el genotipo AA este efecto es más evidente por la inclinación de la recta respecto a los otros genotipos. (Fig. 16).

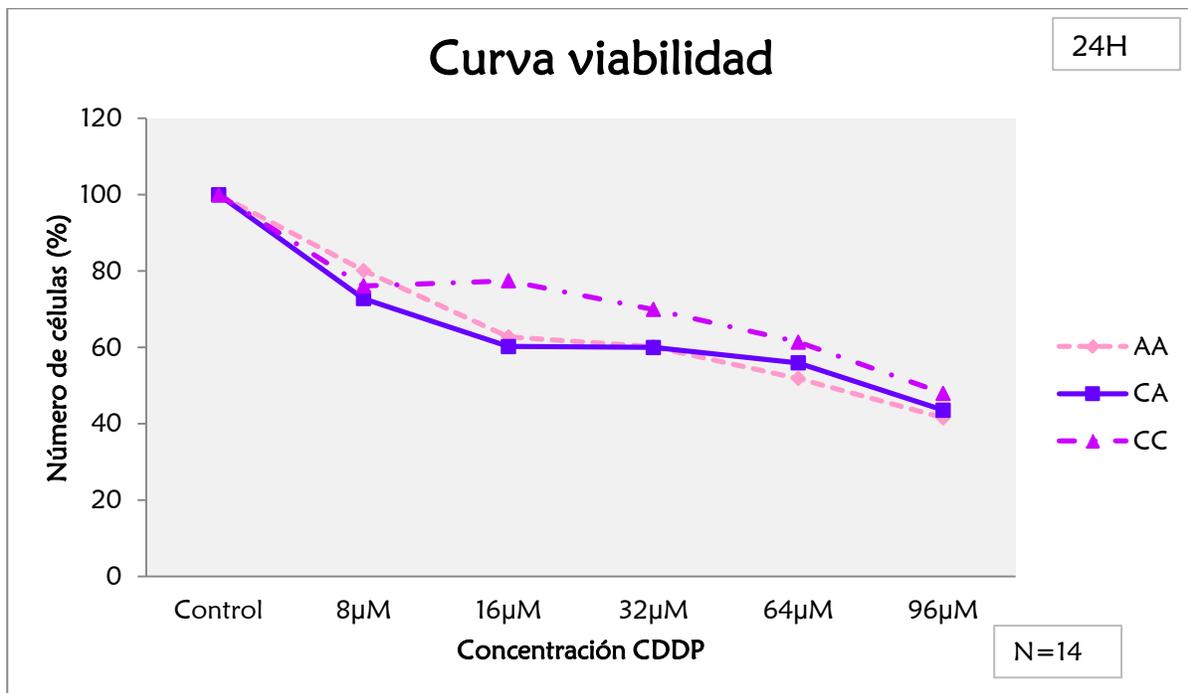


Fig.16. Viabilidad celular por genotipos del gen ERCC1

### 20.7.- Tinción con ioduro de propidio para evaluación del ciclo celular

Figura complementaria

Se midió el ciclo celular en linfocitos tratados con cisplatino, para determinar si las células se arrestaban en alguna fase del ciclo celular, esto porque en la viabilidad celular se observó que a una mayor concentración de cisplatino (96µM) la población de linfocitos disminuía aunque no más del 50% del cultivo.

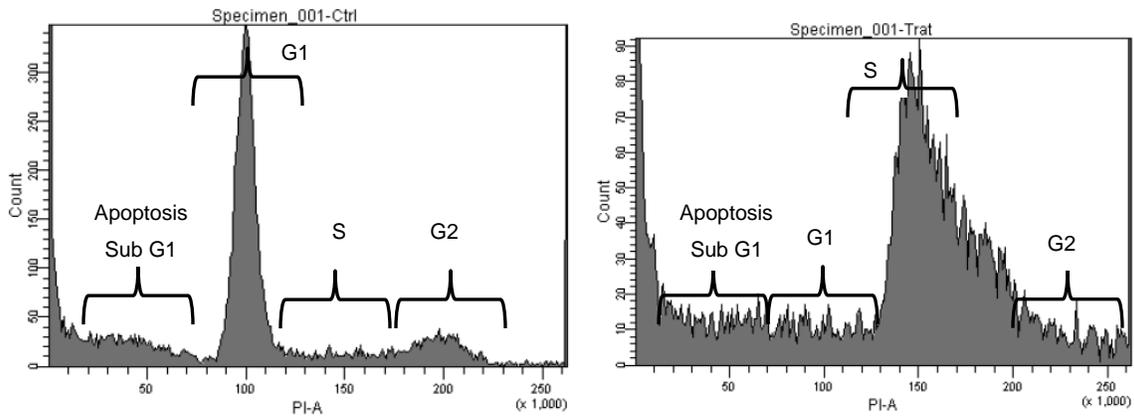


Fig. 17. Citometría de flujo del arresto del ciclo celular en linfocitos tratados con cisplatino a 24h. Der., control e izq., tratado.

Se midió el contenido de DNA con yoduro de propidio en linfocitos tratados con cisplatino a 24h y se observó que las células se arrestaban en fase S del ciclo celular. En la fig. 18 se observa el porcentaje de células para cada fase del ciclo celular. En el control las células en apoptosis (Sub G1) le corresponde un 13.9%, para G1 42.9%, para S 6.2% y para G2 8.2%. Sin embargo para células tratadas con cisplatino se aprecia un arresto evidente en fase S del ciclo celular, donde existe un 8% para células apoptóticas, 5.7% para G1, 25.8% para S y 7.5% para G2.

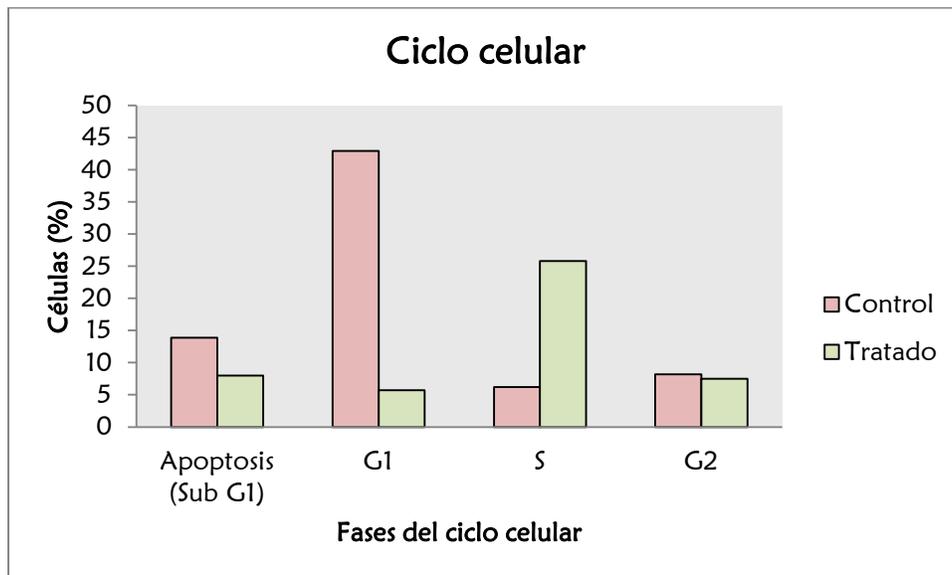


Fig. 18. Porcentaje de células arrestadas en las diferentes fases del ciclo celular.

## 20.8.- Evaluación del daño al DNA en ambos genotipos mediante la técnica de micronúcleos (MN) por bloqueo de citocinesis.

Se estableció una curva de tratamiento con cisplatino para determinar la dosis a la cual se genera daño al DNA. Se observa que a  $15\mu\text{M}$  para ambos genotipos (CC, CA y AA) es la dosis ideal a la cual el daño generado permite contar micronúcleos sin afectar la proliferación del cultivo (Fig. 19).

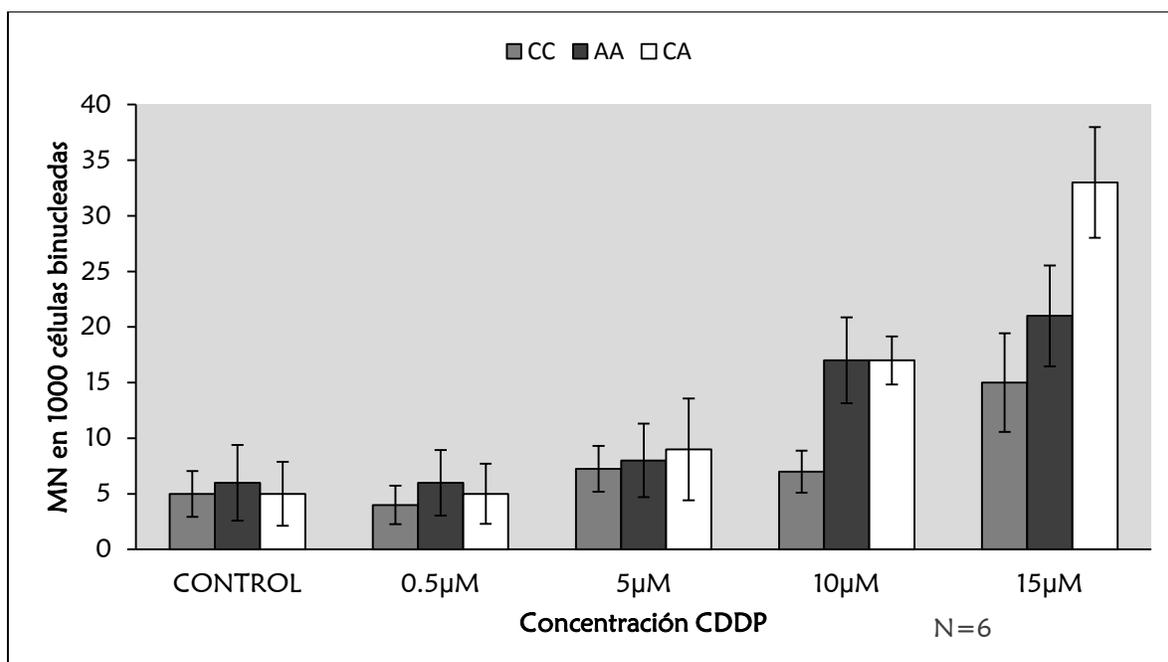


Fig.19. Curva de dosis para generar daño al DNA en los linfocitos tratados con cisplatino a 24h.

Para poder establecer una dosis adecuada para realizar el conteo de micronúcleos siempre se debe de considerar que el cultivo esté proliferando, para esto se considera un porcentaje de células binucleadas de entre 30 – 60%, que no haya tanta presencia de células apoptóticas y con membranas intactas principalmente (87,88).

A continuación se muestra la gráfica del porcentaje de proliferación de  $15\mu\text{M}$  (Fig.20).

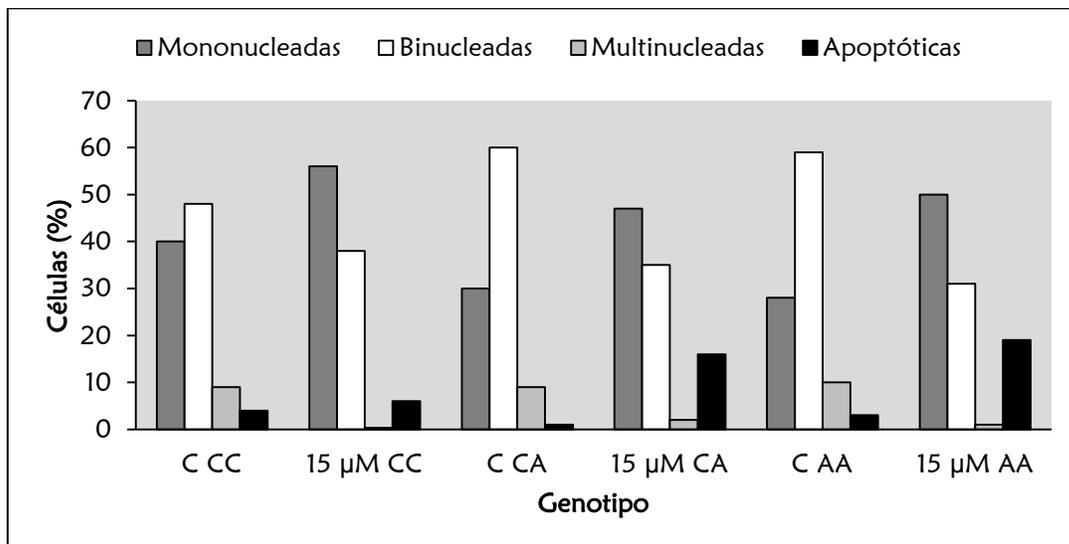


Fig.20. Curva de porcentaje de proliferación del cultivo de linfocitos a 24h de tratamiento con cisplatino

### 20.9.- Evaluación de daño al DNA por conteo de micronúcleos por genotipo.

Una vez conocida la dosis a la cual se genera el daño al DNA para el conteo de micronúcleos se evaluó dicho daño para cada genotipo.

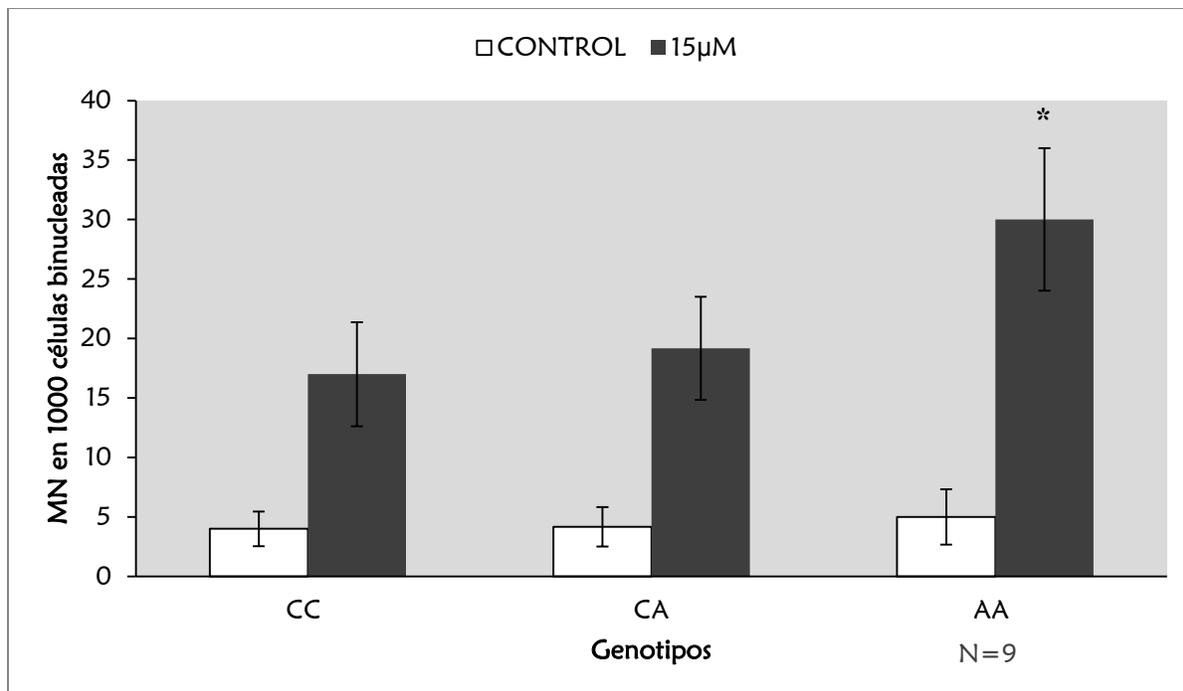
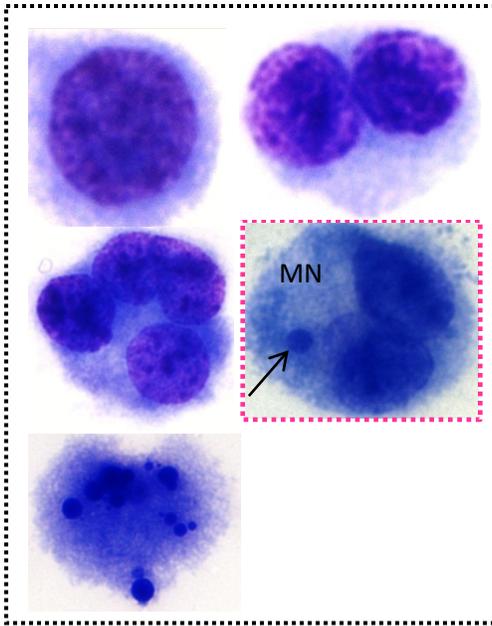


Fig.21. Presencia de micronúcleos por genotipo en linfocitos tratados con cisplatino a 24h.



La evaluación del daño al DNA por medio del conteo de micronúcleos fue significativa para ambos genotipos ( $p < 0.05$ ). Al realizar una prueba de t de Student se observa que para cada genotipo la presencia de micronúcleos fue contundente y significativa, en particular al comparar el genotipo AA ( $p < 0.05$ ) respecto al CA y CC. Esto se hace evidente que el genotipo polimórfico AA presenta mayor cantidad de MN en linfocitos tratados con cisplatino a 24h con respecto al genotipo CC y CA (Fig. 21).

Fig.22. Tipos de células. 1: mononucleada, 2: binucleadas, 3: multinucleadas, 4 binucleadas con MN y 5: apoptótica

## 21.- DISCUSIÓN

El daño al DNA altera múltiples procesos dentro de una célula, ya sea interfiriendo en procesos como la replicación, transcripción y recombinación, así como en el ciclo de división celular y la apoptosis (7). Las lesiones son eliminadas con eficacia mediante los mecanismos de reparación del DNA cada uno de ellos catalizados por un conjunto de genes diferentes, ayudando a mantener la estabilidad (72) y la integridad del genoma (10,16).

*ERCC1* es un gen que tiene un papel importante dentro de la vía NER. Su función es la de escindir el fragmento dañado en el extremo 5'→3'. Puede interactuar con XPA y TFIIH para el reconocimiento del daño y la reparación de aductos (14,91). El polimorfismo 8092C→A del gen *ERCC1* se localiza en el extremo 3' de la región no codificante (3'UTR), que es una transversión de una pirimidina por una purina (C – A).

El objetivo principal de este trabajo fue establecer la relación que existe entre la presencia del polimorfismo 8092C→A del gen *ERCC1* y su impacto en la viabilidad celular en cultivos de linfocitos tratados con cisplatino, así como la evaluación del daño al DNA por la presencia de micronúcleos.

Se observó, que el genotipo C/C tiene mayor frecuencia respecto al genotipo C/A y A/A. Las frecuencias alélicas encontradas en este trabajo (0.39) fueron similares a las reportadas en la población Europea (0.27) y Americana (0.48) (111). La frecuencia del alelo C es mayor tanto en población aparentemente sana como en pacientes con cáncer de ovario, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de testículo, cáncer de pulmón y tumores cerebrales (53, 94, 100, 52, 55). La presencia del polimorfismo en ambas poblaciones indica que no es resultado del proceso de transformación maligna. La región en la que se encuentra no afecta sitios de splicing, o regiones regulatorias, por lo que este polimorfismo no implica cambios deletéreos que pongan en riesgo la salud de los portadores (93).

La presencia del polimorfismo 8092C→A del gen *ERCC1* altera la viabilidad celular en cultivos de linfocitos tratados con cisplatino. Cuando analizamos el impacto en la viabilidad se observó que ante la presencia del alelo polimórfico A, el número de células fue menor respecto al alelo C, en los linfocitos tratados con cisplatino. Aunque ya se conoce que este polimorfismo no ocasiona un cambio deletéreo, hay estudios que sugieren un efecto en la modulación del mensajero del gen *ERCC1*, regulando negativamente la transcripción (92).

En pacientes con cáncer de próstata portadores del polimorfismo *ERCC1* 8092 C→A se ha caracterizado una disminución en la expresión de mRNA, y una mejor respuesta al tratamiento. Esto podría asociarse a una disminución en la capacidad de reparación (98). Para el caso de pacientes con cáncer de ovario, se ha mostrado que existe una elevada expresión del transcrito asociada a una resistencia a agentes platinados (69).

En este trabajo, la sensibilidad del genotipo AA ante el tratamiento con cisplatino sugiere que la capacidad de reparación del DNA podría estar alterada, manifestando un mayor daño al DNA y deficiencias en la reparación por la vía NER, ocasionando una menor viabilidad.

La respuesta al tratamiento con cisplatino ya se ha evidenciado en líneas celulares de cáncer. En líneas de cáncer de testículo, la sensibilidad al cisplatino se asocia a deficiencias en la reparación del DNA debido a la pérdida de la funcionalidad de la endonucleasa *ERCC1-XPF* (59). Así mismo, existe una disminución en la expresión de *ERCC1* en pacientes con cáncer de testículo (100). En cáncer de ovario, la expresión de *ERCC1* es mayor en las líneas resistentes a cisplatino (95). Estos hallazgos reafirman la importancia de esta proteína en la sensibilidad al tratamiento.

Como menciona Parker et. al., las diferencias en las líneas celulares de cáncer de ovario resistentes (A2780/CP70) y sensibles (A2780) se debe a la toxicidad, acumulación y salida del cisplatino dentro de las células. Aunque estos parámetros de resistencia al cisplatino no se midieron, existen estudios que asocian la resistencia con mecanismos de detoxificación, salida o entrada del fármaco, apoptosis, a la conjugación del glutatión o metalotioneínas, a un aumento en la reparación del DNA, o salto de lesiones durante la replicación (38,40). Estos mecanismos de resistencia se ha visto que en líneas celulares de cáncer de ovario pueden alterarse y estar implicados en la respuesta (95). Nuestros datos sugieren que una mayor viabilidad de linfocitos portadores del genotipo CC tratados con cisplatino podría estar asociada a alguno de estos mecanismos.

Aunque en este estudio no se evaluó la resistencia asociada al cisplatino, si se determinaron las consecuencias del daño al DNA, sin embargo es importante mencionar que es necesario realizar más estudios donde se evalúen como se encuentran estos mecanismos de resistencia. La eficiencia de estos mecanismos en una célula ya sea normal o cancerosa ocasionaría resistencia asociada a reparación del DNA. No obstante la resistencia podría

deberse ya sea a alguna modificación en dichos mecanismos de resistencia y además involucrar alteraciones en la reparación del DNA interfiriendo con la sensibilidad del cisplatino (33, 38). En este trabajo observamos que la sensibilidad asociada al cisplatino de los linfocitos, se debe a la presencia del polimorfismo AA.

Existen reportes que asocian la presencia del polimorfismo 8092C→A de *ERCC1* con el riesgo al desarrollo de cáncer, así como a la respuesta y supervivencia al tratamiento con cisplatino (52, 53, 55, 96).

En cáncer de pulmón la presencia del polimorfismo 8092C→A del gen *ERCC1* se asocia con supervivencia global y respuesta al tratamiento con platinos (52). Una hipótesis de este efecto es que hay estudios donde se menciona que podría estar afectando la estabilidad del mensajero, aunque todavía faltan estudios por concretar (55). También se sabe que en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas se asocia a toxicidad gastrointestinal (96). En pacientes con cáncer de ovario portadores del polimorfismo tratadas con cisplatino y paclitaxel, existe una mayor sobrevida libre de enfermedad y sobrevida global (53). En pacientes con tumores cerebrales, se ha visto que aquellos que poseen al menos un alelo polimórfico A tienen un incremento en el riesgo a padecer esta enfermedad (55).

El cisplatino induce daño al DNA mediante la formación de aductos, aunque también se sabe que induce arresto celular en fase G2 del ciclo celular y rompimientos doble cadena asociados a viabilidad (103). Al evaluar el ciclo celular encontramos un arresto en fase S, que ha sido reportado anteriormente (102). Los entrecruzamientos intercatenarios comprenden un tipo de lesión con un efecto biológico importante, ya que involucran una modificación covalente en ambas cadenas del DNA (115). Cuando existen deficiencias en la vía NER, el daño no es reconocido por la polimerasa durante la vía NER de reparación acoplada a la transcripción. Bajo esta circunstancia existen dos escenarios: la célula muere o sobrevive acumulando daño en su material genético, y podría ocasionar cáncer. Los aductos generan una torsión en la hebra de DNA, ocasionando rompimientos de doble cadena (102). En nuestro estudio se determinó el daño al DNA por la presencia de micronúcleos (MN) en células tratadas con cisplatino. Encontramos que las células portadoras del alelo A presentan tanto un mayor daño al DNA (por la presencia de una frecuencia mayor de MN comparada

con el alelo C) como una menor viabilidad (debido a una mayor citotoxicidad por la acumulación de aductos).

Existe sólo un reporte (en población Europea) que asocia algunos polimorfismos en la vía NER con el daño al DNA evaluado por la frecuencia de micronúcleos. En este trabajo sólo se evaluó la frecuencia de MN en función de la edad y la presencia de polimorfismos en los genes *XPA*, *XPC* y *XPD* de la vía NER (90). No encontraron una asociación directa entre la frecuencia de los MN y la presencia del polimorfismo 5'UTR de XPA.

Nuestro estudio es el primer trabajo donde se demuestra que existe una asociación entre la presencia del polimorfismo 8092C→A del gen *ERCC1*, la viabilidad celular y la generación de micronúcleos en linfocitos tratados con cisplatino en población mexicana.

## **22.- CONCLUSIÓN**

La presencia del polimorfismo 8092C→A del gen *ERCC1*, se asocia con una disminución en la viabilidad celular de cultivos de linfocitos y una mayor respuesta al tratamiento con cisplatino, así mismo este polimorfismo se asoció con un incremento en la generación de MN evidenciando mayor daño al DNA.

## 23.- BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Curtis H., Barnes Sue N. (2000). Biología. 6ta. Ed. Panamericana. Colombia.
- 2.- Nelson D., Cox M. (2001). Lehninger Principios de Bioquímica. 3er. Ed. Omega. Barcelona.
- 3.- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. (2002). Biología Molecular de la Célula. 3er. Ed. Omega. Barcelona.
- 4.- Recillas F., Escamilla M. (2004). Participación de la estructura de la cromatina en la regulación de la expresión génica. Mensaje Bioquímico. Vol. 28.
- 5.- Brutlag D. (2000). Chromatin structure. Biochemistry 201.
- 6.- Griffiths A., Miller J., Suzuki D., Lewontin R., Gelbart W. (2002). Génética. 7ma. Ed. McGraw – Hill – Interamericana. España.
- 7.- Choi B. (2006). FEBS J. Vol. 273
- 8.- Sung J., Demple B. (2006). Roles of base excision repair subpathways in correcting oxidized abasic sites in DNA. FEBS J. Vol. 273. 1620 – 1629pp.
- 9.- Moore B., Morris L., Doetsch P. (2009). DNA damage. Encyclop of life sciences. 1 – 10.
- 10.-Friedberg E., Aguilera A., Gellert M., Hanawalt P., Hays J., Lehmann A., Lindahl T., Lowndes N., Sarasin A., Wood R. DNA repair: From molecular mechanism to human disease (2006). DNA Repair. Vol 5. 986 – 996pp.
- 11.- Qingyi W., Lei L., Chen D. ( 2007). Dna repair, genetic instability and cancer. Stallion Press. World Scientific. New Jersey. USA. 139 – 164pp.
- 12.- Batty D., Wood R. (2000). Damage recognition in nucleotide excision repair of DNA. Gene. Vol. 241. 193 – 204pp.

- 13.- Tarantini A, Maître A, Lefèbvre E, Marques M, Rajhi A, Douki T. (2011). Polycyclic aromatic hydrocarbons in binary mixtures modulate the efficiency of benzo[a]pyrene to form DNA adducts in human cells. *Toxicology*. Vol. 279. 36 – 44pp.
- 14.- Chaney S. and Sancar A. (1996). DNA repair: Enzymatic mechanisms and relevance to drug response. *J. Natl Cancer Inst*. Vol. 88. 1346 – 1360pp.
- 15.- Stivers J. and Kuchta R. (2006). Introduction: DNA damage and repair. *Chem Rev*. Vol. 106. 213 – 214pp.
- 16.- Reed S. and Waters R. (2005). DNA repair. *Encyclop Of Life Sciences*. 1 – 6pp.
- 17.-De Laat W., Jaspers N. and Hoeijmakers J. (2007). Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Develop*. Vol. 13. 768 – 785pp.
- 18.- Costa R., Chigancas V., Galhardo R., Carvalho H. and Menck C. (2003). The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie*. Vol. 85. 1083 – 1099pp.
- 19.- Hanawalt P. (2002). Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene*. Vol. 21. 8949 – 8956pp.
- 20.- Yu Z., Chen J., Ford B., Brackley M. and Glickman B. (1999). Human DNA repair systems: an Overview. *Environ Mol Mutagen*. Vol. 33. 3 – 20pp.
- 21.- Christmann M., Tomicic M., Roos W. and Kaina B. (2003). Mechanisms of human DNA repair: and update. *Toxicology*. Vol. 193. 3 – 34pp.
- 22.- Wood R. (1997). Nucleotide excision repair in mammalian cells. *J Biol Chem*. Vol. 272. 23465 – 23468pp.
- 23.- Wood R. (2010). Nucleotide excision repair proteins and interstrand crosslink repair. *Environ Mol Mutagen*. Vol 51. 520 – 526pp.

- 24.- Reed S. (2005). Nucleotide excision repair in chromatin: The shape of things to come. DNA Repair. Vol. 4. 909 – 918pp.
- 25.- Cleaver J. and States C. (1997). The DNA damage-recognition problem in human and other eukaryotic cells : the XPA damage binding protein. Biochem. Vol. 328. 1 – 12pp.
- 26.- Cleaver J. (2005). Cancer in xenoderma pigmentosum and related disorders of DNA repair. Nat Rev Cancer. Vol. 5. 564 – 573pp.
- 27.- Sancar A. (1995). DNA repair in humans. Annu. Rev. Genetics. Vol. 29. 69 – 105pp.
- 28.- Jun S., Kim T., and Ban Ch. (2006). DNA mismatch repair system: Classical and fresh roles. FEBS J. Vol. 273. 1609 – 1619pp.
- 29.- Rastogi R., Richa, Kumar A., Tyagi M and Sinha R. (2010). Molecular mechanisms of ultraviolet radiation – induced DNA damage and repair. J Nucleic Acids. 1 – 32pp.
- 30.- Benhamou S., Sarasin A. (2000). Variability in nucleotide excision repair and cancer risk: a review. Mutat Res. Vol. 462. 149 – 158pp.
- 31.- Steeg H. (2001). The role of nucleotide excision repair and loss of p53 in mutagenesis and carcinogenesis. Toxicol Lett. Vol 120. 209 – 219pp.
- 32.- Krejci L., Altmannova V., Spirek M., Zhao X. (2012). Homologous recombination and its regulation. Nucleic Acids Res. 1 – 24pp.
- 33.- Reed E. (1998). Platinum – DNA adduct, nucleotide excision repair and platinum based anti – cancer chemotherapy. Cancer Treat Rev. Vol 24. 331 – 344pp.

- 34.- Martín A., Del Valle A., García – Pando A., Laita D., Sánchez F., Méndez D., Garruéz A., Fernández J., Sierra R., Molina J. (2004). Farmacología clínica y terapéutica médica. Mc Graw – Hill – Interamericana. Colombia. 209 – 121pp.
- 35.- Kalant – Walter H. (2002). Principios de farmacología médica. 6ta. Ed. Oxford. México. 750 – 770pp.
- 36.- Kostova Irena. (2006). Platinum complexes as anticancer agents. Recent Pat Anticancer Drug Discov. Vol. 1. 1 – 22pp.
- 37.- Maheshwari V., Marzilli P., Marzilli L. (2011). Investigation relevant to the conformation of the 17 – membered Pt(d(GpG)) macrocyclic ring formed by Pt anticancer drugs with DNA: Pt complexes with a goldilocks carrier ligand. Inorg Chem. Vol. 1. 6626 – 6636pp.
- 38.- Rabik C., and Dolan M. (2007). Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. Cancer Treat Rev. Vol. 1. 9 – 23pp.
- 39.- Jamieson E., Lippard S. (1999). Structure, recognition and processing of cisplatin – DNA adducts. Chem Rev. Vol 99. 2467 – 2498pp.
- 40.- Pérez R. (1998). Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. Eur J Cancer. Vol. 34. 1535 – 1542pp.
- 41.- Wang D., and Lippard S. (2005). Cellular processing of platinum anticancer drugs. Nat Rev. Vol. 4. 307 – 317pp.
- 42.- Wozniak K., and Blasiak J. (2002). Recognition and repair of DNA – cisplatin adducts. Acta Biochim Pol. Vol. 49. 583 – 596pp.
- 43.- Zamble D., and Lippard S. (1995). Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy. TIBS Rev. Vol. 20. 435 – 439pp.

- 44.- Zlatanova J., Yaneva J., and Leuba S. (1998). Proteins that specifically recognize cisplatin – damaged DNA: a clue to anticancer activity of cisplatin. *FASEB*. Vol. 12. 791 – 799pp.
- 45.- Ohndorf U., Rould M., He Q., Pabo C., Lippard S. (1999). Basis for recognition of cisplatin – modified DNA by high – mobility – group – proteins. *Nature*. Vol. 399. 708 – 712pp.
- 46.- Guthrie O., Li – Korotky H., Durrant J., Balaban C. (2008). Cisplatin induces cytoplasmic to nuclear translocation of nucleotide excision repair factors among spiral ganglion neurons. *Hear Res*. Vol. 239. 79 – 91pp.
- 47.- Brabec V., and Kasparkova J. (2005). Modifications of DNA by platinum complexes relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs. *Drug Resist Updat*. Vol. 8. 131 – 146pp.
- 48.- Malinge J., Giraud – Panis M., Leng M. (1999). Interstrand cross – links of cisplatin induce striking distortions in DNA. *J Inorg Biochem*. Vol. 77. 23 – 29pp.
- 49.- Aitken N., Smith S., Schwarz C., Morins P. (2004). Single nucleotide polymorphism (SNP) discovery in mammals: a targeted – gene approach. *Mol Ecol*. Vol. 13. 1423 – 1431pp.
- 50.- Chen H., Shao C., Shi H., Mu Y., Sai K., Chen Z. (2007). Single nucleotide polymorphisms and expression of ERCC1 and ERCC2 vis – à – vis chemotherapy drug cytotoxicity in human glioma. *J Neurooncol*. Vol 82. 257 – 262pp.
- 51.- Gu H., Modrek B., Stensland HMF., Saarela J., Pajukanta P., Kustanovich V., Peltonen L., Nelson SF., Lee C. (2002). Efficient discovery of single – nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Pharmacogenomics J*. Vol. 2. 236 – 242pp.
- 52.- Zhou W., Gurubhagavatula S., Liu G., Park S., Neuberg D., Wain J., Lynch T., Su L., Christiani D. (2004). Excision repair cross – complementation group 1 polymorphism predicts

overall survival in advanced non – small cell lung cancer patients treated with platinum – based chemotherapy. Clin Cancer Res. Vol. 10. 4939 – 4943pp.

53.- Krivak T., Darcy K., Tian Ch., Armstrong D., Baysal B., Gallion H., Ambrosone Ch., and DeLoia J. (2008). Relationship between ERCC1 polymorphisms, disease progression, and survival in the gynecologic oncology group phase III trial of intraperitoneal versus intravenous cisplatin and paclitaxel for stage III epithelial ovarian cancer. J. Clin Oncol. 26. 3598 – 3606.

54.- Moreno V., Gemignani F., Landi S., Gioia – Patricola L., Chabrier A., Blanco I., González S., Guino E., Capellà G., Canzian F., Bellvitge colorectal cancer study group. (2006). Polymorphisms in genes of nucleotide and base excision repair: risk and prognosis of colorectal cancer. Clin Cancer Res. Vol. 12. 2101 – 2108pp.

55.- Chen P., Wiencke J., Aldape K., Kesler – Diaz A., Miike R., Kelsey K., Lee M., Liu J. and Wrensh M. (2000). Association of an ERCC1 polymorphism with adult – onset adult. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 9. 843 – 847.

56.- Warnecke – Ebert U., Vallböhmer D., Alakus H, Kütting F., Lurje G., Bollschweiler E., Wienand – Dorweiler A., Drebber U., Hölscher A., Metzger R. (2009). ERCC1 and XRCC1 gene polymorphisms predict response to neoadjuvant radiochemotherapy in esophageal cancer. J Gastrointest Surg. Vol. 13. 1411 – 1421pp.

57.- Su D., Ma S., Liu P., Jiang Z., Lv W., Zhang Y., Deng Q., Smith S., Yu H. (2007). Genetic polymorphisms and treatment response in advanced non – small cell lung cancer. Lung Cancer. Vol. 56. 281 – 288pp.

58.- Yin M., Yan J., Martinez – Balibrea E., Graziano F., Lenz H., Kim H., Robert J., Im S., Wang W., Etienne – Grimaldi M., Wei Q. (2011). ERCC1 and ERCC2 polymorphisms predict clinical outcomes of oxaliplatin – based chemotherapies in gastric and colorectal cancer: a systemic review and meta – analysis. Clin Cancer Res. Vol. 17. 1632 – 1640pp.

- 59.- Usanova S., Piée – Staffa A., Sied U., Thomale J., Scheneider A., Kaina B., Köberle B. (2010). Cisplatin sensitivity of testis tumour cells is due to deficiency in interstrand – crosslink repair and low ERCC1 – XPF expression. *Mol Cancer*. Vol. 9. 1 – 11pp.
60. - Van Duin M., deWit J., Odijk H., et al. (1986). Molecular characterization of the human excision repair gene ERCC1: cDNA cloning and amino acid homology with the yeast DNA repair gene RAD10. *Cell*. Vol. 44. 913 – 23pp.
61. - Wood R. (1997). Nucleotide excision repair in mammalian cells. *J Biol Chem*. Vol. 272. 23465 – 23468pp.
62. - de Laat W., J G Nicolas., Hoeijmakers J., and Hoeijmaker J. (2007). Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev*. Vol. 13. 768 – 785pp.
63. - Petit C., Sancar A. (1999). Nucleotide excision repair: From E.coli to man. *Biochimie*. Vol. 81. 15 – 25pp.
64. - Reed E. (2005). ERCC1 and clinical resistance to platinum – based therapy. *Clin Cancer Res*. 11. 6100 – 6101.
65. - Osawa K. (2011). SNP's in ERCC1 and drug response to cisplatin in non – small – cell lung cancer patients. *Pharmacogenomics*. 12. 445 – 447.
66. - Crew K., Gammon M., Terry M., Zhang F., Zablotska L., Agrawal M., Shen J., Long C., Eng S., Sagiv S., Teitelbaum S., Neugut A and Santella R. (2007). Polymorphisms in nucleotide excision repair genes, polycyclic aromatic hydrocarbon - dna adducts, and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 16. 2033 – 2041.
- 67.- Cheng L., Guan Y., Li L., Legerski R., Einspahr J., Bangert J., Alberts D and Wei Q. (1999). Expression in normal human tissues of five nucleotide excision repair genes measured simultaneously by multiplex reverse transcription – polymerase chain reaction. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 8. 801 – 807.
- 68.- Sharova N. (2005). How does a cell repair damage DNA?. *Biochem*. 70. 275 – 291.

69.- Dabholkar M., Vionnet J., Bostick – Bruton F., Yu J. and Reed E. (1994). Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum – based chemotherapy. *J. Clin Invest.* 94. 703 – 708.

70.- Khrunin A., Moisseev A., Gorbunova V. and Limborska S. (2010). Genetic polymorphisms and the efficacy and toxicity of cisplatin – based chemotherapy in ovarian cancer patients. *Pharmacogenomics J.* 10. 54 – 61.

71.- Handra – Luca A., Hernandez J., Mountzios G., Taranchon E., Lacau – St – Guily J., Soria J. and Fouret P. (2007). Excision repair cross complementation group 1 immunohistochemical expression predicts objective response and cancer – specific survival in patients treated by cisplatin – based induction chemotherapy for locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 13. 3855 – 3858.

72.- Tse D., Zhai R., Zhou W., Heist R., Asomaning K., Su L., Lynch T., Wain J., Chritiani D. and Liu G. (2008). Polymorphisms of the NER pathway genes, *ercc1* and *xpd* are associated with esophageal adenocarcinoma risk. *Cancer Causes Control.* 19. 1077 – 1083.

73.- Kalikaki A., Kanaki M., Vassalou H., Souglakos J., Voutsina A., Georgoulas V. and Mavroudis D. (2009). DNA repair gene polymorphisms predict favorable clinical outcome in advanced non – small – cell lung cancer. *Clin Lung Cancer.* 10. 118 – 123.

74.- Cobo M., Isla D., Massuti B., Montes A., Sanchez J., Provencio M., Viñolas N., Paz – Ares L., Lopez – Vivanco G., Muñoz M., Felip E., Alberola V., Camps C., Domine M., Sanchez J., Sanchez – Ronco M., Danenberg K., Taron M., Gandara D. and Rosell R. (2007). Customizing cisplatin base on quantitative excision repair cross – complementation 1 mRNA expression: A phase III trial in non – small – cell lung cáncer. *J. Clin Oncol.* 25. 2747 – 2753.

75.- Boggs D., Winkelstein A. (1985). *El leucocito. El Mundial Moderno.* 74 – 120pp.

76.- Freshney I., (2000). *Culture of animal cells.* 4<sup>th</sup> ed. Wiley – Liss. USA

- 77.- Gallego F., Fleck O., Li A., Wyrzykowska J., Tinland B. (2000). AtRAD1, a plant homologue of human and yeast nucleotide excision repair endonucleases, is involved in dark repair of UV damages and recombination. *Plant J.* Vol. 21. 507 – 518pp.
- 78.- Vannier J., Depeiges A., White Ch., Gallego M. (2009). ERCC1/XPF protects short telomeres from homologous recombination in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* Vol.5. 1 – 11pp.
- 79.- Wood R., Burki H. (1982). Repair capability and the cellular age response for killing and mutation induction after UV. *Mut Res.* Vol. 95. 505 – 514pp.
- 80.- Setlow R., Carrier W. (1964). The disappearance of thymine dimers from DNA: an error – correcting mechanism. *Proc. A N S.* Vol. 51. 226 – 231pp.
- 81.- Pettijohn D., Hanawalt P. (1964). Evidence for repair – replication of ultraviolet damaged DNA in bacteria. *J Mol. Biol.* Vol. 9. 395 – 410pp.
- 82.- Reed E. (1998). Nucleotide excision repair and anti – cancer chemotherapy. *Cytotechnology.* Vol. 27. 187 – 201pp.
- 83.- Tripsianes K., Folkers G., Zheng Ch., Das D., Grinstead J., Kaptein R., Boelens R. (2007). Analysis of the XPA and ssDNA – binding surfaces on the central domain of human ERCC1 reveals evidence for subfunctionalization. *Nucleic Acids Res.* Vol. 35. 5789 – 5798pp.
- 84.- Boer J., Hoeijmakers J. (2000). Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis.* Vol. 21. 453 – 460pp.
- 85.- Tsodikov O., Ivanov D., Orelli B., Staresincic L., Shoshani I., Oberman R., Schärer O. Wagner G., Ellenberger T. (2007). Structural basis for the recruitment of ERCC1 – XPF to nucleotide excision repair complexes by XPA. *EMBO J.* Vol. 26. 4768 – 4776pp.

- 86.- Okuda K., Sasaki H., Hikosaka Y., Kawano O., Yukiue H., Yano M., Fujji Y. (2011). Excision repair cross complementation group 1 polymorphisms predict overall survival after platinum – based chemotherapy for completely resected non – small – cell lung cancer. *J Surg Res*. Vol. 168. 206 – 212pp.
- 87.- Fenech M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res*. Vol. 465. 81- 95pp. Review.
- 88.- Thomas P. and Fenech M. (2011). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay in lymphocytes. *Methods Mol Biol*. Vol. 682. 217 – 234pp.
- 89.- Fenech M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc*. Vol 2. 1084 – 1104pp.
- 90.- Kazimírová A., Barancoková M., Džupinková Z., Wsóllová L. and Dusinská M. (2009). Micronuclei and chromosomal aberrations, important markers of ageing: possible association with XPC and XPD polymorphisms. *Mutat Res*. Vol. 10. 35 – 40pp.
- 91.- Gillet L., Shäred O. (2006). Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chem. Rev*. 253 – 276pp.
- 92.- Yu J., Thornton K., Guo Y., Kotz H., Reed E. (2001). An ERCC1 splicing variant involving the 5´ UTR of the mRNA may have a transcriptional modulatory function. *Oncogene*. 7694 – 7698pp.
- 93.- Shen M., Jones I., Mohrenweiser H. (1998). Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res*. 604 – 608pp.

- 94.- Sturgis EM., Dahlstrom KR., Spitz MR, Wei Q. (2002). DNA repair gene ERCC1 and ERCC2/XPD polymorphisms and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1084 – 1088pp.
- 95.- Parker RJ., Eastman A., Bostick – Bruton F., Reed E. (1991). Acquired cisplatin resistance in human ovarian cancer cells is associated with enhanced repair of cisplatin-DNA lesions and reduced drug accumulation. J Clin Invest. 771 – 777pp.
- 96.- Suk R., Gurubhagavatula S, Park S., Zhou W., Su L., Lynch T., Wain J., Neuberger D., Liu G., Christiani G. (2005). Polymorphisms in ERCC1 and grade 3 or 4 toxicity in non – small cell lung cancer patients. Clin Cancer Res. Vol 11. 1534 – 1538pp.
- 97.- Longley DB., Johnston PG. (2005). Molecular mechanisms of drug resistance. J Pathol. Vol 205. 275 – 292pp.
- 98.- Woelfelschneider A., Popanda O, Lilla C., Linseisen J., Mayer C., Celebi O., Debus J., Bartsch H., Chang-Claude J., Schmezer P. (2008). A distinct ERCC1 haplotype is associated with mRNA expression levels in prostate cancer patients. Carcinogenesis. Vol. 29. 1758 – 1764pp.
- 99.- Dabholkar M., Bostick – Bruton F., Weber C., Eqwuaqu C., Bohr BA., Reed E. (1993). Expression of excision repair genes in non – malignant bone marrow from cancer patients. Mutat Res. Vol. 293. 151 – 160pp.
- 100.- Mendoza J., Hernández C., Martínez J., Pérez – Montiel D., Castro C., Fabián – Morales E., Santibáñez M., González – Barrios R., Soto – Reyes E., Díaz – Chávez J., Andonegui M., Oñate L., Jiménez M., Núñez M., Dyer R., Herrera L. (2012). The association between ERCC1 and XPA expression and polymorphisms and the clinical response to cisplatin in patients with non-seminomatous testicular germ cell tumors. (en revisión).
- 101.- Van Duin M., Koken M., Van den Tol J., Dijke P., Odijk H., Westerveld A., Bootsma T., Hoeijmakers J. (1987). Genomic characterization of the human DNA excision repair gene ERCC1. Nucleic Acids Res. 15: (22). 9195 – 9213.

- 102.- Olive P., Banáth J. (2009). Kinetics of H2AX phosphorylation after exposure to cisplatin. *Cytometry B. Clin Cytom.* 76 (2). 79 – 90pp.
- 103.- Sorenso CM., Eastman A. (1988) Mechanism of cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced cytotoxicity: role of G2 arrest and DNA double-strand breaks. *Cancer Res.* 48 (16). 4484 – 4488pp.
- 104.- Quintela – Fandino M:, Hitt R., Medina PP:, Gamarra S., Manso L., Cortes – Fuentes H., Sánchez – Cespedes M. (2006). DNA-repair gene polymorphisms predict favorable clinical outcome among patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck treated with cisplatin-based induction chemotherapy. *J. Clin Oncol.* 24(26): 4333 – 4339pp.
- 105.- Bewick M. Lafrenie R. Conlon M. (2011). Nucleotide excision repair polymorphisms and survival outcome for patients with metastatic breast cancer. *J. Cancer Res Clin Oncol.* Vol. 137: 543 – 550pp.
- 106.- Zhou W., Liv G., Park S. et al. (2005). Gene smoking interaction association for the ERCC1 polymorphisms in the risk of lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* Vol. 14. 491 – 496pp.
- 107.- Tse D., Zhai R., Zhou W., Heist R., Asomaning K., Su L., Lunch T., Wain J. Christian D. and Liu G. (2008). Polymorphisms of the NER pathway genes, ERCC1 and XPD are associated with esophageal adenocarcinoma risk. *Cancer Causes Control.* 19 (10). 1077 – 1083pp.
- 108.- Mckean – Cowdin R., Barnholtz – Sloan J., Inskip P., Ruder A., Butter M., Rajaraman P., Razavi P., Patoka J., Wiencke J., Bandy M and Wrensch M. (2009). Association between polymorphisms in DNA repair genes and glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 18 (4) 1118 – 1126pp.
- 109.- Quintela-Fandino M, Hitt R, Medina PP, Gamarra S, Manso L, Cortes-Funes H, Sanchez-Cespedes M. (2006). DNA-repair gene polymorphisms predict favorable clinical

outcome among patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck treated with cisplatin-based induction chemotherapy. *J Clin Oncol*. Vol. 24. 4333 – 4339pp.

110.- Van den Heuvel S. (2005). Cell – cycle regulation. *WormBook*. 1 – 16pp.

111.- Hernandez C. (2007). El papel de XPA, ERCC1 y mtTFA en la supervivencia de pacientes con tumores germinales de testículo tratados con cisplatino. Tesis de Posgrado. México, D. F., Instituto Nacional de Cancerología - Facultad de Medicina, UNAM.

112.- Chen H, Shau C., Chen F., Kwan A., Chen Z. (2010). Role of ERCC1 promotor hypermethylation in drug resistance. *Int J Cancer*. Vol. 126. 1994 – 1954pp.

113.- Tsodikov O., Enzlin J., Schärer O., Ellenberger T. (2005). Crystal structure and DNA binding functions of ERCC1a subunit of the DNA structure specific endonuclease XPF – ERCC1. *PNAS*. Vol 102. 11236 – 11241pp.

114.- Rechkunova N., Krasikova Y., Lavrik O. (2011). Nucleotide excision repair: DNA damage recognition and preincision complex assembly. *Biochemistry*. Vol. 76. 24 – 35pp.

115.- Niedernhofer L., Odijk H., Budzowska M., Drunen E., Maas A., Theil A., Wit J., Jaspers N., Beverloo H., Hoeijmakers J., Kanaar R. (2004). The structure – specific endonuclease Ercc1 – Xpf is required to resolve DNA interstrand cross – link – induced double – strand breaks. *Mol Cell Biol*. Vol 24. 5776 – 5787pp.