



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Análisis del Papel de XPA y ERCC1 en la
Respuesta al Tratamiento con Cisplatino en
Tumores de Células Germinales de
Testículo No Seminomas

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

JULIA ROSALINDA MENDOZA PÉREZ

TUTOR PRINCIPAL:

DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. ILEANA PATRICIA CANTO CETINA
FACULTAD DE MEDICINA

DR. LUIS BENÍTEZ BRIBIESCA
FACULTAD DE MEDICINA

MÉXICO, D.F. AGOSTO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Contenido

| | |
|---|----|
| Agradecimientos | 5 |
| Resumen | 7 |
| Abstract | 8 |
| ANTECEDENTES | 9 |
| EPIDEMIOLOGÍA | 9 |
| Incidencia | 9 |
| Etiología | 9 |
| PATOLOGÍA | 10 |
| Seminomas | 10 |
| No seminoma | 11 |
| MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y EVALUACIÓN DEL PACIENTE: DIAGNÓSTICO, ESTADIO CLINICO Y GRUPO PRONÓSTICO | 11 |
| Presentación Clínica | 11 |
| Diagnóstico y estadio clínico | 12 |
| Marcadores Tumorales | 13 |
| Grupo Pronóstico | 14 |
| MANEJO CLÍNICO Y TRATAMIENTO | 16 |
| MECANISMO DE ACCIÓN DEL CISPLATINO | 17 |
| Maquinaria de Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER) | 22 |
| Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's) | 26 |
| RELEVANCIA E IMPACTO | 28 |
| HIPÓTESIS | 28 |
| OBJETIVOS | 28 |
| Principal | 28 |
| Específicos | 28 |
| METODOLOGÍA | 30 |

| | |
|---|----|
| Determinar la expresión y el efecto de <i>ERCC1</i> y <i>XPA</i> en líneas celulares de cáncer sensibles y no-sensibles al tratamiento con cisplatino | 30 |
| Identificar la activación de la maquinaria de reparación inducida por el daño al DNA ocasionado por el tratamiento con cisplatino | 31 |
| Analizar la expresión de <i>ERCC1</i> y <i>XPA</i> en pacientes con TCGT no seminomas vírgenes al tratamiento con quimioterapia basada en cisplatino en población mexicana y población peruana | 32 |
| Genotipificación de los polimorfismos 8092C>A de <i>ERCC1</i> y 5'UTR de <i>XPA</i> en individuos mexicanos aparentemente sanos y en pacientes con TCGT no seminomas tratados con quimioterapia basada en cisplatino | 36 |
| Determinar la presencia de la proteína ERCC1 en pacientes con TCGT no seminomas tratados con quimioterapia basada en cisplatino | 39 |
| Análisis Estadístico | 40 |
| Definición de las variables | 41 |
| RESULTADOS | 46 |
| Expresión de <i>ERCC1</i> y <i>XPA</i> en líneas celulares de cáncer sensibles y no-sensibles al tratamiento con cisplatino | 46 |
| Activación de la maquinaria de reparación inducida por el daño al DNA ocasionado por el tratamiento con cisplatino | 49 |
| Expresión de <i>ERCC1</i> y <i>XPA</i> en pacientes con TCGT no seminomas vírgenes al tratamiento con quimioterapia basada en cisplatino en población mexicana y población peruana | 51 |
| Genotipificación de los polimorfismos 8092C>A de <i>ERCC1</i> y 5'UTR de <i>XPA</i> en individuos mexicanos aparentemente sanos y en pacientes con TCGT no seminomas tratados con quimioterapia basada en cisplatino. | 53 |
| ERCC1 en pacientes con TCGT no seminomas tratados con quimioterapia basada en cisplatino | 59 |
| DISCUSIÓN | 68 |
| PROTOCOLOS | 71 |
| Inmunohistoquímica | 71 |
| Viabilidad Celular | 72 |
| Extracción de RNA a partir de líneas celulares | 72 |
| Electroforesis de RNA | 73 |
| Síntesis de cDNA | 74 |
| Extracción de RNA y DNA a partir de muestras frescas de tumor | 75 |

| | |
|---|----|
| Extracción de DNA a partir de sangre periférica | 76 |
| Extracción de DNA a partir de muestras de tejido tumoral embebidas en bloques de parafina | 77 |
| Ensayo de Fosforilación de H2A. X | 78 |
| REFERENCIAS | 80 |

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, número 83959) y el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT, número IN213311).

Al Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto en el laboratorio de Carcinogénesis de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología- Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Por llegar a ser más que un tutor, un amigo durante estos años, por sus consejos y apoyo durante mi formación.

A los distinguidos miembros de mi comité tutorial el Dr. Luis Benítez Bribiesca y la Dra. Ileana Patricia Canto Cetina por sus comentarios siempre certeros y su apoyo siempre constante.

A mí amada familia Eduardo, Julia y Sandra por mantenerse a mi lado en este camino, por demostrarme su amor y apoyo incondicional en todo momento, por ayudarme a tener constancia y siempre creer en mí para poder cumplir este sueño; esta tesis es un logro más y es para ustedes.

A mis compañeros de vida, Fabiola, Sergio y Amanda por mantenerse a mi lado y darle alegría, sonrisas y locuras a mi vida.

A todos los miembros de la Familia Mendoza y la Familia Pérez por su amor y por ser el sostén de mi vida.

A mis chicas y amigos Pamela, Alejandra, Claudia, Rodrigo, José Luis, Jonathan, por permanecer en mi vida, y darme la oportunidad de crecer juntos como familia, y por haber estado en esta etapa tan importante. A ustedes amigos que más o menos me han acompañado en este camino, pero que me han apoyado y aguantado en mis crisis e histerias siempre dándome tranquilidad y sensatez, Rubén, Cynthia, Fede, Miriam, Mariana, Val y Rebeca, gracias por compartir.

A mis compañeros del día a día en el laboratorio, con los cuales he compartido más que largas jornadas de trabajo, gracias amigos por su constante compañerismo y amistad. A ti Clemen, por formar parte importante de este proyecto y siempre estar dispuesta a ayudarme en todo momento y en toda circunstancia.

A toda la parte clínica que participó siempre dispuestos en este gran proyecto, sin su apoyo y el trabajo en equipo no hubiera sido posible realizar esta tesis, les agradezco su disposición y entusiasmo Dr. Miguel Ángel Jiménez Ríos, Dr. Jorge Martínez Cedillo, Dra. Ma. Delia Pérez-Montiel; a Carlitos y Tavares gracias por su amistad y por su esfuerzo constante.

Resumen

Antecedentes: El cáncer de testículo representa el 1% de todos los cánceres en el hombre. El 90% corresponden a tumores de células germinales (TCGTs) clasificándose en seminomas (TCGT-s) y no seminomas (TCGT-ns). Con el tratamiento estándar basado en cisplatino, el 80% de los pacientes son curados. Deficiencias en los mecanismos de reparación del DNA (ERCC1 y XPA) modifica la sensibilidad. **Objetivo:** Analizar la asociación entre ERCC1 y XPA y sus polimorfismos (SNPs) con la respuesta al cisplatino y la sobrevida de pacientes con TCGT-ns tratados con cisplatino. **Metodología:** Los niveles de *ERCC1* y *XPA* se analizaron con qPCR, la presencia de la gammaH2AX se identificó con citometría de flujo en líneas celulares de cáncer sensible y no-sensibles. La expresión de *ERCC1* y *XPA* fue analizada por qPCR en muestras de TCGT-ns de población Mexicana y Peruana. La genotipificación de los SNPs se realizó por PCR-RFLPs; la proteína ERCC1 se determinó por inmunohistoquímica. **Resultados:** Se encontró un incremento en *ERCC1* en las líneas celulares no-sensibles a cisplatino, no así en la expresión de *XPA*; la expresión de *ERCC1* y la presencia de la gammaH2AX aumentaron después del tratamiento con cisplatino en las líneas celulares no-sensibles. *ERCC1* se encontró incrementado en los pacientes no-sensibles en ambas poblaciones (Mexicana $p < 0.001$ y peruana $p = 0.002$), no se encontraron cambios en *XPA*. Los SNPs no se asociaron con la sobrevida ni con la respuesta al cisplatino. La presencia de ERCC1 se observó en 30/108 pacientes. De los 76 pacientes que fueron sensibles a cisplatino 77.6% fueron ERCC1-negativos ($p = 0.05$). Utilizando el modelo de Cox, el riesgo de muerte de los pacientes con ERCC1-negativos y no sensibles fue >14.43 que el de los pacientes ERCC1-positivos y no sensibles ($p < 0.001$). **Conclusiones:** Los niveles incrementados de *ERCC1*, así como la presencia de la proteína, se encontraron asociados con la no sensibilidad a cisplatino; sugiriendo el uso de ERCC1 como un potencial indicador de la respuesta al tratamiento con cisplatino y el pronóstico de los pacientes con TCGT-ns.

Abstract

Background: Cisplatin cures over 80% of testicular germ cell tumours (TGCTs), and nucleotide-excision repair (NER) modifies the sensitivity to cisplatin. We explored the association between NER-proteins and their polymorphisms with cisplatin sensitivity (CPS) and overall survival (OS) of patients with non-seminomatous (ns)-TGCTs. **Methods:** The expression of *ERCC1* and *XPA* and the presence of γ H2AX were evaluated in cancer cell lines and in fresh ns-TGCTs. The *ERCC1* protein was also determined in ns-TGCTs. The differences between CPS and non-CPS cell lines and patients were analysed by Student's t or χ^2 tests. The differences in OS were analysed using the log-rank test, and the hazard ratios (HR) were calculated using the Cox model. **Results:** High *ERCC1* expression was observed in the non-CPS cells, and both *ERCC1* and γ H2AX expression were augmented after cisplatin treatment. Increased *ERCC1* expression was also identified in non-CPS patients. Neither polymorphism was associated with either CPS or OS. The presence of *ERCC1* was associated with non-CPS ($p=0.05$) and adjusted in the prognosis groups. The HR in *ERCC1*-negative and non-CPS patients was >14.43 , and in *ERCC1*-positive and non-CPS patients, the HR was >11.86 ($p<0.001$). **Conclusions:** High levels of *ERCC1* were associated with non-CPS, suggesting that *ERCC1* could be used as a potential indicator of the response to cisplatin and prognosis in ns-TGCTs.

ANTECEDENTES

EPIDEMIOLOGÍA

Incidencia

El cáncer de testículo representa el 1% de todos los cánceres en el hombre, siendo el tumor sólido más común en varones entre 15-34 años de edad. Aproximadamente el 90% de los tumores malignos de testículo corresponden a tumores de células germinales (TCGTs), un término que indica su origen en células germinales primordiales (CGPs) ¹. Menos del 10% de estos TCGTs pueden encontrarse de forma ocasional en sitios extragonadales en la línea media del cuerpo; este patrón de distribución se debe a la ruta de migración de las CGPs durante la embriogénesis (del saco vitelino hasta llegar a los primordios de las gónadas) ².

La incidencia varía mucho dependiendo de factores geográficos y raciales, en Europa del norte, es casi dos veces mayor que en América del norte, Australia y Reino Unido ³; por razones que aún se desconocen, las menores tasas de incidencia se presentan en Japón, Tailandia y España. México y Perú poseen una incidencia de 8.8/100,000 y 5.3/100,000 hombres respectivamente ⁴.

Durante los pasados 40 años se ha observado un incremento en la incidencia de los TCGTs, sin embargo, a pesar de este incremento, la mortalidad es menor del 10% y la tasa de curación se ha incrementado hasta un 95% ^{5,6}; Jemal *et al* estimó que de 8,480 hombres que fueron diagnosticados con TCGTs en E.U.A. de los cuales sólo 350 fallecieron por la enfermedad ⁷.

Etiología

La investigación acerca de las causas de los TCGTs han guiado a la hipótesis que postula que el desarrollo de ésta enfermedad comienza durante la vida fetal y consiste en una diferenciación anormal de las CGPs. Se sabe, que tanto factores genéticos como factores ambientales son elementos importantes para el desarrollo de TCGTs ⁸. Sin embargo, la etiología del cáncer de testículo aún se desconoce; la criptorquidia (ausencia del descenso de los testículos al escroto, deteniéndose en el conducto inguinal) es el único factor de riesgo confirmado para el desarrollo de TCGTs, se encuentra presente en el 10% de los casos y la incidencia es 2.5-11 veces mayor, de un 5-20% de los pacientes con historia de criptorquidia desarrollan cáncer; el riesgo de desarrollar cáncer se reduce, si se lleva a cabo la orquidopexia antes de la pubertad ^{9,10}. Se conocen otros

factores en los cuales la evidencia es sugestiva, pero no concluyente, tales como la elevada exposición a estrógenos (dietilestilbestrol-DES) *in útero* (incrementa 2 veces la incidencia), la cual se encuentra asociada con criptorquidia. La historia familiar previa de cáncer de testículo es el factor de riesgo más fuerte, hijos y hermanos de pacientes con TCGTs poseen de 4-6 veces y de 8-10 veces más riesgo a presentar un TCGT respectivamente ¹¹.

Se ha encontrado una aberración estructural cromosómica consistente en los TCGTs, la cual es una amplificación de la secuencia 12p, más comúnmente como isocromosoma, este i(12p) se ha observado en las etapas tempranas de *carcinoma in situ*, sugiriendo que pueda ser un cambio genético inicial asociado con el origen de los TCGTs. Se encuentra presente en más del 90% de los casos. Los genes que se localizan en esta región, se sabe, están involucrados en la carcinogénesis de este tipo de tumores, siendo de los más importantes: c-Ki-Ras-2, ciclina D2, SOX5 Y JAW1 ¹².

Finalmente, se han relacionado síndromes genéticos con la incidencia de TCGT, pacientes con síndrome de Klinefelter (47XXY) tienen una mayor incidencia de un TCGT, particularmente tumores germinales primarios extragonadales en mediastino. Pacientes con síndrome de Down (trisomía del cromosoma 21) también poseen un incremento en el riesgo. Se ha reportado una mayor incidencia en pacientes con síndrome Müllleriano (pseudo hermafroditismo masculino), síndrome de insensibilidad a andrógenos (feminización testicular) y disgenesia gonadal mixta ¹³.

PATOLOGÍA

Todos los TCGTs progresan a través de un estadio no-invasivo denominado *carcinoma in situ* o *neoplasia intratubular de células germinales* (ICGN por sus siglas en inglés). Usualmente el carcinoma in situ llega a ser un TCGT invasivo en un periodo promedio de aproximadamente cinco años ¹⁴. Los TCGT se clasifican en dos grandes grupos: seminomas y no seminomas.

Seminomas

Representan el 40% de todos los TCGTs y son más frecuentes en la cuarta década de la vida; pueden ser células con una alta tasa mitótica (células anaplásicas), o células gigantes sinciotrofoblásticas con niveles séricos elevados de la fracción beta de la hormona gonadotropina coriónica humana (Fβ hGCH)¹⁵. El componente seminomatoso se encuentra presente en el 20% de los TCGT mixtos.

No seminoma

Representan cerca del 60% de todos los TCGTs y frecuentemente aparecen en la tercera década de la vida. Según la organización mundial de la salud (WHO por sus siglas en inglés), estos tumores pueden encontrarse puros (mostrando un solo tipo celular) o bien, mixtos (mostrando más de un elemento histológico). Los diversos elementos histológicos son: carcinoma embrionario, coriocarcinoma, carcinoma del saco vitelino (tumor de senos endodérmicos) y teratoma. Carcinoma embrionario es el tipo celular más indiferenciado con totipotencialidad de diferenciarse en otro tipo celular no seminomatoso, este produce elevadas concentraciones de alfa feto proteína (AFP) y niveles normales de F β hGCH. El coriocarcinoma es el componente menos común, representa el elemento patológico más agresivo de los TCGTs en adultos. Consiste en células del sinsitotrofoblasto y citotrofoblasto; la diseminación hematogena de las metástasis puede ocurrir tempranamente en el curso de la enfermedad. En estos pacientes se han reportado elevados niveles séricos de F β hGCH, con niveles normales de AFP. Los tumores de senos endodérmicos mimetizan la histología embrionaria del saco vitelino con elevadas concentraciones de AFP y niveles normales de F β hGCH; estos tumores, son los más comunes en niños y jóvenes, el elemento puro es raro en adultos, sin embargo, este componente histológico se encuentra presente en el 40% de los TCGT mixtos. Finalmente, los teratomas no secretan F β hGCH ni AFP, está compuesto por diversos tipos celulares somáticos provenientes de dos o más capas germinales (ectodermo, mesodermo o endodermo); en pacientes con enfermedad residual post quimioterapia, el teratoma se encuentra en aproximadamente el 45% de los especímenes resecaados ^{1,9}.

Los TCGT no seminomas (ns) son más agresivos que los TCGT-s, frecuentemente los elementos de ambos se encuentran presentes o la concentración de AFP es elevada y los tumores deben de ser tratados como no seminomas ¹.

MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y EVALUACIÓN DEL PACIENTE: DIAGNÓSTICO, ESTADIO CLINICO Y GRUPO PRONÓSTICO

Presentación Clínica

El cuadro clínico se caracteriza principalmente por un incremento de volumen testicular (73%), dolor testicular (30%), ginecomastia, dolor lumbar (10%), infertilidad (5%). Sin embargo, el rápido crecimiento y progresión de los TCGTs causa metástasis tempranas en nódulos linfáticos y/o

metástasis a distancia, debutando con enfermedad metastásica cerca de un 25% de los pacientes con seminoma y más del 60% de los pacientes con no seminoma^{16,17}.

Aquellos pacientes con una sugestiva masa testicular, anormales hallazgos ultrasonográficos o ambos, deben someterse a una orquiectomía inguinal radical, la cual es el procedimiento definitivo que permite la evaluación histológica de un tumor primario y provee el control local del tumor. La biopsia de una sugestiva lesión testicular no es recomendada, así como la orquiectomía transescrotal se encuentra contraindicada, puesto que se han asociado con recurrencia local y diseminación a los nódulos linfáticos inguinales¹⁸.

Diagnóstico y estadio clínico

El diagnóstico se realiza con el reporte histopatológico (TCGT-s y TCGT-ns) y los niveles de marcadores tumorales: deshidrogenasa láctica (DHL), AFP y F β hGCH. El primer paso después de la confirmación histológica es determinar la magnitud de la enfermedad (estadificación) para que pueda llevarse a cabo la terapia apropiada. Existen varios sistemas de estadificación, los más utilizados son el sistema del Hospital Royal Marsden (tabla 1) y el TNM (Tumor, Ganglios y Metástasis) por el Comité Americano de Cáncer. El tratamiento dependerá si se considera enfermedad temprana (estadio I) o avanzada (estadios II-IV). Sin embargo, el tratamiento inicial para todos los TCGTs es la orquiectomía inguinal radical¹⁸.

| Estadio | Características |
|---------|---|
| I | Limitado a testículo Sin evidencia de metástasis |
| II | Metástasis en Retroperitoneo |
| III | Metástasis en ganglios mediastinales, supraclaviculares, axilares |
| IV | Metástasis Viscerales (SNC, Pulmón, Hígado, Hueso) |

Tabla 1. Sistema de Estadificación Peckham de Tumores de Células Germinales de Testículo (Hospital Royal Marsden)

Marcadores Tumorales

Los marcadores tumorales (MT) séricos se han convertido en factores pronósticos que contribuyen al diagnóstico y estadificación de la enfermedad, para el monitoreo de la respuesta terapéutica y en la detección de la recurrencia tumoral. Globalmente, se ha observado un incremento en los marcadores tumorales (Fβ hGCH, AFP y DHL) en un 51% de los casos con cáncer de testículo ¹⁹.

Hormona Gonadotropina Coriónica Humana (hGCH). Es una glucoproteína con peso molecular de 45KDa producida por las células del sincitiotrofoblasto de la placenta y normalmente se eleva sólo durante el embarazo. El consumo de marihuana puede elevar los niveles, resultando en falsos positivos. La vida media es de 18 a 36 horas. Consiste de dos subunidades: α y β, siendo la subunidad beta de la hGCH sea la fracción medible; los niveles séricos normales en una persona no embarazada son por debajo de 1ng/ml, también se reporta en UI/ml; 1ng es equivalente a 5UI.

Concentraciones séricas de la fracción β hGCH por arriba de 10,000 mUI/ml se ha visto exclusivamente en TCGT gonadales y extragonadales, siendo altamente específica: se eleva en alrededor del 70% de los TCGT-ns, principalmente en coriocarcinoma y entre el 10-20% de TCGT-s²⁰.

Alfa feto proteína (AFP). Es una glucoproteína oncofetal con un peso molecular de 70KDa. Se produce durante la vida fetal en el saco vitelino, hígado y aparato gastrointestinal. Su pico máximo se alcanza a las 13 semanas del desarrollo embrionario y los niveles son indetectables al momento del nacimiento. Su vida media sérica es de entre 4-5 días. Se producen elevaciones fisiológicas durante el embarazo con niveles normales de 2-9ng/ml. También puede haber niveles elevados en otras patologías, como es en el caso de disfunción hepática, hepatitis, cirrosis y abuso de alcohol y drogas. Su secreción es restringida a TCGT-ns (específicamente en senos endodérmicos) el 70% poseen una elevación de AFP; concentraciones arriba de 10,000 ng/ml son exclusivas de TCGT y carcinoma hepatocelular. En TCGT-s es indetectable²⁰.

Deshidrogenasa Láctica (DHL). Este tercer marcador tumoral es menos específico, sin embargo, refleja la “carga tumoral”, tasa de crecimiento y proliferación celular del tumor. Pertenece a una familia de 5 isoenzimas, siendo la isoenzima 1 la más específica y sensible para TCGTs que las otras cuatro isoenzimas (2-5). Los niveles de DHL se incrementan en 30-80% de los TCGT-s y en el 60% de los TCGT-ns. La DHL no es un indicador sensible o específico de recurrencia de la enfermedad, es por eso que no es marcador sérico útil en el seguimiento post-tratamiento²⁰.

Grupo Pronóstico

Los TCGTs son altamente curables en contraste con la mayoría de los tumores sólidos. Aproximadamente más del 90% de los pacientes con diagnóstico inicial de TCGT son curados y cerca del 80% sobreviven a 5 años inclusive con enfermedad metastásica. Los seminomas (todos los estadios combinados) poseen una tasa de curación cercana al 90%, en el caso de los pacientes con enfermedad temprana la cura se aproxima al 100%. Para pacientes con tumores no seminomas, la tasa de curación es mayor al 95% en estadio I y alrededor del 70% con quimioterapia estándar y resección de enfermedad residual, si es necesario, en estadios II-IV⁹.

Al observar que un 85-90% de los pacientes con enfermedad avanzada responden al tratamiento con quimioterapia, fue necesario estadificar a este grupo de pacientes de acuerdo con la

posibilidad de tener un tratamiento exitoso y curarse; para esto se tomaron en cuenta variables pronósticas independientes tales como: histología, localización primaria del tumor, sitios de metástasis y concentraciones séricas de los MT. En 1997 se determinaron los factores pronósticos en estadios avanzados (II-IV) clasificándose como buen pronóstico, pronóstico intermedio y pobre pronóstico ^{21,22}.

| | Localización del Tumor | Metástasis | Marcadores Tumorales Post-Orquiectomía | Sobrevida |
|------------------------------|--------------------------|--|---|--|
| Buen Pronóstico | Primario Testículo/RP | Sin metástasis pulmonares o viscerales | AFP < 1,000 ng/ml Fβ hGCH < 5,000 IU/ml (1,000 ng/ml) DHL < 1.5x arriba del límite normal | 56% TCGNS SVLE 5 años 89% SV 5 años 92% |
| | Cualquier sitio primario | Sin metástasis pulmonares o viscerales | Niveles normales AFP, Fβ hGCH y DHL | 90% TCGS SVLE 5 años 82% SV a 5 años 86% |
| Pronóstico Intermedio | Primario Testículo/RP | Sin metástasis pulmonares o viscerales | AFP ≥ 1,000 y ≤ 10,000 ng/ml Fβ hGCH ≥ 5,000 y ≤ 50,000 IU/ml DHL ≥ 1.5xN y ≤ 10xN | 28% TCGNS SVLE 5 años 75% SV 5 años 80% |
| | Cualquier sitio | Viscerales, no | Niveles normales AFP, Fβ | 10% TCGS |

| | | | | |
|--|----------------------|---------------------------|---|---|
| | primario | pulmonares | hGCH y DHL | SVLE 5 años 67% SV 5 años 72% |
| Pobre Pronóstico | Tumor Mediastinal | Viscerales, pulmonares | no AFP>10,000ng/ml Fβ hGCH >50,000IU/ml DHL>10xarriba del límite normal | 16% TCGNS SVLE a 5 años 41% SV a 5 años 48% |
| No existen pacientes clasificados de pobre pronóstico para TGS | | | | |

Tabla 2. Clasificación pronóstica del Grupo Colaborativo Internacional de Tumores de Células Germinales (IGCCCG) de los tumores de células germinales de testículo metastásicos ²¹.

MANEJO CLÍNICO Y TRATAMIENTO

El cáncer de testículo es curable, inclusive en presencia de enfermedad avanzada o metastásica; si el cáncer progresa o recurre a pesar de la primera línea de tratamiento, estos pacientes son candidatos a terapia de rescate. La terapia inicial es seleccionada de acuerdo al estadio clínico, grupo pronóstico y la histología. El tratamiento en la enfermedad avanzada o metastásica es la quimioterapia, excepto en TCGT-s estadios IIA-B en donde la radioterapia continúa teniendo un papel importante. En el tratamiento de cáncer de testículo son utilizados 3 agentes que dañan el DNA como estándar de oro, utilizando en el esquema de tratamiento: bleomicina, etopósido y cisplatino (BEP). Antes del tratamiento con quimioterapia, el pronóstico de los pacientes era reservado y a partir de 1970 con la introducción del cisplatino, específicamente en combinación con vincristina y bleomicina (PVB) la supervivencia a un año se incrementó al 95% y a 5 años entre 80-90%. En 1987 se comparó PVB versus BEP demostrándose un mejor perfil de toxicidad y supervivencia con BEP por lo que desde entonces se considera la terapia estándar en pacientes con enfermedad avanzada. Sin embargo, a pesar del éxito obtenido con el cisplatino, existe

aproximadamente un 20-30% de pacientes con enfermedad avanzada que no son curados. Las neoplasias malignas secundarias son la causa más frecuente de muerte en aquellos pacientes que son curados de cáncer de testículo; el riesgo de desarrollar un segundo primario en el testículo contralateral es de 1-2%, el tratamiento con etopósido puede incrementar el riesgo de desarrollar leucemia secundaria ²³. Los pacientes que no obtienen respuesta completa con la primera línea de quimioterapia (BEP), utilizan segundas líneas de tratamiento con respuestas globales del 23% ²⁴⁻²⁷.

MECANISMO DE ACCIÓN DEL CISPLATINO

Hablando del primer fármaco anticancerígeno metálico; el cis-diaminodicloplatino(II) -cis-[PtCl₂(NH₃)₂]- es uno de los más potentes y efectivos agentes antitumorales descubierto en el último siglo casualmente por Barnett Rosenberg. Llegó a las pruebas clínicas y fue aprobado por la agencia de alimentos y medicamentos (FDA por sus siglas en inglés) en los 70's ²⁸ para el tratamiento de cáncer testicular, mostrando resultados alentadores; así mismo, ha demostrado efectividad en una gran variedad de tumores sólidos, particularmente, ovario, vejiga y cáncer de cabeza y cuello. Se ha confirmado, que solo aquellos compuestos que poseen una geometría en *cis* son capaces de bloquear el crecimiento celular; el cisplatino exhibe una gran actividad antitumoral, mientras que su isómero *trans* no muestra dicha actividad. Existen diversos derivados del cisplatino que también pueden inhibir la proliferación, muchos de los compuestos platinados mayormente conocidos tienen como fórmula general *cis*-[PtX₂(NHR₂)₂] en donde R=fragmento orgánico y X=grupos salientes. A pesar del éxito del cisplatino, este fármaco, carece de selectividad por el tejido tumoral, lo que conlleva a severos efectos adversos, los cuales incluye falla renal, neurotoxicidad y ototoxicidad (pérdida de balance/audición) el daño ocasionado, es parcialmente reversible cuando el tratamiento es suspendido. En respuesta a estos problemas, versiones modificadas del cisplatino han sido desarrolladas, en los últimos 30 años se han sintetizado segundas y terceras generaciones de fármacos basados en platino los cuales se han sometido a ensayos clínicos, sin embargo, algunos de estos compuestos no han demostrado tener ventajas significativas sobre el cisplatino (Figura 1). La segunda generación de fármacos análogos, poseen una equivalente efectividad clínica, pero con menor toxicidad que el cisplatino; el primer análogo conocido fue el carboplatino, [Pt(C₆H₆O₄)(NH₃)₂] al poseer menores efectos adversos que el cisplatino se puede administrar en altas dosis. El carboplatino es utilizado más en el tratamiento

de cáncer de ovario, mientras que el oxaliplatino se sabe, es más efectivo en el tratamiento de cáncer de colon. El carboplatino fue introducido en la práctica clínica en 1981, en el 2002, el oxaliplatino también fue aprobado para su uso clínico como agente para quimioterapia ²⁸.

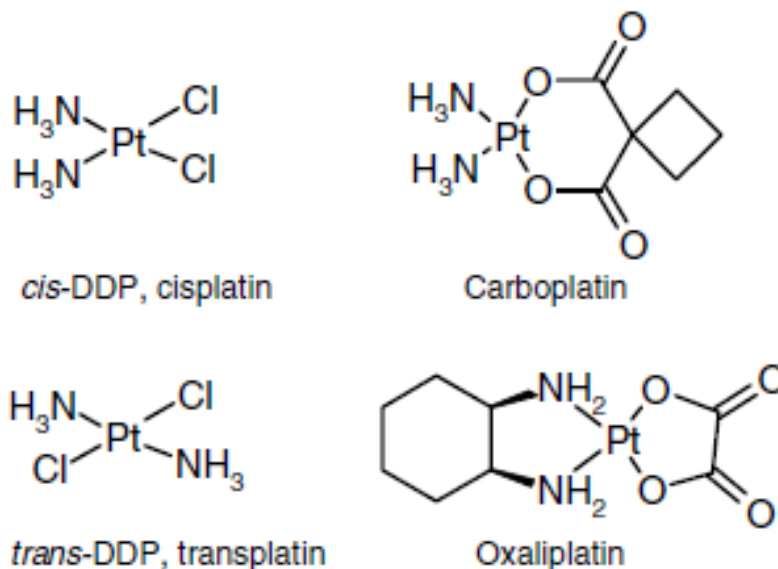


Figura 1. Estructura química del cis-platino, trans-platino, carboplatino y oxaliplatino ²⁹.

Se desconoce el mecanismo de acción del cisplatino, sin embargo, se supone, muestra su efecto citotóxico mediante la unión covalente con las bases púricas del DNA. Los aductos formados entre el cisplatino y el DNA ocasionan torsión de la doble hebra del DNA y por consiguiente rompimientos de doble cadena (DSB por sus siglas en inglés); la torsión del DNA es causada por el hecho de que los ángulos de unión de la molécula de cisplatino son relativamente rígidos, comparados con los de la doble hélice de DNA.

Es cisplatino, es usualmente administrado vía intravenosa, más que oralmente, debido a sus problemas de solubilidad. Una vez en el torrente sanguíneo, el cisplatino difunde a través de la membrana celular en el citoplasma. En soluciones acuosas los cloro “grupos salientes” del cis-diaminodicloplatino (II) se encuentran propensos a sustitución mono y diacuosa, particularmente a concentraciones intracelulares de cloro menores a 100mM. En el torrente sanguíneo, las

concentraciones de cloro son altas (~100mM) y por lo tanto el cisplatino se encuentra inactivo. Sin embargo, cuando el cisplatino entra a la célula, la concentración de cloro es mucho menor (~ 4 mM) lo cual favorece la hidrólisis de uno de los sustituyentes de cloro, éste ligando es reemplazado por una molécula de agua, formando un complejo cargado positivo, si se lleva a cabo una segunda hidrólisis, se sustituye el otro ligando de cloro por una segunda molécula de agua, quedando cargado 2+. Debido a que el agua es más fácil que se libere que el cloro, estas especies reactivas pueden reaccionar con una gran cantidad de nucleófilos, como puede ser el DNA, RNA, proteínas y tioles celulares. Al quedar el cisplatino cargado con 2+ requiere de 2e- para completar su octeto, el cual consigue, al unirse con el nitrógeno de la purina, el cual posee 2e- libres, los cuales comparte con el cisplatino, formando así una unión covalente coordinada entre ellos ²⁹(Figura 2).

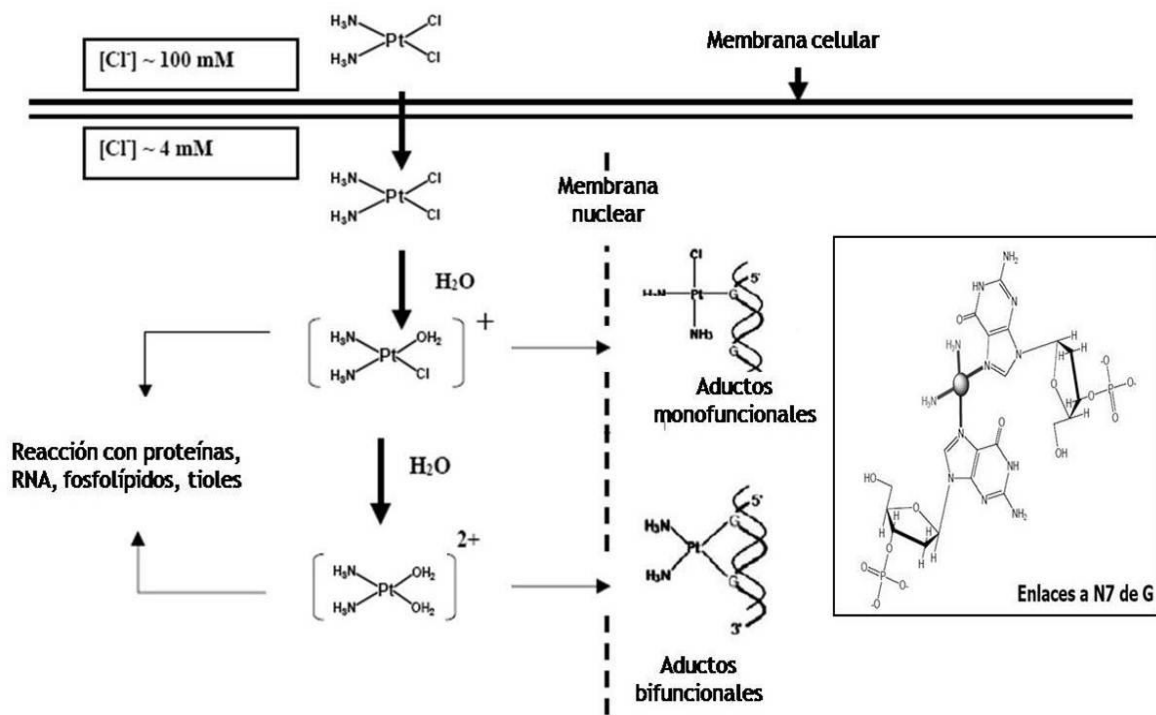


Figura 2. Mecanismo de acción propuesto del cisplatino ²⁹.

Debido a que el platino pertenece al grupo B de los metales, este ion reacciona preferencialmente con los átomos de N más que con los átomos de O. Las cuatro posiciones de la purina pueden ser platinadas, pero preferencialmente se une en el átomo N7 de la guanina, por el cual muestra una fuerte cinética preferencial. Esta tendencia resulta en la fuerte basicidad en esta posición, así como la accesibilidad de los protones de las aminas del complejo del platino para unirse por medio de puentes de hidrógenos con el O6 de la guanina y adenina, formando así una gran variedad de aductos mono y bifuncionales; mostrando así su efecto citotóxico, los aductos bifuncionales que predominantemente se forman con el DNA son las uniones intracatenarias: d(GpG)Pt (47-50%), d(ApG)Pt (23-28%) y d(GpNpG)Pt (8-10%). El cisplatino también puede formar uniones intercatenarias entre guaninas localizadas en hebras opuestas del DNA siendo estas uniones 2-3% de los aductos formados entre el cisplatino y el DNA (estos aductos también pueden contribuir al efecto citotóxico del fármaco debido al impedimento que esto ocasiona en los procesos celulares que requieren de la separación de las dos hebras de DNA, como es el caso de la replicación y la transcripción (Figura 3)³⁰. La distorsionada estructura platinada de DNA, también sirve como un sitio de reconocimiento para ciertas proteínas celulares, como son las enzimas de reparación, factores de transcripción, histonas y proteínas con dominios-HMG (grupo de alta movilidad, por sus siglas en inglés)^{31,32}. A pesar de que aún existe cierta controversia sobre si las uniones intra- o intercatenarias son las lesiones críticas responsables de la toxicidad del cisplatino³⁰, se ha propuesto que el daño provocado por el cisplatino ocasiona un arresto en el ciclo celular en la fase G2 antes de que la célula dispare un mecanismo bioquímico y morfológico característico conocido como apoptosis^{33,34}.

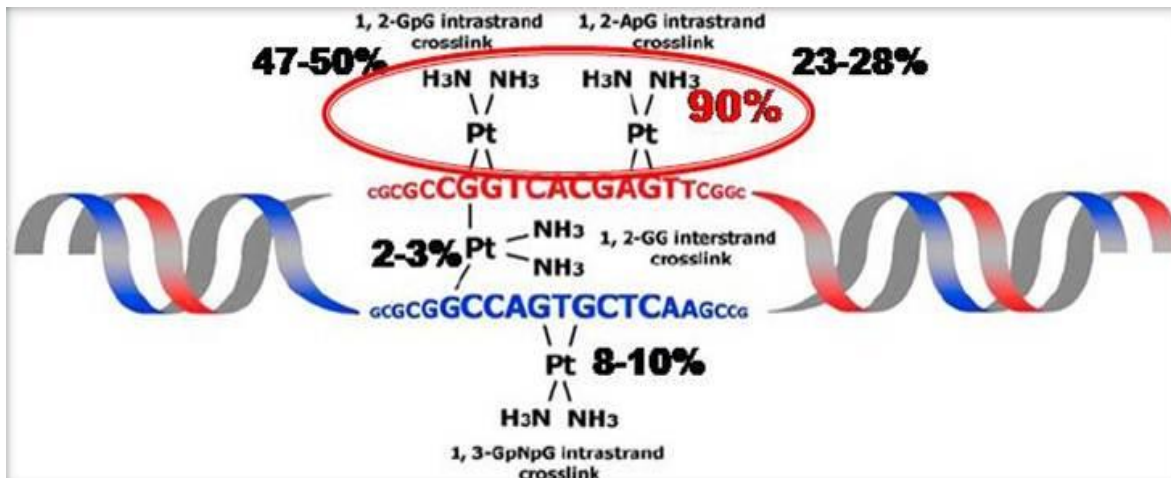


Figura 3. Aductos intracatenarios e intercatenarios formados por el cisplatino en la doble hebra del DNA.

Diversos procesos pueden influir en la respuesta de las células cancerosas a los agentes quimioterapéuticos, siendo la resistencia la mayor limitación del tratamiento exitoso de los tumores sólidos; la resistencia al cisplatino puede ser intrínseca (como se observa en pacientes con cáncer colorectal, pulmón o próstata) o adquirida (a menudo se observa en pacientes con cáncer de ovario)³⁵. El mecanismo de resistencia a cisplatino, ha sido estudiado en diversos tipos celulares y parece ser de origen multifactorial; se ha demostrado, que las células de cáncer pueden desarrollar resistencia al cisplatino a través de cambios en (1) transporte del fármaco, reduciendo la acumulación intracelular del cisplatino, (2) incremento del sistema de detoxificación del fármaco por tioles celulares, elevando los niveles intracelulares de glutatión y/o metalotioneinas, (3) cambios en la reparación del DNA, incremento en la reparación por escisión de nucleótidos, (4) incremento en la tolerancia del daño al DNA ocasionado por el cisplatino y finalmente (5) cambios en las vías de muerte celular por apoptosis.³⁶⁻³⁸(Figura 4). A pesar del progreso en la identificación de proteínas específicas que se encuentran involucradas en la resistencia o sensibilidad al cisplatino, no se han encontrado diferencias entre los TCGT y otras células cancerosas en términos de alteración en el transporte de membrana³⁹, tasa de mutación⁴⁰ o habilidad en detoxificación del fármaco^{41,42} que pudieran ser relevantes en la respuesta clínica. Se han observado niveles elevados de p53 en TCGT los cuales pueden activar la respuesta apoptótica en respuesta al DNA dañado, sin embargo, no se ha encontrado una sobreexpresión uniforme y mutaciones en p53 que correlacionen con resistencia al cisplatino⁴³. Esto combinado

con la habilidad de las células de TCGT para reparar el daño a través de los mecanismos de reparación del DNA, pueden contribuir a la inigualable sensibilidad de estos tumores⁴⁴.

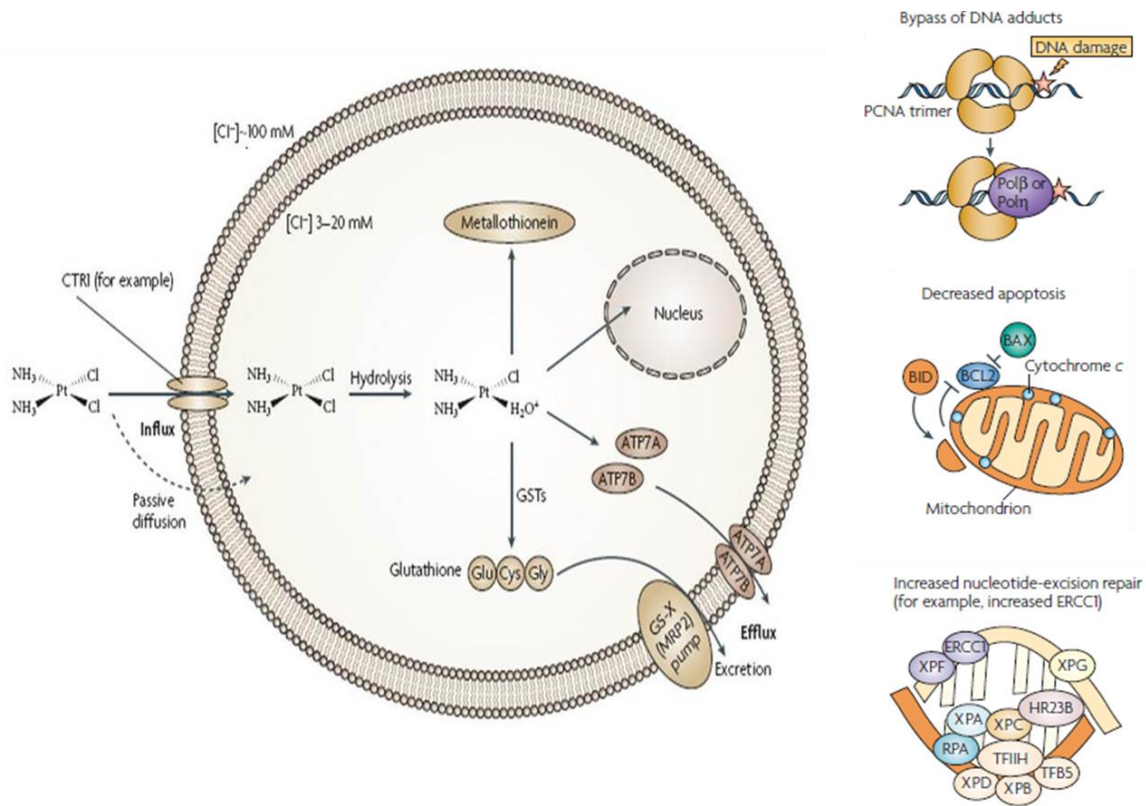


Figura 4. Mecanismos de resistencia del cisplatino⁴⁵.

Existe evidencia que sugiere que líneas celulares derivadas de tumores que son inusualmente sensibles al cisplatino, como son los TCGT, poseen deficiencias en su habilidad para reparar el daño ocasionado por los aductos de DNA-cisplatino⁴⁶. La reparación de los aductos de DNA-cisplatino se lleva a cabo predominantemente por la reparación por escisión de nucleótidos (NER); sin embargo, las bases moleculares que expliquen el incremento en la actividad de reparación observada en células resistentes al cisplatino se desconoce⁴⁷.

Maquinaria de Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER)

La maquinaria NER es la que se encarga de la reparación de los aductos que forma el cisplatino con el DNA, esta vía de reparación, está constituida por múltiples pasos, los cuales incluyen un paso de reconocimiento del DNA dañado, la escisión del daño y finalmente la polimerización y ligación de

la cadena de DNA. NER reconoce y remueve el daño en dos modelos: a través de todo el genoma (reparación del genoma global, GGR) o de forma selectiva durante la transcripción (reparación acoplada a la transcripción, TCR). Estas dos sub-vías utilizan muchos factores comunes pero difieren en el paso de reconocimiento del DNA dañado, en la GGR, el daño es reconocido por la proteína xeroderma pigmentosa, grupo de complementación C (XPC)-RAD23-centrina, el complejo CETN2 y UV-DDB; una vez que el complejo se une al DNA dañado, RAD23 se disocia de XPC y no participa en el proceso NER. El desenrollamiento del DNA alrededor de la lesión, estabilizar el DNA de cadena sencilla requiere del factor de transcripción II H (TFIIH) un complejo de proteínas con actividad de helicasas 3'→5' y 5'→3' (XPB y XPD respectivamente); juntas con XPA, la proteína de replicación A (RPA), XPB y XPD estabilizan el DNA dañado para su incisión. RPA activa a XPG y ERCC1-XPF, endonucleasas específicas que cortan en el extremo 3' y 5' de un fragmento de 24-32 nucleótidos que contiene el DNA dañado. Una vez extraído el daño, se lleva a cabo la polimerización del DNA mediante la polimerasa delta y épsilon, su actividad de polimerasa es estimulada y coordinada por el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). El fragmento de DNA naciente es finalmente sellado por la ligasa de DNA 1 y III-XRCC1.

En la otra vía NER, TCR, el reconocimiento del daño requiere de la RNA polimerasa II (RNAPII), la cual colocaliza con las proteínas del síndrome de cockayne A y B (CSA y CSB). CSB se une a la RNAPII estancada y activa el ensamblaje de los factores NER y a la histona acetiltransferasa p300; en cambio, CSA recluta (junto con CSB) a la proteína de unión nucleosomal del grupo de alta movilidad con dominio de unión al nucleosoma 1 (HMGN1), a la proteína de unión a XPA (XAB2) y TFIIIS. Una vez que la cromatina se encuentra accesible para la TCT, la lesión es removida por el núcleo de la reacción NER (Fig 5) ⁴⁸.

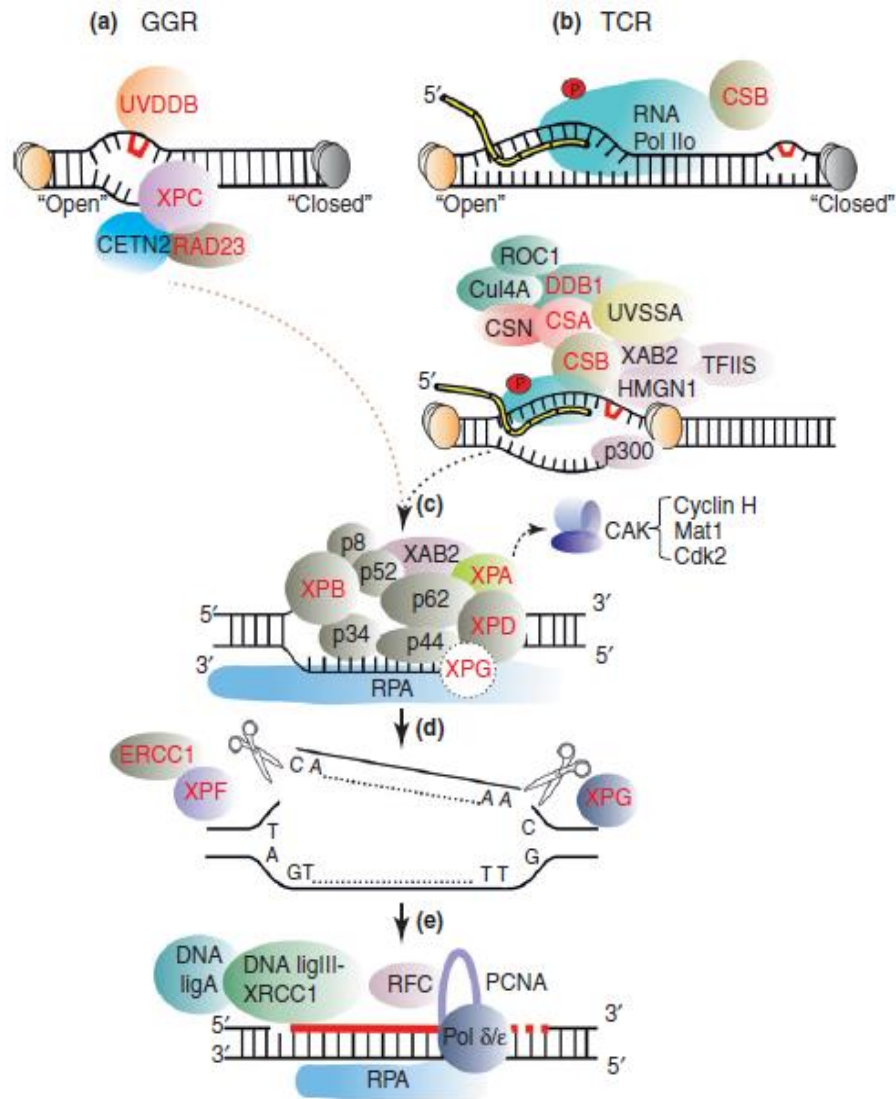


Figura 5. Vía de reparación por escisión de nucleótidos (NER). Reparación del genoma global-GGR (a) y Reparación acoplada a la transcripción-TCR (b) ⁴⁹.

Dabholkar y col., demostraron que los niveles de expresión de los genes ERCC1 y XPA es mayor en tejido maligno de pacientes con cáncer de ovario resistentes a la quimioterapia basada en cisplatino que aquellos que si respondieron al tratamiento ⁵⁰. Por otro lado, a través de ensayos *in vitro* Ferry y col., observaron una elevada actividad en la escisión de los aductos de DNA-cisplatino (principalmente el complejo protéico ERCC1/XPF) en líneas celulares de cáncer de ovario ⁵¹, estos estudios pudieran constituir evidencia que impliquen la expresión de ERCC1 y XPA en el

incremento de NER y en la resistencia a cisplatino. En estudios realizados en el 2003 en líneas celulares de cáncer de ovario y de pulmón, se comprobó que la inhibición de la actividad de reparación de DNA (particularmente NER) disminuye la resistencia al cisplatino, ellos inhibieron la expresión de ERCC1 y XPA respectivamente en las dos líneas celulares antes mencionadas por medio de antisentido y observaron una sensibilización de la líneas celulares resistente a cisplatino^{52,53}. En estudios más recientes se correlacionó la expresión de ERCC1 por medio de Inmunohistoquímica en pacientes con cáncer de pulmón con la respuesta a la quimioterapia basada en cisplatino; este grupo de investigación observó una relación directa entre aquellos pacientes negativos a la proteína ERCC1 con una mayor respuesta a la quimioterapia, comparados con aquellos pacientes que resultaron positivos⁵⁴.

En trabajos anteriores, sugieren que ERCC1 y XPAC trabajan de manera conjunta en el reconocimiento y escisión del daño en el DNA y por lo tanto han sido de utilidad para el estudio del papel de estas proteínas en la reparación de tumores resistentes a la quimioterapia basada en platino. Con el fin de estudiar y analizar el efecto de estas proteínas en la sensibilidad al tratamiento con cisplatino, se han llevado a cabo estudios en tumores que son hipersensibles a este tratamiento, este es el caso de los tumores de testículo, los cuales poseen una menor capacidad en remover el daño al DNA ocasionado por el cisplatino^{46,55} sin embargo, son pocos los estudios que se han realizados en tumores germinales.

Köberle y colaboradores analizaron a las proteínas involucradas en la maquinaria de reparación por NER en cultivos celulares de TCGT, ellos demostraron que solamente las proteínas XPA y el complejo ERCC1/XPF se encuentran consistentemente disminuidas en un 25% comparado con otras líneas celulares, siendo la proteína XPA la que presenta un mayor efecto en la reparación de los aductos de cisplatino en el DNA en las líneas celulares de cáncer de testículo; los autores concluyen que los niveles de estas proteínas no son suficientes para remover las uniones covalentes del cisplatino con el DNA y podría ser una razón que explique una mayor sensibilidad al cisplatino en cáncer testicular de origen germinal⁵⁶. En estudios posteriores realizados en el 2004, se observó que tanto la proteína XPA como el complejo ERCC1-XPF se encuentran disminuidos en comparación con diversas líneas celulares de cáncer de próstata, vejiga, mama, pulmón, ovario y cervicouterino. Estos resultados muestran que la disminución de éstas proteínas en líneas

celulares de cáncer de testículo podrían ser una explicación suficiente para la disminución en la capacidad de reparación por NER en este tipo de neoplasias, lo cual es un factor determinante en la sensibilidad a fármacos como el cisplatino ⁵⁷.

Por otro lado, en un estudio realizado en muestras de pacientes con TCGT se demostró que la expresión de XPA por medio de Inmunohistoquímica es diferencial en los tipos histológicos, encontrando una mayor tinción en los subtipos histológicos con un fenotipo más diferenciado (teratomas). No encontraron diferencias en la presencia de XPA entre las muestras de pacientes que fueron sensibles o resistentes a la quimioterapia, tampoco encontraron correlación entre los niveles de la proteína XPA por western blot en líneas celulares de cáncer de testículo sensibles y resistentes a cisplatino; concluyendo así, que la proteína XPA no juega un papel importante en la respuesta al tratamiento de los tumores germinales ⁵⁸. En estudios recientes, se analizó la expresión de ERCC1 y XPF en muestras de tumores germinales, demostrando que los tumores no seminomas se caracterizan por tener una elevada expresión de las proteínas ERCC1 y XPF comparándola con los tumores seminomas y con el tejido de testículo normal adyacente ⁵⁹.

Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's)

Se han encontrado polimorfismos en genes involucrados en la reparación del DNA, los cuales están asociados tanto a susceptibilidad al cáncer, como a la supervivencia de pacientes tratados con quimioterapia basada en cisplatino. El efecto molecular y funcional de estos polimorfismos no han sido completamente elucidados, sin embargo, algunas de las variantes alélicas se pudieran relacionar con la estabilidad del RNAm ^{60,61} que pudiera afectar la disminución de la proteína y por consiguiente una disminución en la maquinaria de Reparación por Escisión de Nucleótidos que se vea reflejada en una mayor sensibilidad de los TCGT.

El gen ERCC1 se encuentra localizado en el cromosoma 19q13.2-q13.3, existen diversos polimorfismos encontrados en este gen y varios de ellos resultan en mutaciones silenciosas donde no se observan cambios en los aminoácidos que interfieran con la función de la proteína. Uno de los polimorfismos más estudiados es el polimorfismo 8092C>A, este genera una transversion de citosina: adenina en la posición 8092 del extremo 3' terminal, en la región no codificante. Estudios realizados en pacientes con cáncer de pulmón, tratados con quimioterapia basada en cisplatino,

en los cuales se analizó el polimorfismo 8092C>A del gen ERCC1, demostraron que los pacientes que poseen el alelo A se encuentran asociados con un pobre pronóstico, contrario a lo que sucede con los individuos que poseen el genotipo C/C, quienes presentan una mayor supervivencia ⁶².

Por otro lado, XPA es un gen que se encuentra localizado en el cromosoma 9q22.32. Un trabajo de investigación, que analizó el efecto del polimorfismo en la región 5' no codificante (A→G) de XPA en mujeres con cáncer de ovario, demostró que aquellas pacientes que poseen el polimorfismo tienen una menor supervivencia y el tiempo de recurrencia es menor que aquellas pacientes que no poseen la variante ⁶³.

El entender los procesos o determinantes moleculares implicados en la respuesta exitosa a la quimioterapia basada en cisplatino de los TCGT puede proveer nuevas estrategias para disminuir la toxicidad, mejorar la calidad de vida de los pacientes e incrementar la sensibilidad de otros tumores sólidos.

RELEVANCIA E IMPACTO

Los resultados potenciales de este proyecto nos ayudarán a conocer más los mecanismos por los cuales las células de los tumores germinales de testículo (TCGT) no seminomas son sensibles al tratamiento con cisplatino, caracterizando en particular la participación de *ERCC1* y *XPA*, así como los polimorfismos 8092C>A de *ERCC1* y 5' UTR de *XPA*.

Además del conocimiento que se generará acerca de los mecanismos moleculares implicados en este fenómeno, los resultados podrán facilitar la predicción de la respuesta clínica a la quimioterapia basada en cisplatino y el pronóstico de pacientes diagnosticados con TCGT no seminomas.

HIPÓTESIS

La quimiosensibilidad de los TCGT no seminomas se asocia a una disminución en la expresión de *ERCC1* y *XPA*. Así mismo, los pacientes con los polimorfismos 8092C→A del gen *ERCC1* y 5'UTR de *XPA* se asociarán a un peor pronóstico y una menor sensibilidad al tratamiento con quimioterapia basado en cisplatino.

OBJETIVOS

Principal

Determinar si la expresión de *ERCC1* y *XPA* y los polimorfismos 8092C>A del gen *ERCC1* y 5'UTR de *XPA* se asocian con el pronóstico y la respuesta a la quimioterapia basada en cisplatino en pacientes diagnosticados con TCGT no seminomas.

Específicos

1.- Determinar la expresión y el efecto de *ERCC1* y *XPA* en líneas celulares de cáncer sensibles y no sensibles al tratamiento con cisplatino.

2.- Identificar la activación de la maquinaria de reparación inducida por el daño al DNA ocasionado por el tratamiento con cisplatino.

3.- Analizar la expresión de *ERCC1* y *XPA* en pacientes con TCGT no seminomas vírgenes al tratamiento con quimioterapia basada en cisplatino en población mexicana y población peruana.

4.- Genotipificar los polimorfismos 8092C>A de *ERCC1* y 5'UTR de *XPA* en individuos mexicanos aparentemente sanos y en pacientes con TCGT no seminomas tratados con quimioterapia basada en cisplatino.

5.- Determinar la presencia de la proteína ERCC1 en pacientes con TCGT no seminomas tratados con quimioterapia basada en cisplatino.

METODOLOGÍA

Determinar la expresión y el efecto de *ERCC1* y *XPA* en líneas celulares de cáncer sensibles y no-sensibles al tratamiento con cisplatino

Líneas celulares: Se utilizaron líneas celulares derivadas de TCGT (NT2/D1) sensibles a cisplatino, líneas celulares derivadas de cáncer de vejiga (1A6 y T-24) y una línea celular derivada de cáncer cervico-uterino (HeLa), estas últimas con resistencia primaria a cisplatino.

Para los estudios *in vitro* se seleccionaron estas líneas celulares, dado que se buscaba estudiar el fenómeno de resistencia primaria o intrínseca al cisplatino y no encontramos líneas celulares de cáncer de testículo resistentes a cisplatino. Estas líneas celulares fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% Suero Fetal Bovino y 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina); se mantuvieron a 37°C en una atmósfera con 5%CO₂. Todas las líneas celulares utilizadas fueron probadas y autenticadas.

Para el tratamiento con cisplatino (Tecnoplatin, Columbia Lab., México), se determinó el IC₅₀ del fármaco a 24h de tratamiento para cada una de las líneas celulares siguiendo el protocolo de viabilidad celular con cristal violeta. Se sembraron 80,000 células con medio fresco en placas de 24 pozos, las células fueron incubadas durante toda la noche a 37°C. Las células se expusieron durante 1 h a diferentes concentraciones de cisplatino, posteriormente las células fueron lavadas con PBS 1x e incubadas en medio fresco durante 24 h. Las células fueron fijadas durante 20min con etanol 70% a -20°C, lavadas con PBS 1X y teñidas con 1% de cristal violeta. La tinción fue solubilizada en ácido acético al 33% y se determinó la absorbancia en un lector de ELISA a 570 nm. El análisis se llevó a cabo por triplicado e cuatro experimentos independientes, los valores de IC₅₀ fueron calculados utilizando el análisis de regresión lineal de los datos.

Una vez determinado el IC₅₀, las líneas celulares fueron incubadas con cisplatino durante 1, 15, 18 y 21h a 37°C en una atmósfera húmeda.

Para determinar la expresión basal de *ERCC1* y *XPA* se aisló RNA siguiendo el protocolo del Kit de extracción de RNA de Quiagen a partir de las líneas celulares sensibles NT2/D1 y no-sensibles a cisplatino 1A6, T-24 y HeLa; para subsecuentemente sintetizar cDNA. El cDNA generado fue

utilizado como templado para realizar la reacción de PCR semicuantitativo, con la ayuda de los siguientes oligos: *ERCC1* 5'-CCT GGG AAT TTG GCG ACG-3' (sentido) y 5'-GCG GAG GCT GAG GAA CAG-3' (antisentido); *XPA* 5'-GCA CCA CTG TAC CCC AGG-3' (sentido) y 5'-TAG TTC CCC ACT GTT TCC ACC-3' (antisentido). Las condiciones utilizadas para el PCR fueron un ciclo de 2 m a 94°C; seguido de 27 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 65°C, y 30 s a 72°C, finalizando con un ciclo de 5 m a 72°C.

Se realizaron 3 experimentos independientes por triplicado y el análisis de la densitometría se hizo con el programa ImageJ 1.43u (Wayne Rasband National Institute of Health, U.S.A) tomando como gen constitutivo el *ribosomal 18s* 5'-F GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT-3' (sentido) y 5'-CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG-3' (antisentido).

Para analizar el efecto del tratamiento con cisplatino en la expresión de *ERCC1*, se realizó un curso temporal de tratamiento con cisplatino en las líneas celulares sensibles y no-sensibles a cisplatino. Se extrajo RNA a 1, 15, 18 y 21h de tratamiento con cisplatino. Los niveles de expresión de *ERCC1* durante el tiempo de tratamiento en la línea celular sensible y las no-sensibles a cisplatino fueron analizados por PCR en Tiempo Real utilizando los oligos previamente descritos. Las condiciones que se emplearon fueron un ciclo de 2 m a 94°C, seguido de 40 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 65°C y 30 s a 72°C, finalizando con un ciclo de 5 m a 72°C. Los datos fueron analizados utilizando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Identificar la activación de la maquinaria de reparación inducida por el daño al DNA ocasionado por el tratamiento con cisplatino

Para determinar la adecuada activación de la maquinaria de reparación inducida por el tratamiento con cisplatino se analizó la expresión de la histona γ H2AX en las líneas celulares sensibles y no-sensibles tratadas con cisplatino durante 1, 15, 18 y 21h. La γ H2AX reconoce rompimientos de doble cadena (DSB) inducidos con el tiempo por el tratamiento con cisplatino. Esta variante de la histona H2A sufre fosforilaciones específicas en la serina 139 seguida del daño al DNA (γ H2AX).

Las líneas celulares sensible y no-sensibles fueron cultivadas en cajas petri de 100 mm a una densidad de 1×10^6 e incubadas durante 24 h a 37°C y 5%CO₂. Estos cultivos fueron tratados con el

IC₅₀ de cisplatino respectivo para cada línea celular durante 1h e incubados en medio completo durante 15, 18 y 21h.

Las células fueron lavadas con PBS 1X y fijadas con formaldehído al 2% durante 20 m en hielo para posteriormente permeabilizar e incubar con el anticuerpo anti-fosfo-histona H2AX (Ser139) durante 20 m en hielo (siguiendo el manual del Kit Millipore, 17-344). Las muestras se lavaron con PBS 1X y fueron leídas en el citómetro de flujo BD FACSCanto II. Se utilizó el software FACSDiva versión 6.1.3 (Becton-Dickinson Company, San José, CA) para el análisis de los datos.

Analizar la expresión de *ERCC1* y *XPA* en pacientes con TCGT no seminomas vírgenes al tratamiento con quimioterapia basada en cisplatino en población mexicana y población peruana

Fue un estudio de cohorte, longitudinal y observacional, en el cual la población de estudio fueron pacientes diagnosticados con TCGT no seminomas que cumplieron con los criterios de inclusión.

Criterios de inclusión

- Pacientes diagnosticados con TCGT no seminomas puros o mixtos.
- Estadios II y III de la clasificación Royal Marsden.
- Vírgenes al tratamiento con quimioterapia.
- Candidatos a recibir quimioterapia con BEP
- Mayores de 15 años y menores de 60 años.
- Karnofsky ≥ 70 y/o ECOG ≤ 2 .
- Contar con historia clínica completa.
- Firma del consentimiento informado para tomar a muestra fresca de tumor durante la orquiectomía radical.

Criterios de exclusión

- Pacientes diagnosticados con TCGT seminomas puros.
- Pacientes con tumores de células germinales extragonadales.
- Pacientes que hayan recibido otro esquema de quimioterapia distinto a BEP, como primera línea de tratamiento.

Criterios de eliminación

- Pacientes que sus expedientes no contengan información completa, como: edad, reporte de patología del tumor primario, día, mes y año de diagnóstico; día, mes y año de la última cita, sitios de metástasis, niveles de los marcadores tumorales alfa feto proteína, fracción beta de la hormona gonadotropina coriónica y deshidrogenasa láctica antes, durante y al término de la quimioterapia con BEP, respuesta a la quimioterapia con BEP, grupo pronóstico, estadio clínico. Día, mes y año de inicio y término de quimioterapia con BEP, fecha de recurrencia y reporte de patología de la pieza quirúrgica resecada.
- Retiro del consentimiento informado.

Obtención de muestras frescas de tumor

Las muestras frescas de tumor se tomaron durante la orquiectomía radical con la ayuda de un cirujano y un patólogo quirúrgico oncólogo que determinó que la muestra de aproximadamente 0.5 cm que se obtuviera, fuera en su mayoría neoplasia (evitando así, las zonas de necrosis, fibrosis y testículo normal); si el tumor era menor a 2 cm no se realizó toma de muestra para el protocolo. Se colectaron 4 piezas de 0.5 cm como máximo en un tubo de 5 ml con RNA later para evitar la degradación de los ácidos nucleicos. El tiempo máximo que se dejó transcurrir entre la orquiectomía y la toma de muestra para el estudio fue de 30 min para evitar la degradación del material. Una vez que se obtuvo la muestra, se llevó al laboratorio para guardarse a 4°C y después almacenarse a -20°C. Las muestras fueron colectadas durante el periodo de Enero del 2006 a Diciembre del 2010. Se obtuvieron muestras frescas de tumor de pacientes mexicanos diagnosticados en el Instituto Nacional de Cancerología de México (INCan). Así mismo, las muestras tumorales de individuos peruanos se obtuvieron del Banco de Tumores, perteneciente al Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas de Perú (INEN).

Tamaño de muestra

Se realizó un estudio exploratorio para analizar la expresión de *ERCC1* y *XPA* en muestras frescas de pacientes diagnosticados con TCGT-ns de dos poblaciones diferentes. Bajo el supuesto de que

el 20% de las muestras expresan *ERCC1* y *XPA*, el tamaño de la muestra calculado fue de 22 pacientes, con un intervalo de confianza del 95% y un error estándar del 15%.

En el INCan, 142 pacientes fueron diagnosticados con TCGT, de los cuales 35 pacientes cumplieron con nuestros criterios de inclusión. En la población peruana, 82 pacientes fueron diagnosticados con TCGT en el INEN y 24 pacientes cumplieron los criterios. A partir de las muestras frescas capturadas, se llevó a cabo la extracción de RNA con el kit de purificación de Quiagen All prep DNA/RNA (no. Cat 80204) siguiendo las especificaciones del manual.

Se obtuvo cDNA a partir de 1ug de RNA obtenido mediante una transcripción reversa (RT) para el posterior análisis de expresión de *ERCC1* y *XPA* mediante la técnica de PCR en Tiempo Real utilizando los oligos específicos previamente descritos para su amplificación.

Los niveles de expresión de *ERCC1* y *XPA* fueron analizados por PCR en Tiempo Real. Para la reacción de PCR se utilizaron 300ng de cDNA, 0.8mM de dNTPs, 0.5 μ M de cada primer, 2.51 μ l de buffer 10X (Invitrogen), 2mM de MgCl₂, 0.25 unidades de DNA polimerasa Taq Platinum (cat. 10966-030 Invitrogen) y H₂O MQ estéril para completar un volumen de 25 μ l. La reacción se llevó a cabo en un termociclador PCR Sprint thermal Cycler de Thermo. Las condiciones que se emplearon fueron un ciclo de 2 m a 94°C, seguido de 40 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 65°C y 30 s a 72°C, finalizando con un ciclo de 5 m a 72°C. Los datos fueron analizados utilizando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Los datos obtenidos del PCR en Tiempo Real se utilizaron en la siguiente ecuación: Cantidad del blanco = $2^{-\Delta\Delta CT}$. Se utilizó el promedio de ΔCT de un paciente sensible a la terapia (BEP) como calibrador para cada gen de interés. Los datos se presentaron como promedio \pm desviación estándar (D.E.); se realizaron 3 experimentos independientes por triplicado. La evaluación estadística de las diferencias entre los pacientes sensibles y no sensibles se realizó mediante la prueba T-Student para muestras pequeñas. Diferencias de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativas.

Todos los pacientes que se incluyeron en este estudio, no tuvieron ningún beneficio directo por su participación; estos pacientes recibieron el manejo considerado estándar para TCGT indicado por el oncólogo médico. Con ayuda del oncólogo médico se estadificaron los pacientes según la

clasificación Royal Marsden para TCGT y se agruparon en grupos pronóstico según el Grupo Colaborativo Internacional de Tumores de Células Germinales (IGCCCG) en función a el sitio primario del tumor, las metastásis y los niveles de los marcadores tumorales (MT) alfa feto proteína (AFP), fracción beta de la hormona gonadotropina coriónica humana (FBhGCH) y deshidrogenasa láctica (DHL). Los pacientes fueron tratados de acuerdo a las guías internacionales de tratamiento (de forma homogénea), con quimioterapia a base de bleomicina, etopósido y cisplatino (BEP) con las siguientes dosis, 30 IU de bleomicina los días 2, 3 y 4; 100 mg/m²/día de etopósido durante 5 días y 20 mg/m²/día de cisplatino durante 5 días por ciclo; dependiendo del estadio clínico y el grupo pronóstico se les administraron 3 o 4 ciclos de BEP; los ciclos se dieron cada 21 días. A estos pacientes que se incluyeron en el estudio, tuvieron un seguimiento mensual durante el curso del tratamiento con BEP, con medición de MT (Fβ hGCH, AFP y DHL) y estudios radiológicos, para evaluar la respuesta del mismo.

Para el análisis de estas muestras, los pacientes se dividieron en dos grupos dependiendo de la respuesta clínica a la quimioterapia estándar con BEP:

Sensibles. Aquellos pacientes que mostraron respuesta radiológica completa sin evidencia de lesiones residuales y respuesta bioquímica (negativización de MT) o bien, si mostraron negativización de MT y resección quirúrgica completa de las lesiones residuales y el resultado histopatológico fue necrosis, fibrosis o teratoma maduro.

No-sensibles: Aquellos pacientes que presentaron persistencia de MT después de los 3-4 ciclos de BEP, enfermedad residual irresecable o si mostraron progresión radiológica y bioquímica de la enfermedad (incremento de MT).

Una vez finalizado el tratamiento con BEP y que el oncólogo evaluó la respuesta clínica, los pacientes llevaron un seguimiento trimestral durante 1 año para llevar a cabo la vigilancia de la enfermedad, ya sea para la detección de recurrencia o progresión de la enfermedad.

A todos los pacientes que fueron candidatos a ingresar al protocolo se les proporcionó y explicó la carta de consentimiento informado aprobada por los Comités Científicos y de Ética del Instituto Nacional de Cancerología, se les manifestó verbalmente que se les tomará una un fragmento de su tumor para analizar alteraciones biológicas que nos pudieran permitir conocer un poco más

acerca de su respuesta al tratamiento, se les comentó que no tendrán un beneficio directo por su participación en este estudio; sin embargo, se espera que los resultados obtenidos brinden mayor información acerca de la enfermedad, con el afán de mejorar las estrategias terapéuticas para los pacientes que padecen éste diagnóstico. Se les confirmó que recibirán el manejo estándar para cáncer de testículo. También, se les hizo entrega de una copia del consentimiento informado y si fue solicitado, se les brindó información explícita de la elaboración del estudio y como se llevarían a cabo los ensayos biológicos. Los pacientes tuvieron la libertad de retirarse del estudio de manera voluntaria si así lo decidieron.

Genotipificación de los polimorfismos 8092C>A de *ERCC1* y 5'UTR de *XPA* en individuos mexicanos aparentemente sanos y en pacientes con TCGT no seminomas tratados con quimioterapia basada en cisplatino

Fue un estudio de cohorte, longitudinal y observacional, en el cual la población de estudio fueron pacientes diagnosticados con TCGT no seminomas.

Criterios de inclusión

- Pacientes diagnosticados con TCGT no seminomas puros o mixtos.
- Estadios II y III de la clasificación Royal Marsden.
- Tratados con 3-4 ciclos de quimioterapia con BEP
- Mayores de 15 años y menores de 60 años.
- Karnofsky ≥ 70 y/o ECOG ≤ 2 .
- Contar con historia clínica completa.
- Contar con bloque de parafina y suficiente material biológico

Criterios de exclusión

- Pacientes diagnosticados con TCGT seminomas puros.
- Pacientes con tumores de células germinales extragonadales.

- Pacientes que hayan recibido otro esquema de quimioterapia distinto a BEP, como primera línea de tratamiento.
- Pacientes que no cuenten con bloque de parafina o que el material biológico sea insuficiente.
- Pacientes tratados con menos de 3 ciclos de BEP

Criterios de eliminación

- Pacientes que sus expedientes no contengan información completa, como: edad, reporte de patología del tumor primario, día, mes y año de diagnóstico; día, mes y año de la última cita, sitios de metástasis, niveles de los marcadores tumorales alfa feto proteína, fracción beta de la hormona gonadotropina coriónica y deshidrogenasa láctica antes, durante y al término de la quimioterapia con BEP, respuesta a la quimioterapia con BEP, grupo pronóstico, estadio clínico. Día, mes y año de inicio y término de quimioterapia con BEP, fecha de recurrencia y reporte de patología de la pieza quirúrgica resecada.
- Retiro del consentimiento informado.

Obtención de muestras de sangre periférica

Se solicitó una muestra de 5 ml de sangre periférica a cada uno de los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión.

Cálculo de Muestra

Se realizó el cálculo de la muestra en base a la sobrevida de pacientes con tumores testiculares no seminomas de un estudio previo retrospectivo, para obtener un poder del 80% y una significancia de $p=0.05$ (2 colas) y detectar una diferencia en sobrevida global de 21% a 5 años (45% para el grupo de pacientes con genotipo C/C y 66% para el grupo de pacientes con genotipo heterócigo (C/A) y homócigo (A/A) para el polimorfismo en pacientes con tratamiento con quimioterapia (BEP), hipotetizando una disminución en sobrevida para los individuos que no poseen el polimorfismo asociado a resistencia. Se obtuvo un cálculo de 99 pacientes por brazo; debido a que el alelo C es del 52% en población mexicana, necesitamos 52 pacientes del genotipo CC o CA, en total 104 pacientes.

Se determinó la frecuencia de los polimorfismos 8092C>A de *ERCC1* y 5'UTR de *XPA* en población mexicana (con padres y abuelos mexicanos) para esto, se obtuvo el DNA de individuos mexicanos aparentemente sanos del Banco de DNA del Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM del laboratorio de la Dra. Julieta Rubio.

Por otro lado, se realizó la genotipificación de dichos polimorfismos en pacientes con TCGT-ns del INCan, las muestras de tumor embebidas en bloques de parafina fueron colectadas durante el periodo de Enero del 2000 a Diciembre del 2006.

Se extrajo DNA genómico mediante la utilización de Fenol/Cloroformo/Alcohol Isoamílico/Proteinasas K a partir de muestras de tejido embebidas en bloques de parafina de los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión.

Para la reacción de PCR se utilizaron 100 ng de DNA genómico, 0.2 mM de cada dNTP, 0.2 μ M de cada primer, 1 μ l de buffer 10X sin MgCl₂ (Invitrogen), 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 unidades de DNA polimerasa Taq Platinum (cat. 10966-030 Invitrogen) y H₂O MQ estéril para completar un volumen de 10 μ l. El PCR se llevó a cabo en un termociclador PCR Sprint thermal Cycler de Thermo. Para determinar el polimorfismo 8092C→A del gen *ERCC1* se amplificó un fragmento de 255 pb que incluye el codón 8092 localizado en la región 3' UTR de *ERCC1* con los siguientes oligos: 5'-TAG TTC CTC AGT TTC CCG-3' (sentido) y 5'-TGA GCC AAT TCA GCC ACT-3' (antisentido). Las condiciones utilizadas para el PCR fueron un ciclo de 2 min a 94°C; seguido de 40 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 52°C y 30 s a 72°C, finalizando con un ciclo de 5 min a 72°C.

Para identificar el polimorfismo 8092C>A de *ERCC1* el producto de PCR se digirió con la enzima de restricción Mbo II (New England Biolabs), la cual reconoce el sitio 5' GAAGA(N)₈ 3' que se genera en el gen *ERCC1* por la transversión A:G en la posición 8092 del extremo 3'UTR. El producto fue digerido con 0.25U de la enzima de restricción Mbo II en el buffer 10X NEB2 e incubado a 37°C durante 16h. El alelo polimórfico genera un sitio de corte para la enzima Mbo II. El alelo silvestre posee dos sitios de corte Mbo II generando así 3 bandas (158, 91 y 6 pb), mientras que el alelo polimórfico posee sólo un sitio de corte Mbo II en el fragmento de 158 pb, lo cual resulta en dos bandas (117 y 41pb).

Para el polimorfismo 5'UTR de *XPA* se amplificó un fragmento de 204 pb con los primers 5'-CTA GGT CCT CGG AGT GGT CC-3' (sentido) y 5'-GCC CAA ACC TCC AGT AGC C-3' (antisentido). Las condiciones utilizadas para el PCR fueron un ciclo de 2 min a 94°C; seguido de 40 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 62°C y 30 s a 72°C, finalizando con un ciclo de 5 min a 72°C.

El fragmento amplificado se digirió con la enzima de restricción BspE I (New England BioLabs) que reconoce el sitio 5' T/CCGGA 3'. El producto fue digerido con 0.20U de la enzima de restricción BspE I en el buffer 10X NEB3 e incubado a 37°C durante 16h. La sustitución de una A:G en la región 5'UTR del gen *XPA* genera un sitio de corte para la enzima de restricción BspE I; el alelo silvestre conserva el fragmento original de 204 pb, mientras que el polimórfico al poseer un sitio de corte para la enzima de restricción BspE I genera dos bandas (185 y 19 pb).

Los productos de ambas las digestiones fueron separados y visualizados en un gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio.

Determinar la presencia de la proteína ERCC1 en pacientes con TCGT no seminomas tratados con quimioterapia basada en cisplatino

La presencia de la proteína ERCC1 se detectó mediante la técnica de inmunohistoquímica en cortes de 4 µm obtenidos a partir de tejido neoplásico embebido en bloques de parafina de aquellos pacientes que cumplieron los criterios de inclusión anteriormente descritos.

Se realizó una tinción con hematoxilina y eosina (H&E) y se realizó el protocolo estándar de inmunohistoquímica para ERCC1. Se llevó a cabo la recuperación antigénica para exponer los epítopes con buffer de citratos pH 6.0 en baño maría durante 20 min. Posteriormente se bloqueó la peroxidasa endógena, con una solución 0.3% de peróxido de hidrógeno y después se realizó un bloqueo con 0.25% de suero fetal bovino (fracción V) durante 1 h a temperatura ambiente. Las muestras se incubaron en una dilución 1:1000 con un anticuerpo monoclonal específico para reconocer la proteína humana ERCC1 (NeoMarkers, ratón, clona 8F1, Fremont, California).

La unión del anticuerpo fue detectada utilizando ácido diamino bencénico (DAB) como sustrato (DAKO Cytomation, K0690, Glostrup, Dinamarca) y hematoxilina de Harris para contrateñir (Merck, Darmstadt, Alemania). La tinción fue visualizada en un microscopio de luz visible (Olympus U-D03, Tokyo, Japón). Como control externo se utilizaron secciones de tejido de testículo normal; también se utilizaron células del estroma que se encontraban alrededor del tumor como controles internos y positivos.

La tinción de ERCC1 fue evaluada por dos patólogos en un microscopio de luz visible a 400x, ambos se encontraban cegados a las variables clínico-patológicas y biológicas de los pacientes.

La intensidad de la tinción de los núcleos positivos fueron graduadas en una escala del 0 al 3, siendo 3 la mayor intensidad; el tejido normal adyacente al tumor fue utilizado como referencia. El porcentaje de células positivas fue calculado para cada muestra y fue asignado un porcentaje de las medidas como se ha descrito previamente (0 si fue 0%, 0.1 si fue 1-9%, 0.5 si fue 10-49% y 1 si fue 50-100%)⁶⁴. Este valor fue multiplicado por el grado de intensidad de los núcleos positivos para obtener una medida semicuantitativa (H score). Cualquier caso con alguna discrepancia en los valores fueron revisados por los patólogos hasta llegar a un consenso; de igual manera, cualquier caso que no tuviera controles adecuados fue excluido.

Análisis Estadístico

Las variables continuas se presentan como medias aritméticas, medianas y desviación estándar, y las variables categóricas como frecuencias relativas y proporciones. Las comparaciones inferenciales se realizaron con la prueba T-student o de Mann-Whitney y la distribución de la información (normal y no-normal) se determinó mediante la prueba Kolmogorov-Smirnov. Se utilizaron las pruebas Chi cuadrada y de Fischer para comparar las variables categóricas; el valor de alfa se definió en un valor de p menor de 0.05 y todos los estadísticos que se utilizaron fueron de dos-colas. La asociación de las variables independientes con la respuesta al cisplatino se empleó el modelo de regresión logística, para obtener la razón de momios (OR) con un intervalo de confianza del 95%. Para el análisis de supervivencia se utilizó la técnica de Kaplan-Meier y la comparación entre grupos fue analizada con la prueba de Log-Rank, así como los riesgos relativos

(RR) que fueron calculados mediante el modelo de Cox's. Se utilizó el programa estadístico SPSS (versión 18.0, Inc., Chicago, IL) para analizar la información.

Definición de las variables

Variables independientes

EDAD

1. Definición operativa

Se medirá el número de años cumplidos en expediente electrónico al momento del diagnóstico

2. Tipo de variable

Cuantitativa discreta

3. Unidad de medición

Años

SUBTIPO HISTOLÓGICO

1. Definición operativa

Subtipo histológico en el reporte histopatológico del expediente electrónico

2. Tipo de variable

Cualitativa nominal

3. Categorías de la variable:

- a. Coriocarcinoma
- b. Seminoma
- c. Carcinoma embrionario
- d. Tumor de senos endodérmicos
- e. Teratoma

SITIOS DE METÁSTASIS

1. Definición operativa

Sitio de metástasis descrito en la nota de primera vez del expediente clínico

2. Tipo de variable

Cualitativa nominal

3. Categorías de la variable
 - a) Retroperitoneo
 - b) Mediastino
 - c) Pulmón
 - d) Ganglios
 - e) Sistema Nervioso Central
 - f) Hígado
 - g) Hueso y Otros sitios

ESTADIO CLÍNICO

1. Definición operativa

Se medirá según los criterios de la Royal Marsden
2. Tipo de variable

Cuantitativa discreta
3. Unidad de medición
 - a) II
 - b) III

GRUPO PRONÓSTICO

1. Definición operativa

Definición obtenida según criterios el Grupo Colaborativo Internacional de Tumores de Células Germinales (IGCCCG). En función a el sitio del tumor, metastásis y niveles de los marcadores tumorales (MT) alfa feto proteína (AFP), fracción beta de la hormona gonadotropina coriónica humana (FBGCH) y deshidrogenasa láctica (DHL).

Tipo de variable

Cualitativa nominal
2. Categorías de la variable:
 - a) Buen pronóstico

- b) Pronóstico intermedio
- c) Pobre pronóstico

Variables dependientes

RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON QUIMIOTERAPIA (BEP)

1. Definición operativa
Definida en función de MT, estudios radiológicos y cirugía si es requerida
2. Tipo de variable
Cualitativa nominal
3. Categorías de la variable:
 - a) Sensibles
 - i. Respuesta completa a QTx: Desaparición radiológica y bioquímica (MT negativos) de toda evidencia de enfermedad o cuando todas las lesiones residuales posteriores a QTx sean reseca­das completamente y muestren necrosis, fibrosis o teratoma maduro.
 - ii. Respuesta completa a QTx más cirugía: Respuesta bioquímica con MT negativos y resección completa de todas las lesiones visibles posterior a la administración de la QTx pero con tumor viable en uno o más de los sitios reseca­dos.
 - b) Resistentes
 - i. Respuesta parcial: MT negativos pero con evidencia radiológica de enfermedad no reseca­ble posterior a la administración de Qtx.
 - ii. Progresión: MT positivos con evidencia radiológica de progresión de lesiones tumorales.

SOBREVIDA GLOBAL

1. Definición operativa

Se medirá el tiempo en meses desde la fecha de diagnóstico, hasta la fecha de muerte o fecha de la última visita de seguimiento. (Datos obtenidos del expediente electrónico y físico)

2. Tipo de variable
Cuantitativa discreta
3. Unidad de medición
Meses

POLIMORFISMOS

1. Definición operativa
Se determinarán los polimorfismos por la técnica de PCR-RFLP's
2. Tipo de variable
Cualitativa nominal
3. Categorías de la variable:
 - a) C/C (ERCC1) o A/A (XPA)
 - b) C/A (ERCC1) o A/G (XPA)
 - c) A/A (ERCC1) o G/G (XPA)

EXPRESIÓN DE ERCC1 Y XPA

1. Definición operativa
Se determinará la expresión mediante la cantidad del blanco = $2^{-\Delta\Delta CT}$. Se usará el promedio de ΔCT de un paciente sensible a BEP como calibrador para cada gen de interés.
2. Tipo de variable
Cualitativa nominal
3. Categorías de la variable:
 - a) Sobre-expresión. Expresión igual o mayor a 1
 - b) Sub-expresión. Expresión menor a 1

INMUNOHISTOQUÍMICA DE ERCC1

1. Definición operativa

Se determinará la expresión de ERCC1 mediante la técnica de inmunohistoquímica. La intensidad de la tinción de los núcleos positivos será graduada en una escala del 0 al 3. El porcentaje de células positivas será calculado para cada muestra y se le asignará un porcentaje de las medidas de la siguiente manera (0 si fue 0%, 0.1 si fue 1-9%, 0.5 si fue 10-49% y 1 si fue 50-100%). Este valor se multiplicará por el grado de intensidad de los núcleos positivos para obtener una medida semicuantitativa (H score).

2. Tipo de variable

Cualitativa nominal

3. Categorías de la variable:

- a) Tinción nuclear negativa para ERCC1. H score < mediana H score
- b) Tinción nuclear positiva para ERCC1. H score > mediana H score

RESULTADOS

Expresión de *ERCC1* y *XPA* en líneas celulares de cáncer sensibles y no-sensibles al tratamiento con cisplatino

La expresión basal de *ERCC1* y *XPA* se analizó por RT-PCR semi-cuantitativo en la línea celular de cáncer de testículo (NT2/D1) sensible a cisplatino y en las líneas celulares de vejiga (1A6 y T-24), así como en la línea celular de cáncer cérvico-uterino (HeLa) no-sensibles a cisplatino (Figura 6).

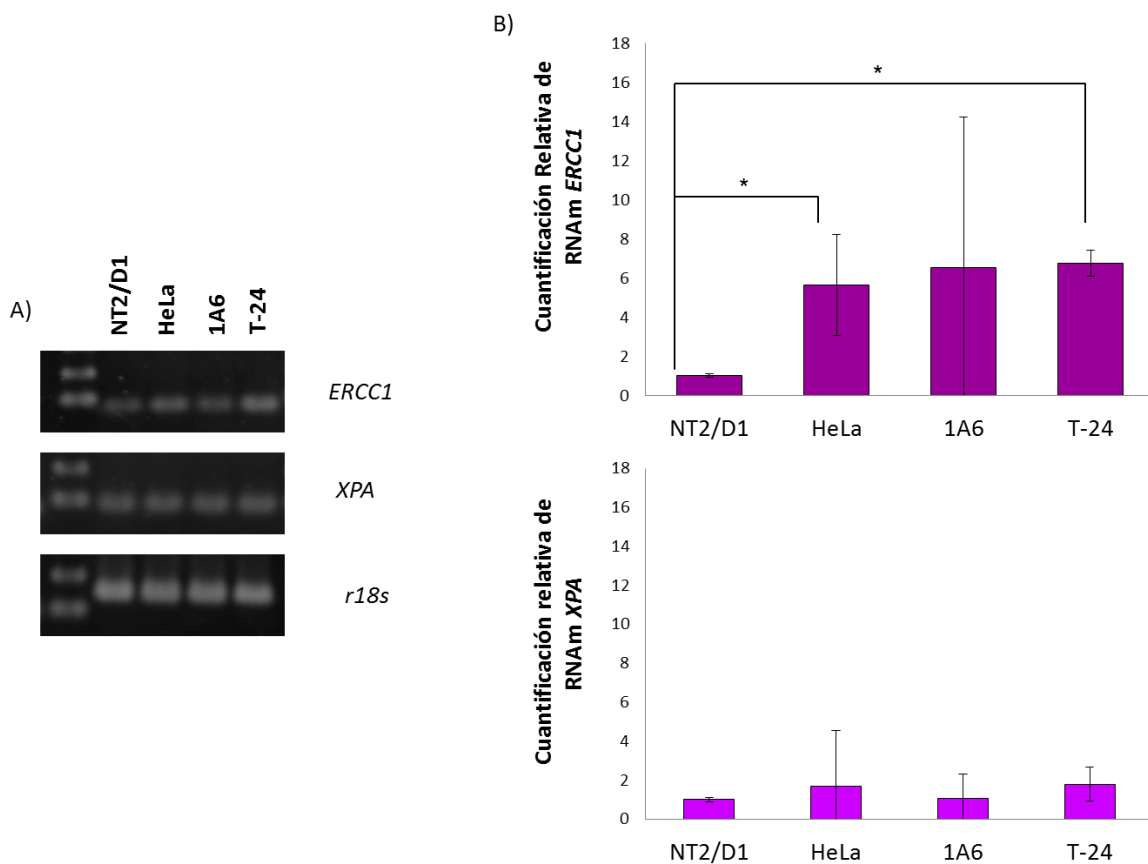


Figura 6. Expresión de *ERCC1* y *XPA* en líneas celulares de cáncer. A) RT-PCR semicuantitativo de *ERCC1* y *XPA* en las líneas celulares de cáncer NT2/D1, HeLa, 1A6 y T-24. B) Cuantificación Relativa de la expresión de *ERCC1* y *XPA* en las líneas celulares de cáncer. Las barras, muestran la desviación estándar producto del triplicado de 3 experimentos independientes; * diferencia significativa con la prueba de T-Student $p < 0.05$.

Se observó una mayor expresión de *ERCC1* estadísticamente significativa en las líneas celulares no-sensibles al cisplatino HeLa y T-24 comparada con la expresión de la línea celular de cáncer de testículo NT2/D1 ($p=0.013$ y $p=0.005$ respectivamente). No se encontraron diferencias en los niveles basales de *XPA* entre las líneas celulares no-sensibles a cisplatino comparados con la línea celular de cáncer de testículo.

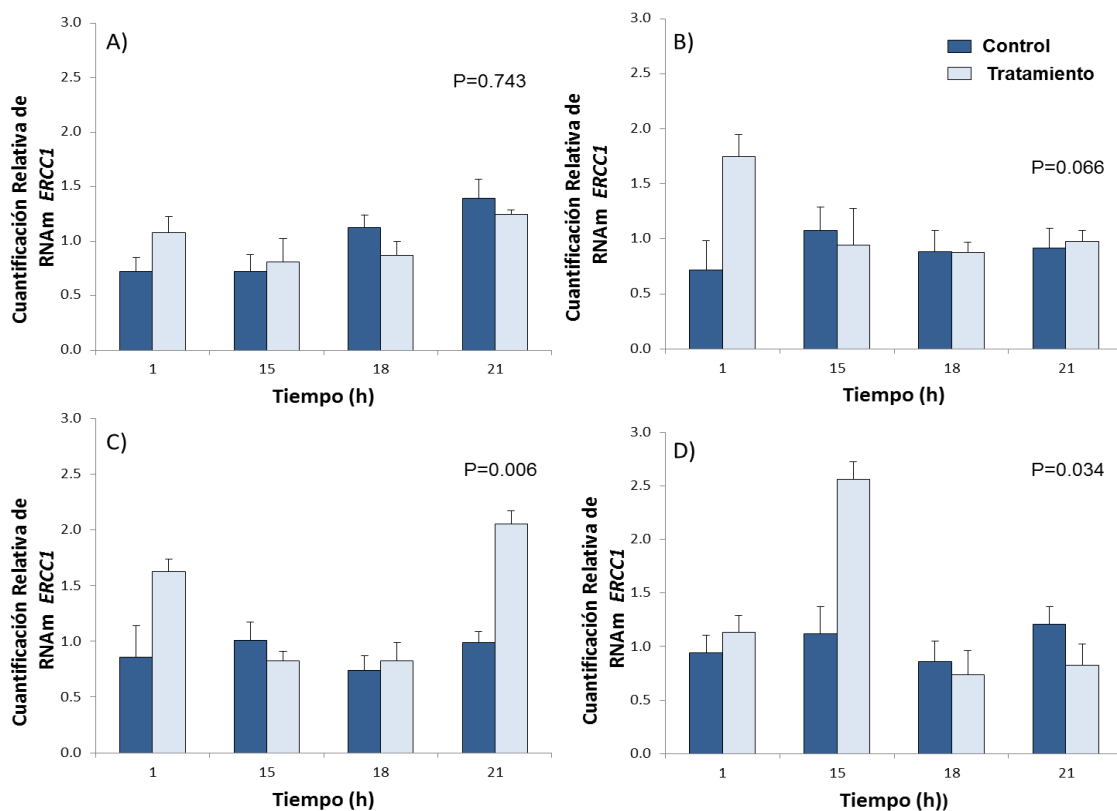
Los niveles elevados de *ERCC1* en las líneas celulares no-sensibles a cisplatino pueden explicar el mecanismo de resistencia de estas células al cisplatino, el tener a *ERCC1* incrementado, las células tendrán una maquinaria de reparación del DNA eficiente, por consiguiente los aductos formados por el cisplatino son eliminados eficientemente y como resultado no se observa una acumulación de daño celular y las células no mueren; lo cual se ve reflejado en la viabilidad celular.

Una vez que comprobamos que la línea celular de cáncer de testículo sensible a cisplatino, tenía menor expresión de *ERCC1*, quisimos ver el efecto del tratamiento con cisplatino en sus niveles de expresión, se esperaba que no existiera un efecto directo del tratamiento con cisplatino en la expresión de *ERCC1* en esta línea celular, reforzando así la hipótesis, de que las células de cáncer de testículo son sensibles al cisplatino, debido a una disminución en los niveles de expresión de la proteína de reparación *ERCC1*.

Se obtuvieron los IC_{50} para cada línea celular (10 μM para HeLa y T-24, 11 μM para 1A6 y 4 μM para la línea celular NT2/D1) los cuales fueron utilizados en los experimentos posteriores, ya que con la concentración inhibitoria 50 de cisplatino que determinamos, se observaba daño al DNA inducido por el fármaco; sin embargo, desconocíamos el tiempo específico en el cual el sistema de reparación NER se activaba, así que realizamos el curso temporal con el tratamiento con cisplatino para comprobar que permanecieran disminuidos los niveles de *ERCC1* en la línea celular sensible a cisplatino y que los niveles basales de *ERCC1* no incrementaran frente a un estímulo de daño al DNA.

Las líneas celulares fueron tratadas con el respectivo IC_{50} de cisplatino y posteriormente se extrajo RNA a 1, 15, 18 y 21h de tratamiento para posteriormente determinar la expresión de *ERCC1* por RT-PCR en tiempo real (Gráfica 1). Observamos un incremento en la expresión de *ERCC1* en las líneas celulares de cáncer no-sensibles al cisplatino dependiente del tiempo de exposición al fármaco y como se observa en la gráfica, dependiente del tratamiento con cisplatino. A diferencia

de lo que ocurre en las líneas celulares de cáncer no-sensibles a cisplatino, no vimos un incremento en la expresión de *ERCC1* en la línea celular de cáncer de testículo tratadas con cisplatino; lo que nos habla que efectivamente la sensibilidad de esta línea celular se debe a niveles disminuidos de *ERCC1* y por consiguiente a deficiencias en este mecanismo de reparación, las células a pesar de someterse a un estímulo de daño al DNA, como es el tratamiento con cisplatino, es incapaz de incrementar los niveles de *ERCC1* por lo tanto, no pueden reparar eficientemente el daño en el DNA provocado por el cisplatino y como resultado, son extremadamente sensibles al tratamiento con cisplatino y las células mueren resultado de la acumulación de aductos en el DNA y la generación de rompimientos de doble cadena.



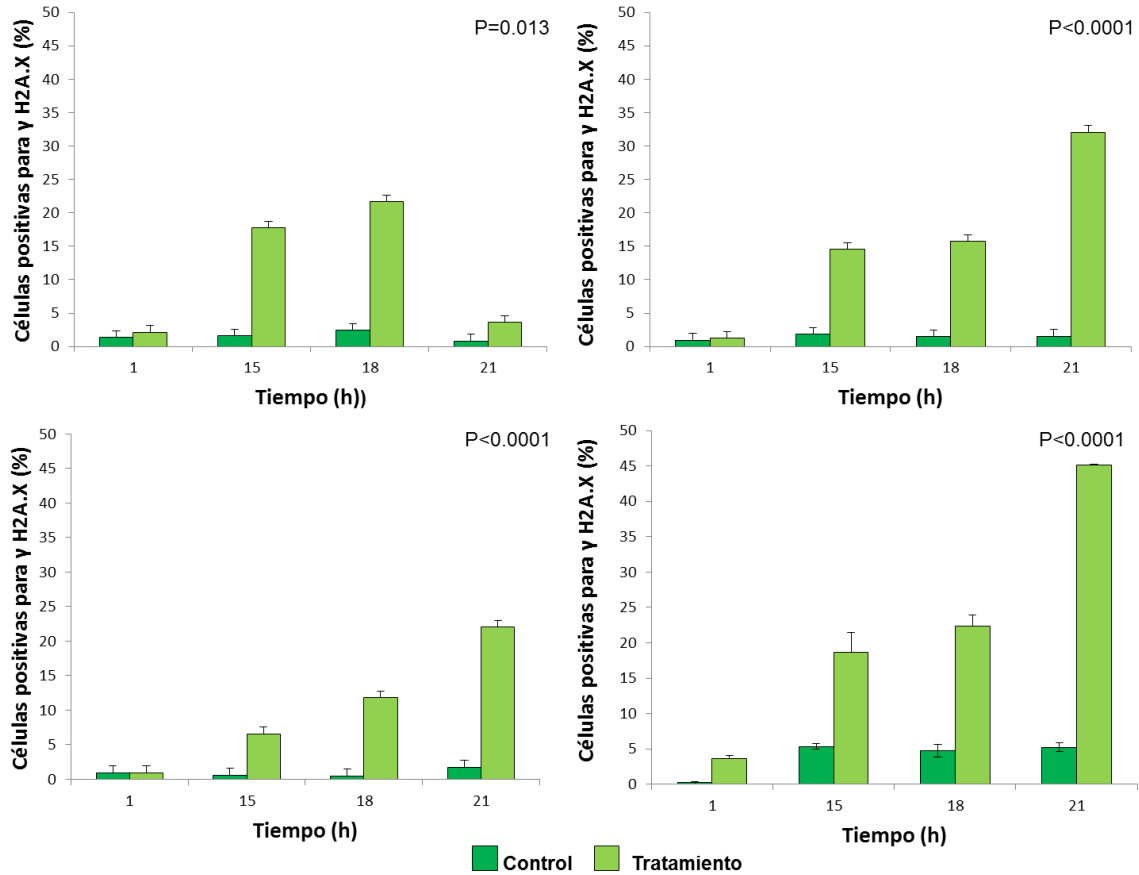
Gráfica 1. Cuantificación relativa de la expresión de *ERCC1*. RT-PCR en tiempo real de la expresión de *ERCC1* en las líneas celulares de cáncer tratadas con el IC_{50} de cisplatino correspondiente. A) Línea celular NT2/D1, B) HeLa, C) 1A6 y D) T-24. Las barras, muestran la desviación estándar producto del triplicado de 3 experimentos independientes. Los valores de p representan las diferencias con respecto al tratamiento con cisplatino mediante la prueba de ANOVA para muestras múltiples $p < 0.05$.

Con estos resultados podemos concluir que la expresión de *ERCC1* es un factor determinante en la respuesta al tratamiento con cisplatino, no así la expresión de *XPA*; así mismo, la sensibilidad de la línea celular de cáncer de testículo NT2/D1 es una consecuencia de poseer niveles bajos de *ERCC1* y ser incapaz de incrementar estos niveles frente a un estímulo de daño al DNA.

Activación de la maquinaria de reparación inducida por el daño al DNA ocasionado por el tratamiento con cisplatino

Una vez que evidenciamos que la sensibilidad de la línea celular de cáncer de testículo se debe a una disminución en los niveles de expresión de *ERCC1* y que en las líneas celulares de cáncer no-sensibles a cisplatino los niveles eran elevados y además incrementaban ante el tratamiento con cisplatino, decidimos comprobar que efectivamente se estuviera llevando a cabo la activación de la maquinaria NER y por consiguiente una reparación adecuada del DNA dañado; para esto, realizamos un ensayo para determinar la proporción de la γ H2AX en las líneas celulares de cáncer sensible y no-sensibles a cisplatino.

La γ H2AX fue analizada para determinar el porcentaje de rompimientos de doble cadena (DSB) inducidos por el tratamiento con cisplatino, ya que esta variante de histona reconoce los DSB ocasionados por los aductos con el DNA. Las líneas celulares de cáncer fueron tratadas con los respectivos IC_{50} de cisplatino. Se analizó el porcentaje de células positivas para γ H2AX a 1, 15, 18 y 21h de tratamiento (Gráfica 2). Hubo un incremento en las líneas celulares de cáncer no-sensibles a cisplatino a las 15, 18 y 21h de tratamiento, se observó un ligero incremento con el tiempo del porcentaje de células positivas para γ H2AX. En la línea celular NT2/D1 el porcentaje de células positivas incrementa al tiempo 15 y 18h y posteriormente disminuye a las 21h post-tratamiento; lo cual nos habla de que existe un daño al DNA (DSB) considerable, sin embargo, al poseer bajos niveles de *ERCC1*, las células son incapaces de reparar el DNA dañado y como consecuencia mueren, es así que observamos una disminución del porcentaje de γ H2AX a las 21h de tratamiento.



Gráfica 2. Porcentaje de rompimientos de doble cadena (DSB) inducidos por el tratamiento con cisplatino. Las gráficas muestran el porcentaje de células positivas para γ H2AX en líneas celulares de cáncer sensibles y no-sensibles al tratamiento con cisplatino. Las barras, muestran la desviación estándar producto del triplicado de 3 experimentos independientes. Los valores de p representan las diferencias con respecto al tratamiento con cisplatino mediante la prueba de ANOVA para muestras múltiples $p < 0.05$.

Estos resultados nos hablan de que existe un correcto reconocimiento del daño al DNA (DSB) provocado por el tratamiento con cisplatino, sin embargo en la línea celular de cáncer de testículo, este daño no se está reparando. Esto nos habla de que la sensibilidad de esta línea celular, se debe a deficiencias en los mecanismos de reparación, específicamente debido a niveles bajos de *ERCC1*.

Expresión de *ERCC1* y *XPA* en pacientes con TCGT no seminomas vírgenes al tratamiento con quimioterapia basada en cisplatino en población mexicana y población peruana

Se realizó un estudio exploratorio para analizar la expresión de *ERCC1* y *XPA* en pacientes con TCGT no seminomas en dos poblaciones diferentes. Se extrajo RNA a partir de muestras frescas de tumor y analizó la expresión por RT-PCR en tiempo real.

En el INCan, 142 pacientes fueron diagnosticados como TCGT, 35 pacientes cumplieron con nuestros criterios de inclusión. La media de edad fue de 25.4 años (DS 8.1 años). En el caso de los individuos reclutados en el INEN, 82 pacientes fueron diagnosticados como TCGT y 24 cumplieron con los criterios. La media de edad fue de 25.9 años (DS 6.5 años). Las características generales de ambas poblaciones se describen en las siguientes tablas.

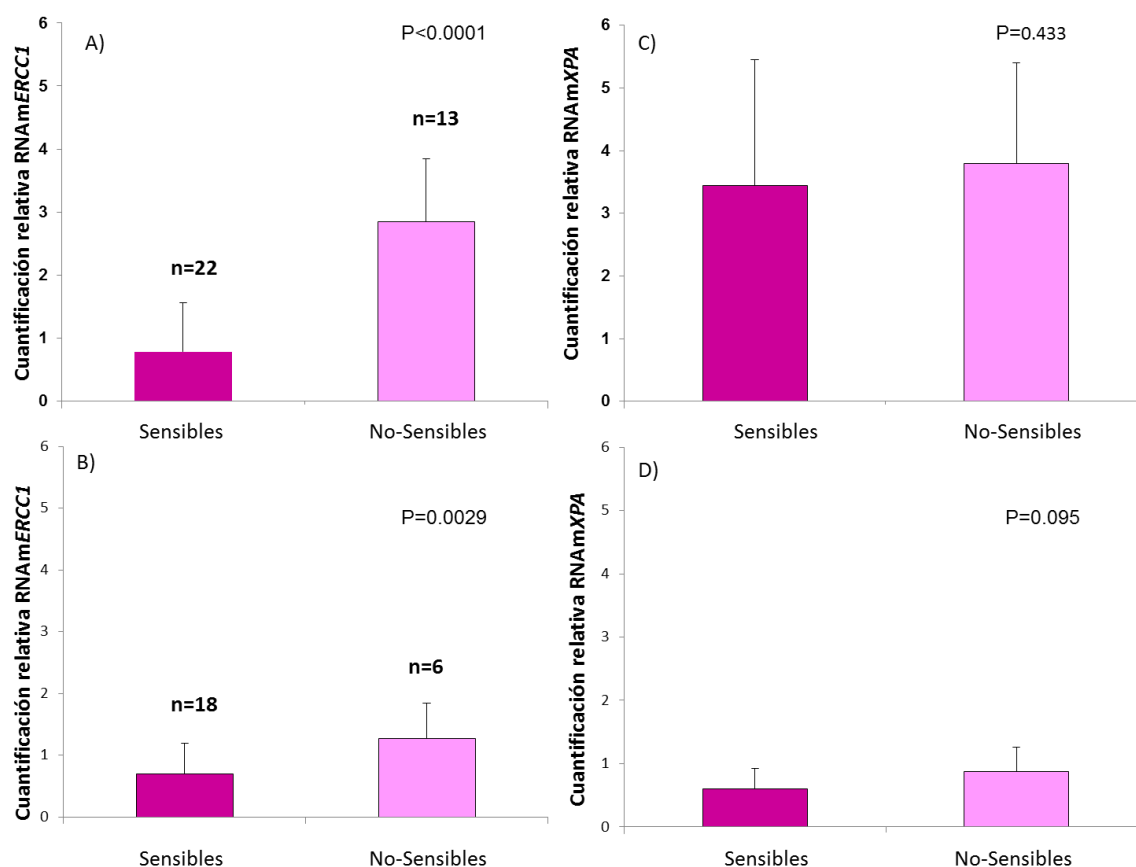
| Características generales Pob. Mexicana | | Características generales Pob. Peruana | |
|---|-------|--|-------|
| Buen Pronóstico | 40% | Buen Pronóstico | 29.2% |
| Pronóstico intermedio | 40% | Pronóstico intermedio | 20.8% |
| Pobre Pronóstico | 20% | Pobre Pronóstico | 50% |
| Mets. Pulmón | 42.9% | Mets. Pulmón | 50% |
| Mets. Retroperitoneo | 80% | Mets. Retroperitoneo | 75% |
| Mets. Mediastino | 25.7% | Mets. Mediastino | 12.5% |
| Cisplatino Sensible | 71.4% | Cisplatino Sensible | 75% |

Tabla 1. Características de los pacientes con TCGT no seminomas con enfermedad avanzada de población Mexicana (izquierda) y población Peruana (derecha).

Bajo el supuesto de que el 20% de las muestras frescas expresan *ERCC1* y *XPA*, el tamaño de muestra calculado es de 22 pacientes, con un intervalo de confianza de 95% y un error del 15%.

Las muestras fueron analizadas y divididas en pacientes sensibles y no-sensibles al tratamiento con quimioterapia basado en cisplatino (BEP). En la población mexicana 22 pacientes fueron sensibles a cisplatino y 13 fueron no-sensibles a cisplatino, mientras que en la población peruana 18 pacientes respondieron a la quimioterapia y 6 pacientes fueron no-sensibles.

Encontramos un incremento en la expresión de *ERCC1* en los pacientes no-sensibles a cisplatino en ambas poblaciones ($p < 0.001$ y $p = 0.003$); no así en la expresión de *XPA*, en donde no observamos diferencias en los niveles de expresión en los grupos sensibles y no-sensibles al tratamiento con quimioterapia basada en cisplatino en la población mexicana y peruana ($p = 0.433$ y $p = 0.095$).



Gráfica 3. Expresión de *ERCC1* y *XPA* en TCGT sensibles y no-sensibles. A) Expresión de *ERCC1* en población Mexicana y en población Peruana C). B) Expresión de *XPA* en población Mexicana y en población Peruana D). Las barras muestran la desviación estándar de 3 experimentos independientes. Los valores de p

muestras las diferencias de expresión entre los grupos sensibles y no-sensibles con la prueba T-Student para muestras pequeñas.

La expresión elevada de *ERCC1* en pacientes no-sensibles a cisplatino nos habla de una asociación entre esta proteína y la respuesta al tratamiento; esto es, una eficiencia en este mecanismo de reparación relacionada con una elevada capacidad para reparar los aductos provocados por el cisplatino en el DNA y como consecuencia un respuesta comprometida de estos pacientes al tratamiento con quimioterapia basada en cisplatino. Por otro lado, no existe una influencia de la expresión de *XPA* en la respuesta al tratamiento, dado que no encontramos diferencias en los niveles de expresión que pudieran estar afectando la respuesta de estos pacientes al cisplatino; estos resultados son similares a los encontrados previamente en las líneas celulares sensibles y no-sensibles a cisplatino, en donde tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de *XPA* y la sensibilidad a cisplatino de la línea celular de cáncer de testículo comparada con las líneas celulares de cáncer no-sensibles a cisplatino.

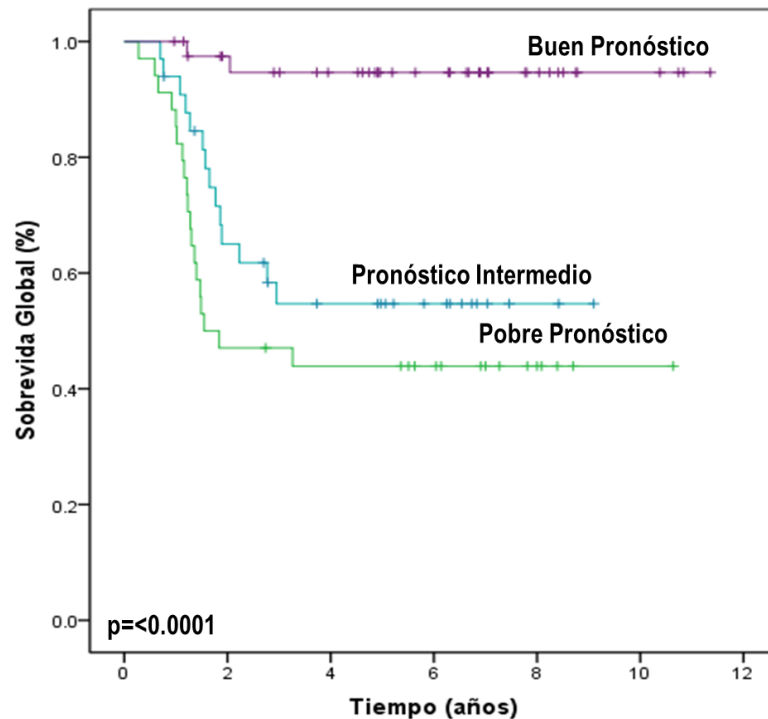
Estos resultados realizados en muestras frescas de tumor nos hablan del importante papel que juega *ERCC1* en la sensibilidad de los tumores de células germinales de testículo no seminomas al tratamiento con cisplatino y que este papel no sólo lo observamos en estudios *in vitro*, si no que se observa también en los tumores.

Genotipificación de los polimorfismos 8092C>A de *ERCC1* y 5'UTR de *XPA* en individuos mexicanos aparentemente sanos y en pacientes con TCGT no seminomas tratados con quimioterapia basada en cisplatino.

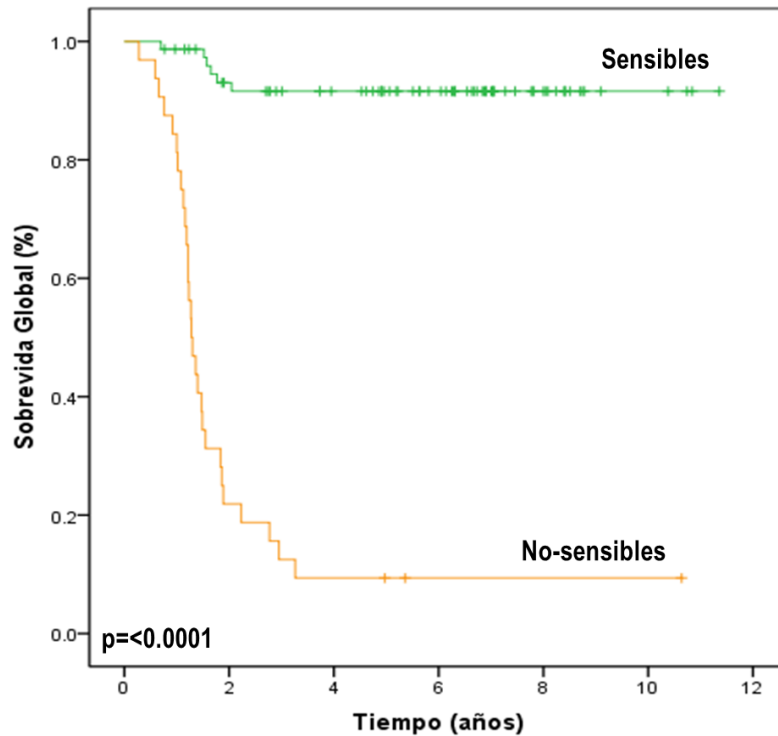
Se revisaron 880 expedientes con ayuda y supervisión de un oncólogo médico, de los pacientes con el diagnóstico de cáncer de testículo en el INCan, de los cuales 113 cumplieron con los criterios de inclusión y 5 casos fueron excluidos debido a que no tenían suficiente material biológico para el análisis de los polimorfismos.

La mediana de edad de los 108 pacientes con TCGT no seminomas tratados con BEP fue de 24.1 años (DS 5.2 años), de los cuales 38%, 30.5% y 31.5% de los pacientes fueron considerados de buen pronóstico, intermedio y pobre pronóstico respectivamente. Los sitios más frecuentes de

metástasis de esta población fueron pulmón (42.6%), retroperitoneo (87%) y mediastino (9.3%). Después de 3 o 4 ciclos de quimioterapia basada en cisplatino (BEP), 76 pacientes (70.4%) fueron considerados sensibles al tratamiento. Al término del estudio, 73 pacientes (67.6%) se encontraban vivos y la mediana de seguimiento fue de 4.88 años (rango, 0.28-11.4 años). De los 108 pacientes incluidos en este estudio, 7 pacientes (6.5%) presentaron recurrencia de la enfermedad; la sobrevida libre de enfermedad (SVLE) a 5 años de estos pacientes fue de 93.1%; 35 pacientes murieron durante el periodo de seguimiento y la sobrevida global (SVG) a 5 años fue de 66.1%. La SVG a 5 años de los pacientes con buen pronóstico, intermedio y pobre pronóstico fue de 94.7%, 54.7% y 43.9% respectivamente ($p < 0.0001$) (Gráfica 4). Los pacientes considerados sensibles a y no-sensibles a cisplatino tuvieron una SVG a 5 años de 91.6% y 25%, respectivamente ($p < 0.0001$) (Gráfica 5).



Gráfica 4. Kaplan-Meier. Curva de sobrevida global con respecto al grupo pronóstico de pacientes con TCGT. El valor de p muestra la diferencia en los grupos con la prueba de Log-Rank.



Gráfica 5. Kaplan-Meier. Curva de sobrevida global con respecto a la respuesta al tratamiento con cisplatino de pacientes con TCGT. El valor de p muestra la diferencia en los grupos con la prueba de Log-Rank.

Se obtuvo el DNA de 124 individuos mexicanos aparentemente sanos del Banco de DNA del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM para determinar el polimorfismo 8092C>A de *ERCC1*. Encontramos que 33 individuos (26.6%) fueron C/C, 64 (51.6%) fueron C/A y 27 (21.8%) fueron A/A. Para el polimorfismo 5'UTR de *XPA* se obtuvo DNA de 161 individuos mexicanos aparentemente sanos, de los cuales 27 individuos (16.8%) fueron A/A, 76 (47.2%) fueron A/G y 58 (36%) fueron G/G (Figura 7).

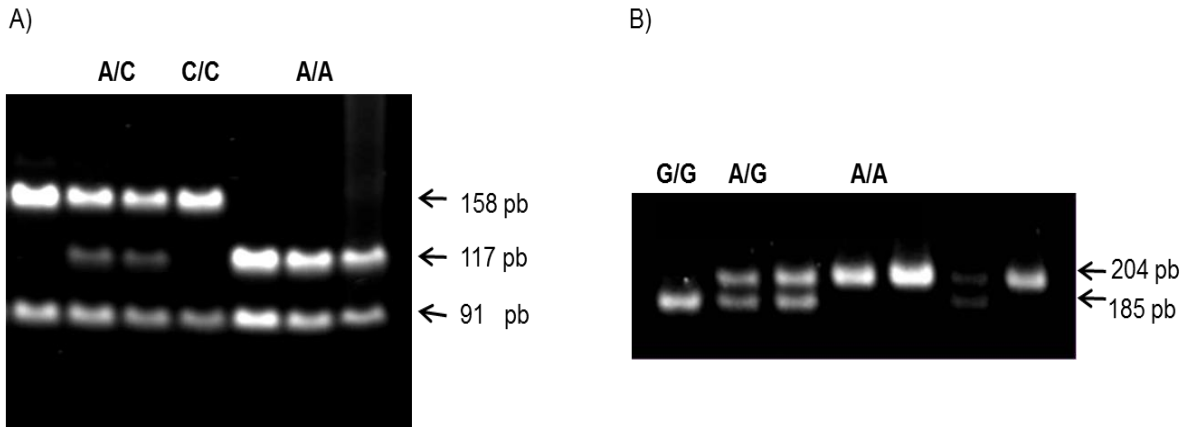
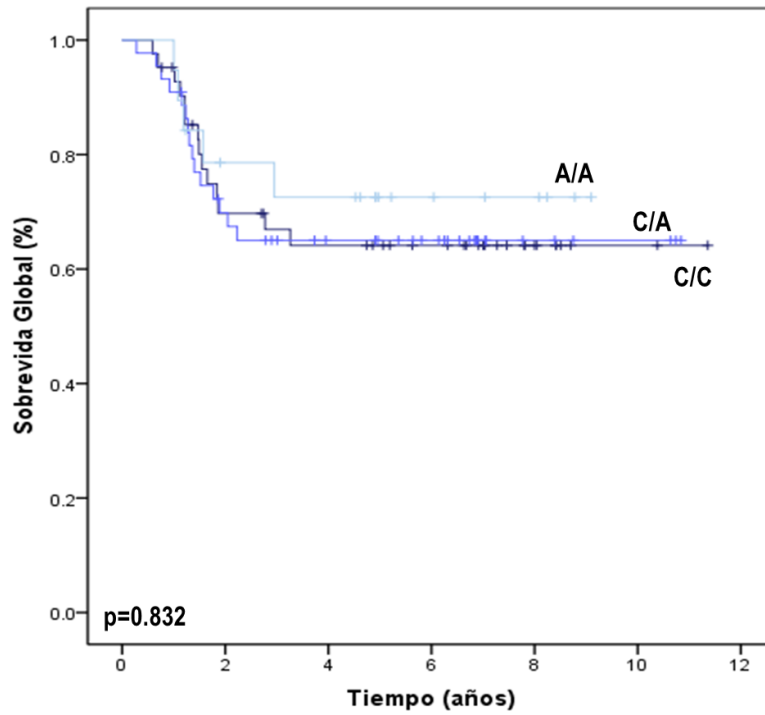
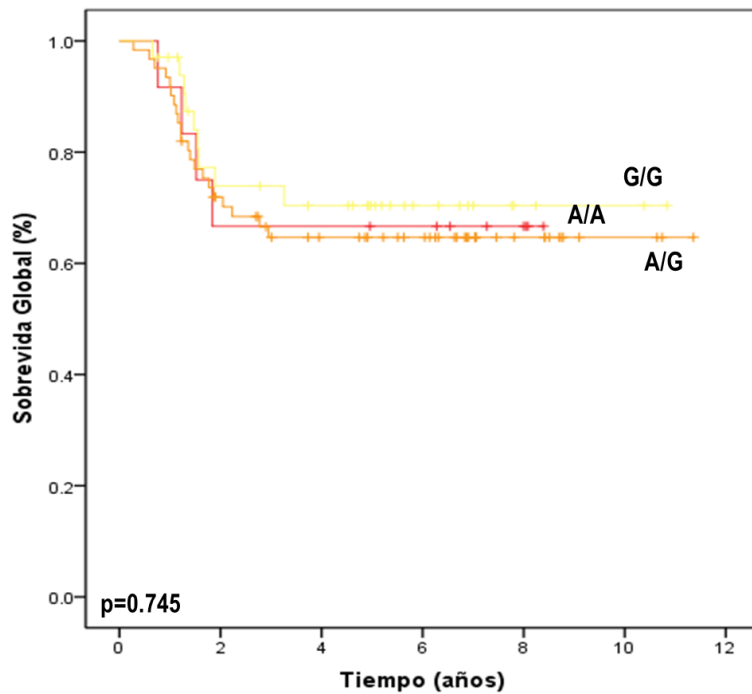


Figura 7. Genotipificación de los polimorfismos 8092C>A de *ERCC1* y 5'UTR de *XPA*. A) Genotipo del polimorfismo 8092C>A de *ERCC1*. B) Genotipos del polimorfismo 5'UTR de *XPA*.

Para el caso de los pacientes diagnosticados con TCGT no seminomas tratados con BEP, se extrajo DNA genómico a partir de tejido neoplásico embebido en bloques de parafina de 108 pacientes. Para el polimorfismo 8092C>A de *ERCC1*, 42 pacientes (40%) fueron C/C, 44 (42%) fueron C/A y 19 (18%) fueron A/A; en el caso del polimorfismo 5'UTR de *XPA*, encontramos que 12 pacientes (11%) fueron A/A, 61 (57%) fueron A/G y 34 (32%) fueron G/G. No encontramos una asociación entre la presencia de estos polimorfismos y la SVG, la respuesta al tratamiento con BEP o las variables clínico-patológicas estudiadas (Gráfica 5,6 y Tabla 1).



Gráfica 6. Kaplan-Meier. Curva de supervivencia global con respecto al polimorfismo 8092C>A de *ERCC1* de pacientes con TCGT. El valor de p muestra la diferencia en los grupos con la prueba de Breslow.



Gráfica 7. Kaplan-Meier. Curva de supervivencia global con respecto al polimorfismo 5'UTR de *XPA* de pacientes con TCGT. El valor de p muestra la diferencia en los grupos con la prueba de Breslow.

| | | SNP 8092C>A ERCC1 | | | Total |
|-------------------|--------------|-------------------|-----|-----|-------|
| | | C/C | C/A | A/A | |
| Respuesta al CDDP | Sensibles | 30 | 30 | 14 | 74 |
| | No-Sensibles | 12 | 14 | 5 | 31 |
| Total | | 42 | 44 | 19 | 105 |

$p=0.894$

| | | SNP 5'UTR XPA | | | Total |
|-------------------|--------------|---------------|-----|-----|-------|
| | | A/A | A/G | G/G | |
| Respuesta al CDDP | Sensibles | 9 | 43 | 24 | 76 |
| | No-Sensibles | 3 | 18 | 10 | 31 |
| Total | | 12 | 61 | 34 | 107 |

$p=0.949$

Tabla 1. Asociación de la respuesta al tratamiento con cisplatino y la presencia de los polimorfismo 8092C>A de ERCC1 y 5'UTR de XPA. Los valores de p son los obtenidos mediante la prueba de Chi-cuadrada.

Las frecuencias de los alelos polimórficos fueron 0.48 para el polimorfismo 8092C>A de ERCC1 y 0.60 para el polimorfismo 5'UTR de XPA en pacientes con TCGT no seminomas; estas frecuencias fueron similares a las encontradas en la población mexicana aparentemente sana en donde se obtuvo una frecuencia para el alelo polimórfico de 0.47 para el caso del polimorfismo 8092C>A de ERCC1 y 0.59 para el polimorfismo 5'UTR de XPA. No encontramos una asociación entre la presencia de del polimorfismo 8092C>A de ERCC1 y la expresión de ERCC1 (Tabla 2). En el caso de la expresión de XPA analizada en las muestras frescas, todas las muestras sobre-expresaron XPA y por lo tanto, no se pudo realizar el análisis para asociar el polimorfismo 5'UTR de XPA con la expresión de XPA.

| | | SNP 8092C>A ERCC1 | | | Total |
|----------------------|-----------------|-------------------|-----|-----|-------|
| | | C/C | C/A | A/A | |
| Expresión RNAm ERCC1 | Sub-expresión | 6 | 5 | 5 | 16 |
| | Sobre-expresión | 9 | 8 | 2 | 19 |
| Total | | 15 | 13 | 7 | 35 |

p=0.311

Tabla 2. Asociación entre el polimorfismo 8092C>A de ERCC1 y la expresión de ERCC1 en muestras frescas de pacientes con TCGT.

ERCC1 en pacientes con TCGT no seminomas tratados con quimioterapia basada en cisplatino

El ensayo de inmunohistoquímica se realizó para determinar la presencia de la proteína ERCC1 en estos 108 pacientes diagnosticados con TCGT no seminomas tratados con BEP. Las muestras fueron analizadas con ayuda y supervisión de una especialista en Anatomía Patológica Oncológica. El valor de la mediana de los valores de H scores se consideró como punto de corte para los tumores ERCC1-positivos de los tumores ERCC1-negativos; la mediana de los H scores fue de 0, los tumores que tuvieron un H score mayor a 0 fueron considerados ERCC1-positivos. La tinción nuclear de ERCC1 fue observada en 30/108 pacientes (27.8%)(Figura 8).

No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre la presencia de ERCC1 y los diferentes elementos histológicos; sin embargo, es importante resaltar que de los 30 pacientes positivos para ERCC1, 20 pacientes poseen el componente de teratoma, 7 fueron teratomas puros y 3 no tenían teratoma. El 33-3% (10/30) de los pacientes positivos para ERCC1 fueron no-sensibles, de los cuales 4/7 pacientes (57.1%) fueron teratoma puro y 6/20 pacientes (30%) poseen el elemento histológico de teratoma (p=0.365, Prueba exacta de Fisher).

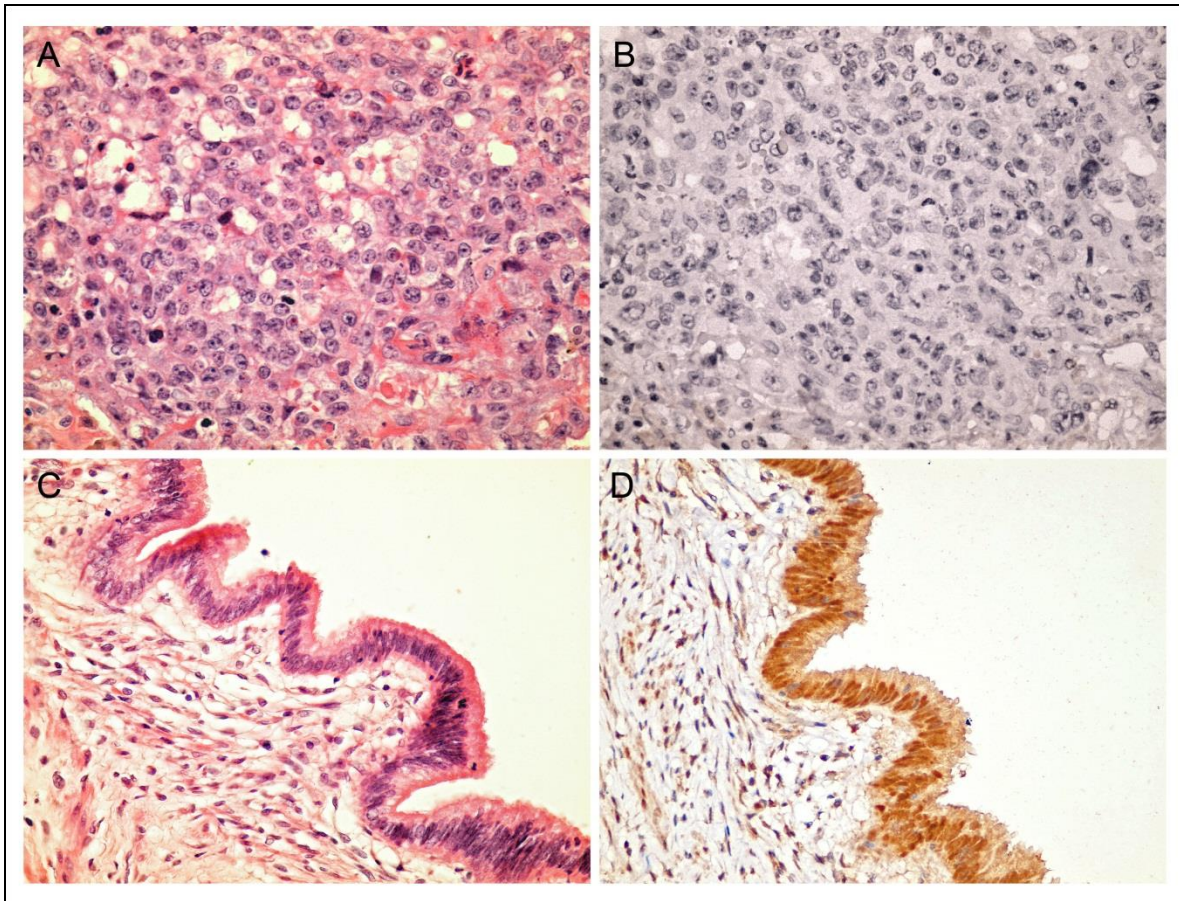


Figura 8. Inmunohistoquímica de ERCC1 en pacientes con TCGT. A) Tinción con H&E de una muestra con subtipo histológico de seminoma. B) Negativo de ERCC1 en un tumor (seminoma). C) Tinción con H&E de un muestra con subtipo histológico de teratoma. D) Tinción positiva de ERCC1 (intensidad 3) en un tumor (teratoma), aquí se muestra como control interno las células del estroma negativas para ERCC1. Magnificación 400X.

De los 76 pacientes sensibles al tratamiento con cisplatino, 59 (77.6) fueron negativos para ERCC1 y 17 (22.4%) fueron positivos para ERCC1 ($p=0.05$). La presencia de la tinción nuclear de ERCC1 se asocia con la no-sensibilidad a cisplatino. Las características clínicas de los pacientes con TCGT no seminomas de acuerdo a la respuesta al tratamiento con quimioterapia basada en cisplatino se resume en la tabla 3.

| | Sensibles | No-sensibles | |
|--------------------------|--------------|--------------|---------|
| | n=76 | n=32 | |
| | n (%) | n (%) | p |
| Edad | 23.96 ± 4.58 | 24.46 ± 6.40 | 0.64 |
| Clasificación IGCCCG | | | |
| Buen Pronóstico | 40 (52.63) | 1 (3.13) | |
| Pronóstico Intermedio | 23 (30.26) | 10 (31.25) | < 0.001 |
| Pobre Pronóstico | 13 (17.11) | 21 (65.63) | |
| Presencia ERCC1 IHQ | | | |
| Positiva | 17 (22.37) | 13 (40.63) | |
| Negativa | 59 (77.63) | 19 (59.38) | 0.05 |
| SNP <i>ERCC1</i> 8092C>A | | | |
| C/C | 30 (40.54) | 12 (38.71) | |
| C/A | 30 (40.54) | 14 (45.16) | 0.89 |
| A/A | 14 (18.92) | 5 (16.13) | |

| SNP XPA 5'UTR | | | |
|---------------|------------|------------|------|
| A/A | 9 (11.84) | 3 (9.68) | |
| A/G | 43 (56.58) | 18 (58.06) | 0.94 |
| G/G | 24 (31.58) | 10 (32.26) | |

Tabla 3. Características clínicas de los pacientes con TCGT-ns de acuerdo con la respuesta clínica al tratamiento con quimioterapia basada en cisplatino.

El análisis bivariado muestra que los pacientes ERCC1-positivos tienen un OR (odd ratio por sus siglas en inglés) 2.37 veces mayor de no-sensibilidad al tratamiento con quimioterapia basado en cisplatino, comparado con los pacientes ERCC1-negativo ($p=0.05$). En el modelo multivariado, el OR de los pacientes ERCC1-positivos fue 2.95 veces mayor (IC 95% 0.97-8.97; $p=0.05$) ajustado con el grupo pronóstico de los pacientes. Los resultados del modelo de regresión logística de los pacientes con TCGT no seminomas y la no-sensibilidad al tratamiento con quimioterapia basado en cisplatino se observa en la tabla 4.

| | OR | Intervalo de confianza 95% | P |
|---------------------------|------|----------------------------|------|
| Análisis Bivariado | | | |
| Presencia ERCC1 IHQ | | | |
| Positiva | 2.37 | (0.97-5.77) | 0.05 |
| Negativa | 1 | | |

| Clasificación IGCCCG | | | |
|-----------------------|------|-------------|---------|
| Buen Pronóstico | 0.01 | (0-0.12) | < 0.001 |
| Pronóstico Intermedio | 0.26 | (0.09-0.74) | < 0.001 |
| Pobre Pronóstico | 1 | | |

Análisis Multivariado

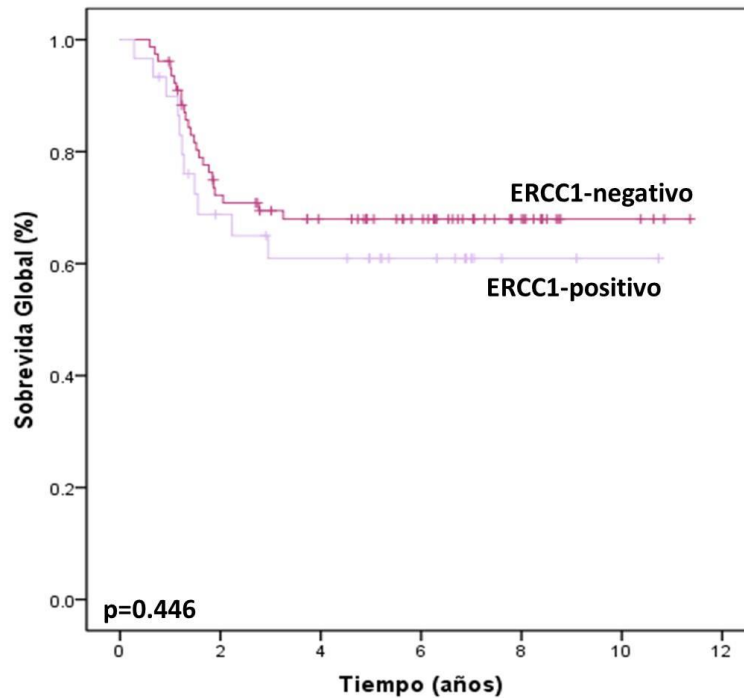
| Presencia ERCC1 IHQ | | | |
|---------------------|------|-------------|------|
| Positiva | 2.95 | (0.97-8.97) | 0.05 |
| Negativa | 1 | | |

Clasificación IGCCCG

| | | | |
|-----------------------|-------|-------------|---------|
| Buen Pronóstico | 0.01 | (0-0.11) | < 0.001 |
| Pronóstico Intermedio | 0.241 | (0.08-0.70) | < 0.001 |
| Pobre Pronóstico | 1 | | |

Tabla 4. Modelo de regresión logística de ERCC1 y la clasificación pronóstica (IGCCCG) asociados con la no-sesibilidad de la quimioterapia basada en cisplatino de pacientes con TCGT-ns.

Se asoció la presencia de ERCC1 con la supervivencia global de los pacientes mediante una curva de Kaplan-Meier y no encontramos un impacto en la supervivencia ($p=0.446$, Breslow)(Gráfica 8).



Gráfica 8. Kaplan-Meier. Curva de sobrevida global con respecto a la presencia de ERCC1 de pacientes con TCGT. El valor de p muestra la diferencia en los grupos con la prueba de Breslow.

El análisis bivariado demuestra que los pacientes ERCC1-positivos poseen un HR (hazard ratio por sus siglas en inglés) de muerte 1.31 veces mayor comparado con los pacientes ERCC1-negativos (IC 95% 0.645-2.682, $p=0.448$). Utilizando el modelo de Cox para el análisis multivariado, ajustado al grupo pronóstico y la respuesta al tratamiento con quimioterapia basada en cisplatino, se observó una efecto de interacción entre la presencia de ERCC1 y la respuesta al cisplatino por lo que se decidió realizar el análisis incluyendo los subgrupos entre estas dos variables.

Se realizaron 4 subgrupos: a) ERCC1-positivos y no-sensibles (no-CPS)(13/108), b) ERCC1-positivos y sensibles (CPS)(17/108), c) ERCC1-negativos y sensibles (59/108) y d) ERCC1-negativos y no-sensibles (19/108). La mediana de sobrevida fue menor en aquellos pacientes no-sensibles ERCC1-positivos (1.27 años) y no-sensibles ERCC1-negativos (1.30 años) comparados con los pacientes sensibles que tienen una media de sobrevida de 6.31 años (independientemente de su condición en ERCC1). Los resultados de la regresión logística, se muestran en la siguiente tabla.

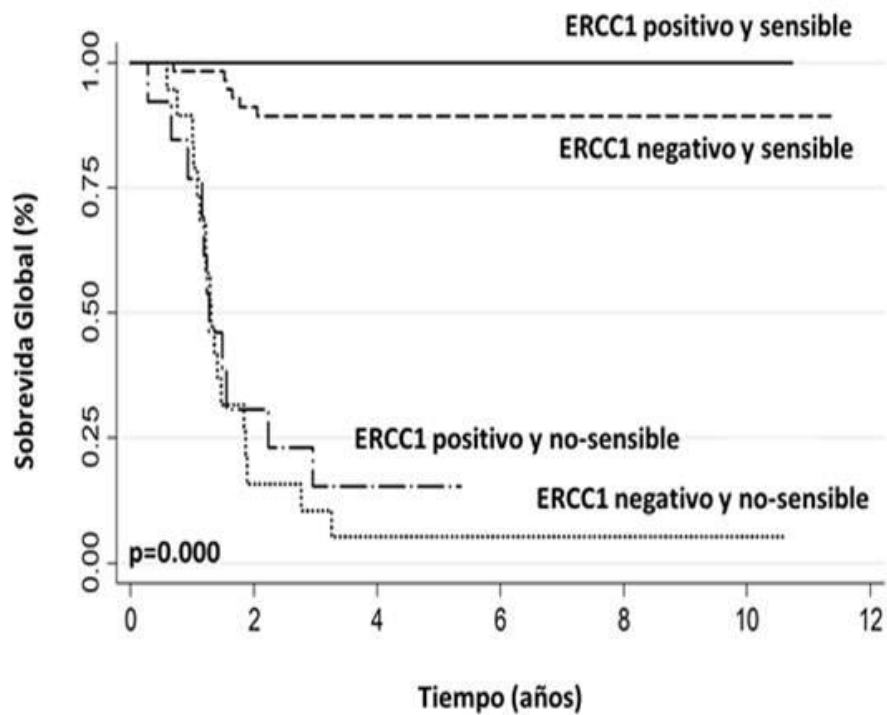
| | HR | Intervalo de Confianza 95% | p |
|--|-------|-------------------------------|---------|
| Análisis Bivariado | | | |
| IHQ ERCC1 y CPS/no-CPS ^a | | | |
| Positivo y no-CPS | 17.06 | (6.24-46.62) | < 0.001 |
| Negativo y no-CPS | 20.75 | (8.06-53.42) | < 0.001 |
| Negativo y CPS | 1 | | |
| Clasificación IGCCCG | | | |
| Buen Pronóstico | 0.06 | (0.01-0.26) | < 0.001 |
| Pronóstico Intermedio | 0.63 | (0.31-1.26) | 0.19 |
| Pobre Pronóstico | 1 | | |
| Análisis Multivariado | | | |
| IHQ ERCC1 y CPS/np-CPS ^a | | | |
| Positivo y no-CPS | 11.86 | (3.88-36.21) | < 0.001 |
| Negativo y no-CPS | 14.43 | (4.98-41.81) | < 0.001 |
| Negativo y CPS | 1 | | |

| Clasificación IGCCCG | | | |
|-----------------------|------|-------------|------|
| Buen Pronóstico | 0.38 | (0.07-2.05) | 0.26 |
| Pronóstico Intermedio | 0.92 | (0.45-1.91) | 0.84 |
| Pobre Pronóstico | 1 | | |

^a Los valores del HR y el intervalo de confianza no pudieron ser estimados para el grupo de pacientes ERCC1-positivos y CPS, debido a que no se presentaron muertes.

Tabla 5. Riesgos relativos de muerte por cáncer en un modelo de Cox ajustado con el grupo pronóstico de los pacientes TCGT-ns tratados con quimioterapia basada en cisplatino.

En la curva de Kaplan-Meier se muestra una supervivencia global a 5 años menor en los pacientes ERCC1-negativos y no sensibles (5.26%) comparado con los pacientes ERCC1-positivos y no-sensibles (15.38%); a 5 años de seguimiento, se encuentran vivos todos los pacientes ERCC1-positivos y sensibles (100%) comparados con el 89.3% de los pacientes ERCC1-negativos y sensibles. La supervivencia global a 5 años de los pacientes ERCC1-negativos y sensibles (89.3%) es mayor que aquellos pacientes ERCC1-positivos y no-sensibles (15.38%) ($p < 0.001$) (Gráfica 9).



Gráfica 9. Kaplan-Meier. Curva de supervivencia global con respecto a la presencia de ERCC1 y la respuesta a cisplatino de pacientes con TCGT. El valor de p muestra la diferencia en los grupos con la prueba de Breslow.

Como se puede observar, no se observa un impacto de la presencia de ERCC1 mediante la técnica de inmunohistoquímica en la supervivencia global de los pacientes con TCGT-ns tratados con quimioterapia basada en cisplatino, muy probable, debido a que se encuentra afectada por múltiples factores que no fueron medidos en este estudio y no sólo a la respuesta al tratamiento con la primera línea de tratamiento con quimioterapia o BEP. Ciertamente, nosotros evaluamos el efecto directo que tendría ERCC1 en la respuesta al tratamiento con BEP, sin importarnos las segundas o terceras líneas de tratamiento con quimioterapia, las cuales se sabe, poseen un impacto en la supervivencia global de los pacientes. La asociación directa que vemos entre la ausencia de ERCC1 y la sensibilidad al tratamiento con BEP es probable que se deba a deficiencias en la maquinaria de reparación por escisión de nucleótidos, particularmente en respuesta a una disminución de la proteína ERCC1.

DISCUSIÓN

La reparación por escisión de nucleótidos es la vía responsable de reparar los aductos formados por el cisplatino con el DNA, este mecanismo consta de varios complejos proteicos encargados del reconocimiento, escisión y reparación del DNA dañado. En estudios *in vitro* se han asociado, deficiencias en los mecanismos de reparación del cisplatino con la sensibilidad al tratamiento con cisplatino en líneas celulares derivadas de cáncer de testículo ^{46,55,56}. En este estudio, nosotros evaluamos la asociación entre las proteínas de reparación del DNA ERCC1 y XPA, así como los polimorfismos 8092C>A de *ERCC1* y 5'UTR de *XPA* con la respuesta al tratamiento con quimioterapia basado en cisplatino y la sobrevida de los pacientes con TCGT no seminomas.

Los niveles de expresión de *ERCC1* y *XPA* en muestras de pacientes con TCGT no seminomas vírgenes al tratamiento con quimioterapia (BEP) obtenidas de dos diferentes poblaciones, confirman el importante papel de *ERCC1* en la sensibilidad de los TCGT al tratamiento con cisplatino. Nuestros resultados sugieren un papel de *ERCC1* en la respuesta al tratamiento con quimioterapia basada en cisplatino en dos cohortes independientes. Estudios previos, han analizado la expresión de ERCC1-XPF en pacientes con TCGT por southern blot y se observó un incremento en la expresión de *ERCC1* en TCGT no seminomas, comparado con los TCGT seminomas y testículo normal⁶⁵. En pacientes con cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, asociaron una sobre-expresión de *ERCC1* y *XPA* con la resistencia clínica al cisplatino y un pobre pronóstico ^{54,66-68}.

La importancia de *ERCC1* y no de *XPA* en la sensibilidad de los pacientes con TCGT, se corroboró con la determinación de la proteína ERCC1 por inmunohistoquímica, en donde se observó una tinción nuclear en 30/108 pacientes, siendo estadísticamente significativa la presencia de la proteína ERCC1 con la sensibilidad al tratamiento con cisplatino ($p=0.05$); sin embargo, nosotros no encontramos un impacto de la presencia de la proteína ERCC1 en la sobrevida global de los paciente, la cual ha sido reportada en estudios anteriores ser significativamente mayor en pacientes con cáncer gástrico ERCC1-negativos ⁶⁹. Por otro lado, se observó la localización de ERCC1 en el citoplasma de las células, lo cual nos sugiere que la ineficiencia de esta proteína no es

absolutamente debido a la disminución del RNAm, sino que pudiera existir un problema en la localización, motivo por el cual no podría realizar su función de manera adecuada (datos no reportados).

La sobre-expresión de *ERCC1* y la presencia de la proteína ERCC1 en pacientes no-sensibles a cisplatino nos habla de una asociación de los niveles de ERCC1 con deficiencias en el mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos, relacionada con la capacidad de reparación del daño provocado por el cisplatino en el DNA y como consecuencia, una respuesta comprometida de estos pacientes al tratamiento con quimioterapia basada en cisplatino. Por otro lado, no encontramos una asociación de *XPA* con la respuesta al tratamiento con cisplatino dado que no encontramos diferencias en los niveles de expresión que pudieran estar afectando la respuesta de estos pacientes. Estos resultados realizados en muestras frescas de tumor nos hablan del importante papel que juega *ERCC1* pero no *XPA* en la sensibilidad de los TCGT no seminomas.

La respuesta al tratamiento con quimioterapia basado en cisplatino y la presencia de ERCC1 resultaron ser dos factores pronósticos involucrados en la sobrevida de los pacientes con TCGT; la interacción entre estos factores observada en el análisis multivariado, demuestra la importancia de determinar la presencia de ERCC1 en pacientes no-sensibles a cisplatino. Sin embargo, permanece sin explicarse, el por qué los pacientes que son negativos para ERCC1 y no sensibles al tratamiento con cisplatino no sobreviven a la enfermedad, sugiriendo que este grupo de pacientes poseen otros factores que no fueron evaluados en este estudio, que los hacen ser resistentes.

Para nuestro conocimiento, este es el primer estudio en determinar los polimorfismos 8092C>A de *ERCC1* y 5'UTR de *XPA* en pacientes con TCGT no seminomas. Estudios previos han reportado en pacientes con cáncer de pulmón tratados con cisplatino una asociación entre el polimorfismo 8092C>A de *ERCC1* con una menor sobrevida global⁶²; por otro lado, el polimorfismo 5'UTR de *XPA* se ha asociado a una disminución en la sobrevida global y a la sobrevida libre de enfermedad de mujeres con cáncer de ovario tratadas con quimioterapia basada en cisplatino⁶³. Contrariamente a estos estudios, nosotros no encontramos una asociación entre los polimorfismos 8092C>A de

ERCC1 y 5'UTR de *XPA* con la respuesta al tratamiento con quimioterapia basado en cisplatino y la sobrevida de los pacientes diagnosticados con TCGT no seminomas.

Los hallazgos encontrados en este estudio, deben de ser confirmados en un estudio prospectivo para definir como debería de utilizarse el cisplatino como parte de un esquema de quimioterapia para los pacientes con TCGT no seminomas con enfermedad avanzada, en función a la presencia de *ERCC1*. Más importante aún, sería de extrema importancia identificar a los pacientes potencialmente no-sensibles al cisplatino, para así, disminuir la toxicidad provocada por el fármaco y mejorando la calidad de vida del paciente, evitando los eventos adversos asociados a este agente. A la fecha, no existe un régimen de quimioterapia diferente que demuestre superioridad al tratamiento estándar con BEP, sin embargo, al ser identificados los pacientes no-sensibles a cisplatino se pudiera emplear un manejo de la enfermedad sin dicho agente para pacientes con TCGT no seminomas con enfermedad avanzada.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio contribuyen al conocimiento del mecanismo de sensibilidad de los tumores de células germinales de testículo y al pronóstico de los pacientes, específicamente, el papel que juegan las proteínas *ERCC1* y *XPA*. Así mismo, la determinación de los polimorfismos 8092C>A de *ERCC1* y 5'UTR de *XPA* en pacientes con TCGT nos proporciona información sobre el posible efecto de estos polimorfismos en la respuesta al tratamiento con cisplatino y la sobrevida de los pacientes; de igual forma nos brinda información sobre la posible función que tienen estos polimorfismos en la expresión de los genes *ERCC1* y *XPA*. Sin embargo, es necesario, realizar experimentos más específicos que nos ayuden a elucidar la función de estos polimorfismos en la reparación del DNA.

Concluimos que los niveles elevados de *ERCC1* se encuentran asociados con la resistencia al tratamiento con quimioterapia basada en cisplatino, sugiriendo que *ERCC1* podría ser utilizado como un potencial indicador de la respuesta al cisplatino y el pronóstico de los pacientes con TCGT no seminomas; por otro lado, los polimorfismos no se asocian con la respuesta o el pronóstico de estos pacientes.

PROTOS

Inmunohistoquímica

1. Desparafinar las laminillas a 60°C durante 30min.
2. Realizar el tren de hidratación del tejido de la siguiente forma: xilol 1, xilol 2, etanol 100%, etanol 100%, etanol 90%, etanol 80%, etanol 70%, etanol 50% y etanol 30%. Durante 5min en cada uno.
3. Realizar un lavado con PBS 1x durante 10min a 4°C.
4. Realizar la recuperación antigénica. Colocar las laminillas en un copling de plástico con el buffer de citratos (10mM citrato de sodio, 0.05% Tween- 20, pH 6.0) a baño maría (95°C-100°C) durante 20min.
5. Retirar el copling y dejarlo a temperatura ambiente (T.A.) durante 5min, posteriormente realizar un lavado con PBS 1x durante 10min a 4°C.
6. Realizar la inhibición de la peroxidasa endógena. Adicionar peróxido de hidrógeno (H₂O₂) diluido al 0.3% en agua bidestilada, incubar durante 10min a T.A., adicionar H₂O₂ diluido al 0.3% en metanol, incubar durante 10min a T.A. finalmente repetir la incubación con el H₂O₂ diluido en agua bidestilada.
7. Realizar 2 lavados con PBS 1x en agitación durante 10min a T.A.
8. Realizar el bloqueo de los epítipes inespecíficos. Adicionar BSA (Fracción V de la albúmina sérica bovina) diluida al 0.25% en PBS 1x e incubar durante 30min a T.A.
9. Adicionar el anticuerpo primario para ERCC1 (dilución 1:1000) e incubar durante toda la noche a 4°C.
10. Realizar 2 lavados con PBS1 x durante 5min a T.A. cada uno.
11. Realizar dos lavados con Tritón 0.1% en PBS 1x durante 2min a T.A. cada uno.
12. Adicionar el anticuerpo secundario universal biotinilizado e incubar durante 30min a T.A.
13. Realizar 2 lavados con PBS 1x en agitación durante 5min a T.A.
14. Adicionar la estreptavidina-HRP e incubar 30min a T.A.
15. Realizar 2 lavados con PBS 1x en agitación durante 5min a T.A.
16. Adicionar el cromógeno DAB (ácido diaminobensoico) e incubar a T.A.
17. Realizar la contratinción de las laminillas con hematoxilina de harris.
18. Realizar dos lavados con agua y colocar las laminillas en baño maría a 50°C

19. Realizar el tren de hidratación de la siguiente manera: etanol 30%, etanol 50%, etanol 70%, etanol 80%, etanol 90%, etanol 100% y xilol
20. Colocar una gota de resina y colocar el cubreobjeto. Dejar secar a T.A.

Viabilidad Celular

Método de Cristal Violeta

1. En una placa de 24 pozos, sembrar 80,000 células por cada pozo de las líneas celulares NT2/D1, 1A6, T-24 y HeLa. Incubar a 37°C en un atmósfera húmeda con 5%CO₂.
2. Adicionar el tratamiento con cisplatino (Technoplatin 1mg/ml, Lab. Columbia) a diferentes concentraciones por triplicado e incubar durante 24h a 37°C en un atmósfera húmeda con 5%CO₂.
3. Eliminar el medio de cultivo y fijar las células con etanol al 70% frío. Incubar durante 10min a -20°C. Dejar la placa secando a T.A.
4. Adicionar 200µl de cristal violeta (violeta de genciana), eliminar y lavar con agua. Dejar secar la placa a T.A. durante toda la noche.
5. Diluir el cristal violeta con 200µl de ácido acético al 33%, tomar 100µl y pasarlos a una placa de 96 pozos. Leer la absorbancia a 570nm en el lector de Elisa.

Extracción de RNA a partir de líneas celulares

(Kit Quiagen No.Catálogo 74104)

1. Sembrar 1x10⁶ células en cajas petri de 60mm de cada línea celular, adicionar el IC₅₀ de cisplatino respectivo. Para analizar los niveles basales de expresión, no adicionar tratamiento. Realizar los experimentos por triplicado.
2. Tripsinizar las células y lavar el botón celular dos veces con PBS 1x.
3. Adicionar el buffer RLT/β-Mercaptoetanol (1ml de buffer RLT/10 µl de β-Mercaptoetanol), resuspender y pasar la muestra por una jeringa de insulina (aguja de 0.9mm).
4. Adicionar 1 volumen (350-600µl dependiendo del tamaño del botón celular) de etanol 70%, mezclar la muestra por pipeteo.

5. Tomar 700µl de la muestra y pasarlo a una mini columna con un tubo colector de 2 ml. Centrifugar a 10,000 rpm durante 15seg. Descartar el sobrenadante. Repetir el procedimiento, hasta finalizar la muestra.
6. Adicionar 700µl del buffer RW1. Centrifugar a 10,000rpm durante 15seg. Descartar el sobrenadante y pasar la mini columna a un nuevo tubo colector.
7. Adicionar 500µl de buffer RPE. Centrifugar a 10,000rpm durante 2min. Descartar el sobrenadante.
8. Pasar la mini columna a un nuevo tubo colector de 2ml y centrifugar a máxima velocidad (19,000rpm) durante 1min.
9. Colocar la mini columna a un tubo de 1.5ml y adicionar 30-50µl (dependiendo del tamaño el botón) de agua libre de RNasa directamente en la membrana de silica-gel. Incubar durante 3min a T.A. y centrifugar a 10,000rpm durante 1min.
10. Cuantificar la concentración y la pureza de RNA en el nano-Drop y almacenar a -70°C. Correr en un gel de agarosa FA 1.2% para observar la integridad del RNA.

Electroforesis de RNA

Buffers

- | | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> ✓ 10x FA gel Buffer <ul style="list-style-type: none"> 200mM MOPS (libre de ácidos) 50mM acetato de sodio 10mM EDTA pH 7.0 con NaOH ✓ Buffer de carga 5x <ul style="list-style-type: none"> 16µl de azul de bromofenol acuoso 80µl 500mM EDTA, pH 8.0 720µl formaldehído 37% (12.3M) 2ml glicerol 100% 3084µl formamida 4ml 10X FA gel Buffer Aforar a 10ml con agua libre de RNasa | <ul style="list-style-type: none"> ✓ 1x Buffer de corrida <ul style="list-style-type: none"> 100mL 10x FA gel Buffer 20mL Formaldehído 37% (12.3M) 880mL Agua libre de RNasa (DEPC) |
|---|--|

Preparación del Gel FA 1.2%

1.2g Agarosa

10ml 10x FA gel Buffer

Aforar a 100ml con Agua libre de RNasa (DEPC)

Fundir la agarosa y dejar enfriar a TA para adicionarle 1.8ml de formaldehído 37% (12.3M).

Antes de correr el gel, equilibrarlo en 1x Buffer de corrida al menos durante 30min.

Preparación de las muestras de RNA

1. Adicionar un volumen de buffer de carga 5x por cada 4 volúmenes de muestra de RNA.
2. Mezclar e incubar durante 5min a 65°C.
3. Pasar a hielo (o cooler de -20°C) para su posterior cargado en el gel.

Síntesis de cDNA

(SuperScript III Platinum. Two-Step qRT-PCR Kit with SYBR Green)

1. Síntesis de cDNA a partir de 500ng de RNA

x1

2x RT Reaction Mix 10µL

RT Enzyme Mix 2µL

RNA (10pg-1ug) -

Agua DEPC Aforar a 20µL

2. Adicionar 12µL de la mezcla a cada tubo. El cual previamente ya tenía el agua DEPC correspondiente.
3. Adicionar los 500ng de RNA
4. Mezclar y colocar en un termociclador con el siguiente programa

| | | | |
|-------|-------|------|-----|
| 25°C | 42°C | 85°C | 4°C |
| 10min | 50min | 5min | ∞ |

5. Pasar los tubitos a hielo y adicionar 1 μ L (2U) de RNasa H de *E. coli* e incubar a 37°C durante 20min en el termociclador.
6. Guardar la reacción a -20°C

Extracción de RNA y DNA a partir de muestras frescas de tumor

(AllPrep DNA/RNA. Quiagen Cat. No. 80204)

1. Homogenizar la muestra con buffer RLT. Para 30mg de muestra, 600 μ l de buffer; y para menos de 20mg de muestra utilizar 350 μ L (en hielo). Si el tejido es muy grande, cortar la muestra en hielo.
2. Centrifugar el lisado durante 3min a máxima velocidad si la muestra proviene de tejido, si proviene de cultivo celular, centrifugar a 10,000rpm durante 30s.
3. Transferir el sobrenadante por pipeteo a la AllPrep DNA column con su tubo de recolección de 2ml. Centrifugar a 10,000rpm durante 30seg.
4. Transferir la columna a un nuevo tubo de recolección de 2ml y reservar a T.A. o a 4°C, para su posterior purificación de DNA.

Purificación de RNA

5. Adicionar al filtrado del paso anterior, un volumen (350 o 600 μ l) de etanol al 70%, mezclar mediante pipeteo.
6. Transferir 700 μ l de la mezcla anterior (incluyendo cualquier precipitado) a la RNeasy spin column con su tubo de recolección de 2mL. Centrifugar a 10,000rpm durante 30seg. Repetir el paso hasta agotar la mezcla del paso 5.
7. Adicionar 500 μ l de buffer RW1 a la columna. Centrifugar a 10,000rpm durante 30seg, remover la columna con cuidado, descartar el filtrado asegurándose de vaciarla completamente.
8. Adicionar 500 μ l de buffer RPE a la columna. Centrifugar a 10,000rpm durante 30seg, descartar el filtrado.
9. Adicionar 500 μ l de buffer RPE a la columna. Centrifugar a 10,000rpm durante 2min, descartar el filtrado.

10. (Opcional). Colocar la columna en un tubo nuevo de recolección de 2ml. Centrifugar 1min a máxima velocidad.
11. Colocar la columna en un tubo de recolección de 1.5ml y adicionar de 30 a 50µl de agua libre de RNAsas directamente en la membrana. Incubar a T.A. durante 3min y centrifugar a 10,000rpm durante 1min. Utilizar el filtrado para repetir el paso.
12. Cuantificar la concentración y la pureza de RNA en el nano-Drop y almacenar a -70°C. Correr en un gel de agarosa FA 1.2% para observar la integridad del RNA.

Purificación de DNA

1. Adicionar 500µl de buffer AW1 a la AllPrep DNA spin column reservada en el paso 4. Centrifugar a 10,000rpm durante 30seg, descartar el filtrado.
2. Adicionar 500µl de buffer AW2 a la columna. Centrifugar 2min a máxima velocidad, sacar la columna con cuidado, sin humedecerla nuevamente y descartar el filtrado.
3. Colocar la columna en un tubo de recolección de 1.5ml y adicionar 50µl de buffer EB directamente en la membrana. Incubar a T.A. durante 3min y centrifugar a 10,000rpm durante 1min. Utilizar el filtrado para repetir el paso.
4. Cuantificar la concentración y la pureza de DNA en el nano-Drop y almacenar a -20°C.

Extracción de DNA a partir de sangre periférica

(Método del FBI modificado)

1. Adicionar 4ml de buffer SSC 1x a 5ml de sangre periférica, mezclar por inversión. Centrifugar a 3,500rpm durante 8min.
2. Retirar 5ml del sobrenadante y adicionar 5ml de buffer SSC 1x. Mezclar por inversión y centrifugar a 3,500rpm durante 8min.
3. Remover todo el sobrenadante y adicionar 1ml de buffer SSC 1x. centrifugar a 3,500rpm durante 8min.
4. Eliminar el sobrenadante y adicionar 500µl de acetato de sodio 0.2M. Mezclar por inversión.
5. Adicionar 1.4ml de acetato de sodio 0.2M y mezclar por inversión.

6. Adicionar 125µl de SDS 10% y 30µl de proteinasa K (20mg/ml). Mezclar adecuadamente e incubar a 55°C durante toda la noche.
7. Adicionar 600µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) mezclar por inversión y centrifugar a 3,500rpm durante 8min.
8. Recuperar la fase acuosa en un tubo nuevo. Adicionar 600µl de cloroformo y centrifugar a 3,500rpm durante 8min.
9. Recuperar la fase acuosa en un tubo nuevo y adicionar 2 ½ volúmenes de etanol 100% frío
10. Recuperar el DNA por la técnica de 'spooling' y pasar el material a un tubo eppendorf de 1.5ml.
11. Adicionar 1ml de etanol 70% frío y centrifugar a 12,000rpm durante 2min.
12. Eliminar TODO el etanol y secar el botón a 55°C durante aproximadamente 5min.
13. Resuspender el botón en 500µl-1ml (dependiendo del tamaño del botón) en TE (Tris 10mM/EDTA 0.1M). Incubar a baño maría a 55°C durante 24h.
14. Cuantificar la concentración y la pureza de DNA en el nano-Drop y almacenar a -20°C.

Extracción de DNA a partir de muestras de tejido tumoral embebidas en bloques de parafina

1. Agregar 1ml de octano a 3 cortes de 20µM. Vortexear vigorosamente y colocar en el termoblock en agitación a 50°C durante 10min.
2. Centrifugar a 13,000rpm durante 5min a 25°C, eliminar el sobrenadante y repetir el paso 1 y 2 dos veces más.
3. Adicionar 1ml de etanol 100% y centrifugar a 12,000rpm durante 5min a 25°C. Eliminar el sobrenadante y repetir este paso tres veces más.
4. Agregar 500µl de etanol 70% y centrifugar a 12,000rpm durante 5min a 25°C. Eliminar el sobrenadante y repetir el paso dos veces más.
5. Eliminar TODO el etanol y colocar en el termoblock a 50°C .
6. Resuspender el tejido en 350µl de buffer de lisis y 7µl de proteinasa K (20mg/ml) e incubar en baño maría a 55°C de 1-5 días.

Buffer de Lisis (50mM Tris HCl pH 8.5, 1mM EDTA, 0.5% Tween-20)

7. Adicionar 350µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y centrifugar a 14,000rpm durante 5min a 25°C.
8. Recuperar la fase acuosa y pasarla a un tubo nuevo. Adicionar 350µl de cloroformo y vortexear suavemente durante 30seg.
9. Centrifugar a 14,000rpm durante 5min 25°C y recuperar la fase acuosa en un tubo nuevo.
10. Adicionar 1/10 de acetato de sodio 3M y de este volumen total, agregar 2 ½ volúmenes de etanol 100% frío. Vortexear e incubar a -20°C durante toda la noche.
11. Centrifugar a 14,000rpm durante 10min a 4°C y eliminar el sobrenadante.
12. Adicionar 1ml de etanol 70% frío y centrifugar a 14,000rpm durante 10min a 4°C.
13. Eliminar TODO el etanol y colocar en el termoblock a 55°C durante aproximadamente 5min.
15. Resuspender el botón en 50µl de TE (Tris 10mM/EDTA 0.1M). Incubar a baño maría a 55°C durante 24h.
16. Cuantificar la concentración y la pureza de DNA en el nano-Drop y almacenar a -20°C.

Ensayo de Fosforilación de H2A. X

(UPSTATE No. Catálogo 17-344)

Cultivo celular

1. El kit necesita 2×10^6 células. Tratar las células con agentes que dañen el DNA.
Se debe de contar con un control positivo (células dañadas con luz UV), para esto se radian las células sin tapa y con el flujo encendido en la campana de cultivo durante 1h) se hace un lavado con PBS 1x y se cambia el medio de cultivo. Incubar a 37°C en un atmósfera con 5%CO₂
2. Después del tratamiento con el periodo de tiempo deseado. Remover el medio y lavar dos veces con un 1 volumen de PBS 1x que sea 3 veces el volumen inicial de medio de cultivo utilizado.
3. Desprender las células con tripsina, centrifugar a 2,000rmp durante 5min y obtener el botón celular.

4. Resuspender en 1ml de PBS 1x y contar las células. La fijación y el protocolo siguiente requiere de 2×10^6 células. Tomar las células necesarias y pasarlas a los tubos para citometría.

Fijación celular y análisis FACS

1. Centrifugar 12,000rpm durante 5min. Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet con una densidad de 2×10^6 células/ml en una solución de Fijación 1x ($50 \mu\text{l}$ por 1×10^5 células \rightarrow 1ml por 2×10^6 células)
2. Para fijar las células, incubar en hielo durante 20min.
3. Lavar las células dos veces con un 1 volumen de PBS 1x que sea 3 veces el volumen inicial de medio de cultivo utilizado.
4. Eliminar el PBS 1x de los lavados y adicionar 1ml de PBS 1x (la suspensión celular tiene 2×10^6 células), resuspender y tomar 500,000 células para continuar con el protocolo.
Ojo: Tomar en cuenta, que hay que meter 1 tubo más que va a ser el control negativo (anticuerpo IgG-FITC mouse).
5. Centrifugar 12,000rpm durante 5min, eliminar el sobrenadante.
6. Resuspender gentilmente el pellet celular con una solución de Permeabilización 1x ($50 \mu\text{l}$ por 1×10^5 células \rightarrow $250 \mu\text{l}$ por 500,000 células). Incubar en hielo durante 5min.
7. Adicionar $3 \mu\text{l}$ de cualquiera de los dos anticuerpos, anti-fosfo-histona H2A.X (Ser139) (#catálogo 16-202) conjugado a FITC o el control negativo mouse IgG-conjugado a FITC (#catálogo12-487) a cada tubo. Incubar en hielo durante 20min; agitarlas células ocasionalmente.
8. Adicionar $100 \mu\text{l}$ de la solución de Lavado 1x por tubo, centrifugar a 1,200rpm durante 5min y eliminar el sobrenadante. Repetir el paso 2 veces más.
9. Resuspender el pellet celular marcado en $150 \mu\text{l}$ de buffer FACS. Correr las muestras en la máquina FACS.

REFERENCIAS

- 1 Bosl GJ, M. R. Testicular germ-cell cancer. *The New England journal of medicine* **Jul 24;337**, 242-253 (1997).
- 2 Carlson. *Embriología Humana y Biología del Desarrollo*. 2ª Ed. Ediciones Harcourt edn, (2000).
- 3 Mannuel, H. D., Mitikiri, N., Khan, M. & Hussain, A. Testicular germ cell tumors: biology and clinical update. *Curr Opin Oncol* **24**, 266-271, doi:10.1097/CCO.0b013e32835167fc (2012).
- 4 Globocan. Testis cancer incidence and mortality worldwide in 2008. <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/lung/asp> (2008).
- 5 Diamantopoulos, N. & Kortsaris, A. Testicular germ cell tumors. *J BUON* **15**, 421-434 (2010).
- 6 Mannuel, H. D., Mitikiri, N. & Hussain, A. Update on testicular germ cell tumors. *Current opinion in oncology* **23**, 265-270, doi:10.1097/CCO.0b013e32834579f0 (2011).
- 7 Jemal, A., Siegel, R., Xu, J. & Ward, E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* **60**, 277-300, doi:10.3322/caac.20073
caac.20073 [pii] (2010).
- 8 Dearnaley, D. P., Huddart, R. A. & Horwich, A. Regular review: Managing testicular cancer. *BMJ* **322**, 1583-1588 (2001).
- 9 Gori, S. *et al.* Germ cell tumours of the testis. *Crit Rev Oncol Hematol* **53**, 141-164, doi:S1040842804001039 [pii]
10.1016/j.critrevonc.2004.05.006 (2005).
- 10 Schnack, T. H., Poulsen, G., Myrup, C., Wohlfahrt, J. & Melbye, M. Familial coaggregation of cryptorchidism, hypospadias, and testicular germ cell cancer: a nationwide cohort study. *J Natl Cancer Inst* **102**, 187-192, doi:10.1093/jnci/djp457
djp457 [pii] (2010).
- 11 Greene, M. H. *et al.* Familial testicular germ cell tumors in adults: 2010 summary of genetic risk factors and clinical phenotype. *Endocr Relat Cancer* **17**, R109-121, doi:10.1677/ERC-09-0254
ERC-09-0254 [pii] (2010).
- 12 Mostert, M. C. *et al.* Identification of the critical region of 12p over-representation in testicular germ cell tumors of adolescents and adults. *Oncogene* **16**, 2617-2627, doi:10.1038/sj.onc.1201787 (1998).
- 13 Looijenga, L. H. *et al.* Gonadal tumours and DSD. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **24**, 291-310, doi:10.1016/j.beem.2009.10.002
S1521-690X(09)00139-0 [pii] (2010).
- 14 Skakkebaek, N. E., Berthelsen, J. G. & Muller, J. Carcinoma-in-situ of the undescended testis. *Urol Clin North Am* **9**, 377-385 (1982).
- 15 Cockburn, A. G., Vugrin, D., Batata, M., Hajdu, S. & Whitmore, W. F. Poorly differentiated (anaplastic) seminoma of the testis. *Cancer* **53**, 1991-1994 (1984).
- 16 Porcaro, A. B. *et al.* Management of testicular seminoma advanced disease. Report on 14 cases and review of the literature. *Arch Ital Urol Androl* **74**, 81-85 (2002).

- 17 Al Ghamdi, A. M. & Jewett, M. A. Stage I nonseminomatous germ cell tumors: the case for management by risk stratification. *Can J Urol* **12 Suppl 1**, 62-65; discussion 103-104 (2005).
- 18 Tummala, M. K. & Hussain, A. Recent developments in germ cell tumors of the testes. *Current opinion in oncology* **20**, 287-293, doi:10.1097/CCO.0b013e3282f8b064 (2008).
- 19 Javadpour, N. The role of biologic tumor markers in testicular cancer. *Cancer* **45**, 1755-1761 (1980).
- 20 Cedillo, J. M. Marcadores tumorales séricos . Aplicación Clínica Serum tumor markers . Clinical application. **3** (2004).
- 21 International Germ Cell Consensus Classification: a prognostic factor-based staging system for metastatic germ cell cancers. International Germ Cell Cancer Collaborative Group. *J Clin Oncol* **15**, 594-603 (1997).
- 22 Classen, J., Souchon, R., Hehr, T. & Bamberg, M. Treatment of early stage testicular seminoma. *J Cancer Res Clin Oncol* **127**, 475-481 (2001).
- 23 van Leeuwen, F. E. *et al.* Second cancer risk following testicular cancer: a follow-up study of 1,909 patients. *J Clin Oncol* **11**, 415-424 (1993).
- 24 Shelley, M. D., Burgon, K. & Mason, M. D. Treatment of testicular germ-cell cancer: a cochrane evidence-based systematic review. *Cancer Treat Rev* **28**, 237-253, doi:S0305737202000592 [pii] (2002).
- 25 Farmakis, D., Pectasides, M. & Pectasides, D. Recent advances in conventional-dose salvage chemotherapy in patients with cisplatin-resistant or refractory testicular germ cell tumors. *Eur Urol* **48**, 400-407, doi:S0302-2838(05)00269-1 [pii] 10.1016/j.eururo.2005.04.024 (2005).
- 26 Sirohi, B. & Huddart, R. The management of poor-prognosis, non-seminomatous germ-cell tumours. *Clin Oncol* **17**, 543-552 (2005).
- 27 Jones, R. H. & Vasey, P. A. Part II: testicular cancer--management of advanced disease. *Lancet Oncol* **4**, 738-747, doi:S1470204503012798 [pii] (2003).
- 28 Wong, E. & Giandomenico, C. M. Current status of platinum-based antitumor drugs. *Chem Rev* **99**, 2451-2466, doi:cr980420v [pii] (1999).
- 29 Kostova, I. Platinum complexes as anticancer agents. *Recent patents on anti-cancer drug discovery* **1**, 1-22 (2006).
- 30 Jamieson, E. R. & Lippard, S. J. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chemical reviews* **99**, 2467-2498 (1999).
- 31 Cohen, S. M. & Lippard, S. J. Cisplatin: from DNA damage to cancer chemotherapy. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **67**, 93-130 (2001).
- 32 Kartalou, M. & Essigmann, J. M. Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins. *Mutat Res* **478**, 1-21, doi:S0027510701001427 [pii] (2001).
- 33 Sorenson, C. M. & Eastman, A. Mechanism of cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced cytotoxicity: role of G2 arrest and DNA double-strand breaks. *Cancer Res* **48**, 4484-4488 (1988).
- 34 Jordan, P. & Carmo-Fonseca, M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci* **57**, 1229-1235 (2000).
- 35 Koberle, B., Tomicic, M. T., Usanova, S. & Kaina, B. Cisplatin resistance: preclinical findings and clinical implications. *Biochim Biophys Acta* **1806**, 172-182, doi:10.1016/j.bbcan.2010.07.004 S0304-419X(10)00054-5 [pii] (2010).

- 36 Horwich, A., Shipley, J. & Huddart, R. Testicular germ-cell cancer. *Lancet* **367**, 754-765, doi:10.1016/S0140-6736(06)68305-0 (2006).
- 37 Kartalou, M. & Essigmann, J. M. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat Res* **478**, 23-43, doi:S0027510701001415 [pii] (2001).
- 38 Rabik, C. A. & Dolan, M. E. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev* **33**, 9-23, doi:S0305-7372(06)00171-X [pii] 10.1016/j.ctrv.2006.09.006 (2007).
- 39 Sark, M. W. *et al.* Cellular basis for differential sensitivity to cisplatin in human germ cell tumour and colon carcinoma cell lines. *Br J Cancer* **71**, 684-690 (1995).
- 40 Parris, C. N., Walker, M. C., Masters, J. R. & Arlett, C. F. Inherent sensitivity and induced resistance to chemotherapeutic drugs and irradiation in human cancer cell lines: relationship to mutation frequencies. *Cancer Res* **50**, 7513-7518 (1990).
- 41 Masters, J. R. *et al.* Sensitivity of testis tumour cells to chemotherapeutic drugs: role of detoxifying pathways. *Eur J Cancer* **32A**, 1248-1253 (1996).
- 42 Meijer, C. *et al.* Role of metallothionein in cisplatin sensitivity of germ-cell tumours. *Int J Cancer* **85**, 777-781, doi:10.1002/(SICI)1097-0215(20000315)85:6<777::AID-IJC6>3.0.CO;2-D [pii] (2000).
- 43 Kersemaekers, A. M. *et al.* Role of P53 and MDM2 in treatment response of human germ cell tumors. *J Clin Oncol* **20**, 1551-1561 (2002).
- 44 Masters, J. R. & Koberle, B. Curing metastatic cancer: lessons from testicular germ-cell tumours. *Nat Rev Cancer* **3**, 517-525, doi:10.1038/nrc1120 nrc1120 [pii] (2003).
- 45 Kelland, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* **7**, 573-584, doi:nrc2167 [pii] 10.1038/nrc2167 (2007).
- 46 Köberle, B. *et al.* DNA repair capacity and cisplatin sensitivity of human testis tumour cells. *Int J Cancer* **70**, 551-555, doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19970304)70:5<551::AID-IJC10>3.0.CO;2-G [pii] (1997).
- 47 Wood, R. D., Laboratories, C. H. & Mimms, S. Nucleotide Excision Repair in Mammalian Cells. *Biochemistry*, 23465-23468 (1997).
- 48 Wood, R. D., Mitchell, M. & Lindahl, T. Human DNA repair genes , 2005. *Mutat Res* **577**, 275-283, doi:10.1016/j.mrfmmm.2005.03.007 (2005).
- 49 Kamileri, I., Karakasilioti, I. & Garinis, G. A. Nucleotide excision repair: new tricks with old bricks. *Trends Genet* **28**, 566-573, doi:10.1016/j.tig.2012.06.004 S0168-9525(12)00093-5 [pii] (2012).
- 50 Dabholkar, M., Vionnet, J., Bostick-Bruton, F., Yu, J. J. & Reed, E. Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy. *J Clin Invest* **94**, 703-708, doi:10.1172/JCI117388 (1994).
- 51 Ferry, K. V., Hamilton, T. C. & Johnson, S. W. Increased nucleotide excision repair in cisplatin-resistant ovarian cancer cells: role of ERCC1-XPF. *Biochemical pharmacology* **60**, 1305-1313 (2000).
- 52 Selvakumaran, M., Pisarcik, D. A., Bao, R., Yeung, A. T. & Hamilton, T. C. Enhanced cisplatin cytotoxicity by disturbing the nucleotide excision repair pathway in ovarian cancer cell lines. *Cancer Res* **63**, 1311-1316 (2003).

- 53 Wu, X., Fan, W., Xu, S. & Zhou, Y. Sensitization to the cytotoxicity of cisplatin by transfection with nucleotide excision repair gene xeroderma pigmentosum group A antisense RNA in human lung adenocarcinoma cells. *Clin Cancer Res* **9**, 5874-5879 (2003).
- 54 Olausson, K. a., Fouret, P. & Kroemer, G. ERCC1-specific immunostaining in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* **357**, 1559-1561, doi:10.1056/NEJMc072007 (2007).
- 55 Köberle, B., Payne, J., Grimaldi, K. a., Hartley, J. a. & Masters, J. R. DNA repair in cisplatin-sensitive and resistant human cell lines measured in specific genes by quantitative polymerase chain reaction. *Biochem Pharmacol* **52**, 1729-1734 (1996).
- 56 Köberle, B., Masters, J. R., Hartley, J. a. & Wood, R. D. Defective repair of cisplatin-induced DNA damage caused by reduced XPA protein in testicular germ cell tumours. *Curr Biol* **9**, 273-276 (1999).
- 57 Welsh, C. *et al.* Reduced levels of XPA, ERCC1 and XPF DNA repair proteins in testis tumor cell lines. *Int J Cancer* **110**, 352-361, doi:10.1002/ijc.20134 (2004).
- 58 Honecker, F. Xeroderma Pigmentosum Group A Protein and Chemotherapy Resistance in Human Germ Cell Tumors. *Lab Invest* **83**, 1489-1495, doi:10.1097/01.LAB.0000090221.95883.41 (2003).
- 59 Köberle, B. *et al.* ERCC1 and XPF expression in human testicular germ cell tumors. *Oncol Rep* **23**, 223-227 (2010).
- 60 Park, D. J. *et al.* ERCC1 gene polymorphism as a predictor for clinical outcome in advanced colorectal cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Clin Adv Hematol Oncol* **1**, 162-166 (2003).
- 61 Chen, P. *et al.* Association of an ERCC1 polymorphism with adult-onset glioma. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **9**, 843-847 (2000).
- 62 Zhou, W. *et al.* 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* **10**, 4939-4943, doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0247 (2004).
- 63 Saldivar, J. S. *et al.* Moving toward individualized therapy based on NER polymorphisms that predict platinum sensitivity in ovarian cancer patients. *Gynecol Oncol* **107**, S223-229, doi:10.1016/j.ygyno.2007.07.024 (2007).
- 64 Handra-Luca, A., Bilal, H., Bertrand, J. C. & Fouret, P. Extra-cellular signal-regulated ERK-1/ERK-2 pathway activation in human salivary gland mucoepidermoid carcinoma: association to aggressive tumor behavior and tumor cell proliferation. *Am J Pathol* **163**, 957-967, doi:S0002-9440(10)63455-4 [pii] 10.1016/S0002-9440(10)63455-4 (2003).
- 65 Köberle, B. *et al.* ERCC1 and XPF expression in human testicular germ cell tumors. *October*, 223-227, doi:10.3892/or (2010).
- 66 Stevens, E. V. *et al.* Expression of xeroderma pigmentosum A protein predicts improved outcome in metastatic ovarian carcinoma. *Cancer* **103**, 2313-2319, doi:10.1002/cncr.21031 (2005).
- 67 Steffensen, K. D., Waldstrøm, M., Jeppesen, U., Brandslund, I. & Jakobsen, a. Prediction of response to chemotherapy by ERCC1 immunohistochemistry and ERCC1 polymorphism in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* **18**, 702-710, doi:10.1111/j.1525-1438.2007.01068.x (2008).

- 68 Handra-Luca, A. *et al.* 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**, 3855-3859, doi:13/13/3855 [pii] 10.1158/1078-0432.CCR-07-0252 (2007).
- 69 De Dosso, S. *et al.* ERCC1 predicts outcome in patients with gastric cancer treated with adjuvant cisplatin-based chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol*, doi:10.1007/s00280-013-2181-2 (2013).