



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

CURSO DE ESPECIALIDAD EN ONCOLOGÍA MÉDICA

EXPRESIÓN DE ERCC1 E INFECCIÓN POR VPH:
ASOCIACIÓN CON RESPUESTA A LA QUIMIOTERAPIA EN
PACIENTES CON CÁNCER DE ESÓFAGO Y UNIÓN
ESOFAGOGÁSTRICA LOCALMENTE AVANZADO Y
METASTÁSICO.

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
ESPECIALISTA EN ONCOLOGÍA MÉDICA**

PRESENTA:

DR. ARMANDO DANIEL RIVERA SALCEDO.

**DRA. ERIKA BETZABÉ RUIZ GARCÍA
DIRECTORA DE TESIS**



MÉXICO, D.F.

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.

Expresión de ERCC1 e infección por VPH: asociación con respuesta a la quimioterapia en pacientes con cáncer de esófago y la unión esofagogástrica localmente avanzado y metastásico.

Autor: Dr. Armando Daniel Rivera Salcedo.
Residente de Oncología Médica del INCan.

Directora de Tesis: Dra. Erika Betzabé Ruiz García.
Médico Oncólogo, Coordinador del Laboratorio de Medicina Traslacional.

Agradecimientos:

Dr. Antelmo Abelardo Meneses García.
Especialista en Anatomía Patológica y Director General del INCan.

Dr. Horacio Astudillo de la Vega
Doctor en Ciencias de Biomedicina Molecular

Alicia López Yáñez.
Maestra en Biología Molecular.

Oscar Alonso Luna.
Maestro en Ciencias.

Leidy Lorena González Hernández.
Pasante en Biología.

Por su colaboración en la realización de este trabajo.

ÍNDICE.

Resumen	4
Antecedentes	5
Planteamiento del problema	9
Pregunta de investigación	9
Justificación	9
Hipótesis	10
Objetivos	10
Metodología	11
Tamaño de la muestra	13
Análisis estadístico	14
Resultados	22
Discusión	27
Conclusiones	27
Bibliografía	28

RESUMEN

Expresión de ERCC1 e infección por VPH: asociación con respuesta a la quimioterapia en pacientes con cáncer de esófago y la unión esofagogástrica localmente avanzado y metastásico.

OBJETIVO:

Analizar la expresión de ERCC1 y la infección por VPH, y su asociación con respuesta al tratamiento con quimioterapia a base de platino en pacientes con cáncer de esófago y unión esofagogástrica (UEG) localmente avanzado y metastásico.

MATERIAL Y MÉTODOS:

El estudio se realizó en pacientes tratados en el Instituto Nacional de Cancerología, con diagnóstico de cáncer de esófago o de la UGE que recibieron quimioterapia con o sin radioterapia, en enfermedad localmente avanzada o metastásica.

Se realizó revisión de expedientes para registrar las características clínicas de los pacientes, incluyendo respuesta patológica, respuesta por tomografía y por endoscopia. En muestras de tejido tumoral tomadas previo al tratamiento con quimioterapia se realiza la prueba de PCR en tiempo real para determinar la expresión de ERCC1, e infección por VPH, así mismo, se analizó si existe asociación entre infección por VPH, la expresión de ERCC1 y la respuesta patológica, respuesta por imagen y respuesta endoscópica. El análisis se realizó por SPSS v.21.

RESULTADOS.

Se analizaron un total de 57 pacientes, la mediana de supervivencia libre de progresión (SLP) fue 6.5 meses, la mediana de supervivencia global (SVG) fue 7.5 meses, no hubo diferencia en la supervivencia en cuanto a la histología, los pacientes que presentaron respuesta patológica completa (RPC) tuvieron mayor SVG comparados con los que no tuvieron RPC (12.9 VS 7 meses) ($p < 0.05$). Se reportaron 2 pacientes con VPH, en este estudio no fue posible establecer si la infección por VPH se asocia a respuesta al tratamiento. Actualmente se están realizando las pruebas de ERCC1 para posteriormente determinar si existe asociación con respuesta al tratamiento.

CONCLUSION:

No fue posible determinar si existe asociación entre VPH y respuesta al tratamiento con quimioterapia. Es necesario realizar más estudios para identificar biomarcadores predictivos de respuesta al tratamiento

PALABRAS CLAVE:

ERCC1, VPH, cáncer de esófago, cáncer de la UGE, respuesta, sobrevida global.

ANTECEDENTES

Epidemiología

El cáncer de esófago es la octava causa de incidencia mundial con más de 450 mil casos, y la sexta causa en mortalidad por cáncer a nivel mundial con 400 mil muertes anuales reportadas en el 2008⁽¹⁾.

Los tipos histológicos más frecuentes son el adenocarcinoma y el carcinoma de células escamosas (CCE), juntos comprenden el 90% de tumores de esófago. El CCE ha sido el tipo predominante en gran parte del mundo; el llamado Cinturón Asiático de cáncer de esófago comprende países como Turquía, Irán, Kazakstán y China, en los cuales existe alta incidencia de CCE, con más de 100 casos por 100 mil habitantes. Aunque también se ha observado una alta incidencia en el sur y este de África. Sin embargo, hay que mencionar que en ciertas regiones como Australia, Estados Unidos de América (EUA) y algunos países de Europa occidental, la incidencia de adenocarcinoma se ha incrementado y ahora excede a la de CCE. Sin embargo no hay diferencias en términos de resultados a largo plazo entre ambas histologías.

En EUA, en el 2012 se estimaron 17,460 nuevos casos con 15,070 muertes. En raza blanca predomina la variedad de adenocarcinoma (8 casos por 100,000 personas), mientras que en afroamericanos, el CCE sigue siendo el tipo predominante^(2,3). En México, según el estudio de Malvezzi *et al*, la mortalidad es de 3 casos por 100, 000 habitantes⁽⁴⁾; en el 2008 se estimó 912 defunciones por cáncer de esófago⁽⁵⁾.

Factores de riesgo

Los factores de riesgo que se han asociado a cáncer de esófago de tipo adenocarcinoma son: enfermedad por reflujo gastroesofágico y esófago de Barret. Mientras que para CCE son: consumo de tabaco, alcohol, bajo nivel socioeconómico, pobre higiene oral, ingesta crónica de bebidas calientes y deficiencias nutricionales. Se ha propuesto también como agente causal infecciones por agentes virales tales como Virus del Papiloma Humano (VPH), virus de Epstein Barr y citomegalovirus⁽²⁾.

Una asociación entre VPH y cáncer de células escamosas de esófago fue sugerida inicialmente en 1982 cuando se encontraron similitudes morfológicas entre lesiones en tracto genital y carcinoma de células escamosas de esófago. La frecuencia de VPH en CCE ha mostrado gran diversidad de frecuencia alrededor del mundo, indicando alta incidencia en áreas como China, aunque en estudios de Norteamérica y Europa indican una menor frecuencia oscilando entre 0-30%. Castillo *et al* detectó infección por VPH en 34% y 19% de carcinomas esofágicos de pacientes colombianos y chilenos, respectivamente, siendo VPH-16 el genotipo más frecuente⁽⁶⁾. En México, los estudios realizados al día de hoy han mostrado variación, el estudio de Acevedo *et al* encontró positividad de VPH en el 88% de los casos analizados con cáncer de esófago (n=17), siendo la mayoría positivos para genotipos 6 y 11⁽⁷⁾. Sin embargo, Herrera *et al* reporta que de 60 pacientes estudiados con CCE, la frecuencia de VPH se observó en el 25% de los casos, siendo la mayoría positivos para genotipos 16 y 18⁽⁸⁾.

Hoy en día se ha descrito una clara asociación entre VPH y CCE de orofaringe, incluso, se ha observado un incremento para desarrollar CCE de esófago en pacientes

con cáncer de cabeza y cuello infectados con VPH^(9,10), al parecer las similitudes histológicas que existen entre el epitelio escamoso oral y el esófago sugieren que puede haber una asociación entre VPH y cáncer de esófago, sin embargo, aún faltan estudios para establecer esta relación⁽¹¹⁾.

Por otro lado, tampoco se ha podido establecer una asociación entre infección por VPH y respuesta al tratamiento y/o supervivencia, como ocurre en cáncer de orofaringe^(12,13). Es necesario realizar más estudios para determinar si la infección por VPH es un factor predictivo de respuesta al tratamiento con quimioterapia en cáncer de esófago⁽¹⁴⁾.

Pronóstico

La supervivencia global a 5 años va de 15 a 25%, el pobre pronóstico en estos pacientes puede ser explicado por: ausencia de herramientas de escrutinio, etapa clínica avanzada al momento del diagnóstico, alto riesgo de recurrencia posterior al tratamiento y beneficio limitado en el tratamiento paliativo con quimioterapia.

A la presentación, aproximadamente 50% de los pacientes presentan metástasis, y la mayoría de los pacientes que inicialmente presenta enfermedad locoregional posteriormente desarrollará metástasis.

Tratamiento

Los pacientes con cáncer de esófago localmente avanzado tienen un pobre pronóstico con cirugía sola, aun en etapas tempranas, se ha observado una supervivencia a 5 años entre el 5 al 30%. Por lo anterior, se ha propuesto un tratamiento multimodal con quimioterapia (QT) y radioterapia (RT). Diferentes combinaciones se han evaluado, así como secuencias en el tratamiento, con resultados mixtos.

En relación a la quimioterapia en enfermedad metastásica, no existe un esquema de QT estándar, varios esquemas han sido investigados en un intento por aumentar la supervivencia y mejorar la calidad de vida, se han empleado combinaciones basadas en platinos. Se ha combinado con fluorouracilo, taxanos, inhibidores de topoisomerasas entre otros. Las tasas de respuestas oscilan entre el 30 al 60%, con supervivencia media menores a un año.

Cisplatino y resistencia

El mecanismo de acción de los agentes platinados es la unión covalente del fármaco al ácido desoxirribonucleico (ADN), lo que resulta en la formación de aductos ADN-platino que puede inhibir la replicación del ADN, el aducto más frecuente es el enlace intra-hebra formado entre la posición N7 de dos residuos de guanina adyacentes, también pueden ocurrir enlaces inter-hebra y enlaces ADN-proteína^(15, 16).

La combinación de cisplatino con RT incrementa la citotoxicidad, ya que la radiación parece incrementar la captación celular de platino e incrementar la formación de aductos. Sin embargo, algunos pacientes presentan resistencia al cisplatino, y esto puede deberse a: Aumento en la tolerancia a los aductos de ADN y platino, disminución en la acumulación del fármaco, o bien, incremento en la reparación del ADN^(17,18).

Sobre este último mecanismo, la proteína de reparación por escisión del grupo de complementación cruzada 1 (ERCC1) actúa sobre la vía de reparación de escisión de nucleótidos (NER) que es uno de los cinco mecanismos de reparación del ADN que también incluye reparación por recombinación, reparación de bases por escisión, reparación de genes y traslesión de síntesis. Por lo anterior, tanto ERCC1 como NER intervienen en la reparación del daño causado al ADN por los agentes platinados.

El gen ERCC1 se localiza en el cromosoma 19q13.2-q13.3, contiene 10 exones, y codifica para al menos 4 diferentes isoformas las cuales no se han caracterizado. La proteína asociada XPF (también conocida como ERCC4) conserva la actividad catalítica con un dominio nucleasa y contiene un dominio doble hélice-horquilla-hélice.

La función primaria del ERCC1/XPF es reconocer y cortar estructuras de ADN simple o doble ramificadas, con la polaridad del lado 5' de la lesión, permitiendo la escisión y eliminación de la cadena que contiene el daño. El complejo ERCC1/XPF corta la cadena de ADN llevando voluminosas lesiones, aductos de platino, o dímeros de timidina inducidos por rayos ultravioleta.

En otro proceso de reparación llamado reparación de enlaces intercatenarios, el rol de ERCC1/XPF es permitir la reparación de estancamiento de las horquillas de replicación de ADN durante la fase S. También se ha asociado a la reparación de la ruptura de una hebra a través de su habilidad para resolver extremos 3' bloqueados que aparecen durante el daño inducido por especies reactivas de oxígeno.

Finalmente, la endonucleasa ERCC1/XPF juega un rol esencial en 2 importantes vías de reparación de ruptura de doble filamento dirigida por homología, llamadas recodo de una hebra y unión final mediada por microhomología⁽¹⁹⁾.

Existen reportes que sugieren que el ERCC1 tiene otras funciones además de la reparación del ADN como son: a) mantenimiento del telómero, donde es responsable de degradar las salientes teloméricas 3' ricas en guanina, cuando se deja sin protección por el factor de unión a repeticiones teloméricas 2⁽²⁰⁾, b) facilitar el inicio de la transcripción⁽²¹⁾, c) se ha involucrado en la segregación cromosómica, lo cual está apoyado por: 1) el porcentaje de poliploidía en hepatocitos en ratones deficientes de ERCC1⁽²²⁾, 2) retardo en el ciclo celular, por fallo en la metafase y la citocinesis, y 3) la pérdida de ERCC1 se ha asociada a multinucleación, que sugiere un rol en la progresión mitótica⁽²³⁾.

Expresión de ERCC1

Lord *et al* publicó la primera evidencia de que bajo nivel de ARNm de ERCC1 se asocia a mejor pronóstico en pacientes con cáncer pulmonar que reciben cisplatino y gemcitabina, a partir de esto, se han realizado varias investigaciones acerca de la expresión de ERCC1⁽²⁴⁾. Algunas investigaciones han encontrado que la alta expresión de ERCC1 puede asociarse a pobre supervivencia y falta de respuesta a cisplatino⁽²⁵⁾.

En un estudio de 36 pacientes con cáncer de esófago tratados con QT/RT neoadyuvante, se encontró una asociación entre los niveles de expresión relativa de ERCC1 por reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (qPCR) y la respuesta patológica. La sensibilidad para detectar pobre respuesta histopatológica fue 62% con especificidad de 100%, teniendo mayor sensibilidad (85%) en histología escamosa⁽²⁶⁾.

Hay que recordar, que la respuesta patológica completa (RPC), definida como ausencia de células neoplásicas en la biopsia del tumor posterior al tratamiento neoadyuvante, se ha asociado a mayor supervivencia global (SVG) (a 3 años del 74%), comparada con los pacientes que no presentan respuesta patológica completa (SVG a 3 años del 25%)⁽²⁷⁾.

Kim *et al* realizaron un estudio en CCE de esófago, en el cual los pacientes con baja expresión de ERCC1 por qPCR, tratados con QT/RT y cirugía tuvieron supervivencia libre de enfermedad (SLE) mayor a los que solo recibieron cirugía (p=0.04), y una tendencia a mayor SVG en los pacientes que recibieron QT/RT y cirugía comparados con cirugía sola (p=0.057). Mientras que aquellos con sobreexpresión de ERCC1 no presentaron diferencias en supervivencia entre ambas modalidades de tratamiento. En el análisis multivariado se encontró que la terapia trimodal, etapa clínica II y la resección R0 fueron predictores de SLE y SVG en pacientes con baja expresión de ERCC1⁽¹⁷⁾.

Estudios en pacientes con cáncer de esófago avanzado que han evaluado ERCC1 mediante inmunohistoquímica también han encontrado asociación entre la baja expresión de ERCC1 con mayor respuesta al tratamiento⁽²⁸⁾; por otro lado, pacientes con enfermedad localmente avanzada con sobreexpresión de ERCC1 aún tratados con QT neoadyuvante, presentan menores tasas de respuesta histopatológicas, peor pronóstico y SVG⁽²⁹⁾.

La inmunohistoquímica y la qPCR son técnicas usadas en evaluar la expresión de ERCC1, sin embargo no existe un consenso acerca de la superioridad de una sobre la otra, debido a que ambas técnicas no se han comparado, hay resultados controversiales en cuanto a la asociación entre niveles de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y la expresión de la proteína observada por inmunohistoquímica. El método óptimo para evaluarla expresión de ERCC1 aún no ha sido definido⁽¹⁹⁾.

Por lo anterior, podemos concluir que los pacientes que reciben quimioterapia y tienen baja expresión de ERCC1 pueden beneficiarse del tratamiento con quimioterapia, siendo lo opuesto para pacientes con alta expresión de ERCC1.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer de esófago representa una de las principales causas de mortalidad por cáncer a nivel mundial. Aunque el tratamiento es multimodal empleando la quimioterapia, radioterapia y cirugía, poco se ha impactado en la supervivencia global de estos pacientes.

Es necesario encontrar biomarcadores que nos ayuden a predecir que pacientes pueden responder mejor a los tratamientos actuales.

Aunque ya hay estudios que sustentan el uso de ERCC1 para medir resistencia a platino, se desconoce su valor en nuestra población. Así mismo si la infección por VPH tiene algún valor pronóstico.

Por lo que sería de gran utilidad identificar si existe alguna asociación de estos biomarcadores en la toma de decisión de tratamiento.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La subexpresión de ERCC1 y/o la infección por VPH se asocian a mejor respuesta a la quimioterapia en pacientes mexicanos con cáncer de esófago o de la UEG localmente avanzado o metastásico?

JUSTIFICACIÓN

Diversos estudios sugieren que los pacientes con cáncer de esófago, la subexpresión de ERCC1 se asocian a mejor respuesta al tratamiento con quimioterapia.

La infección de VPH en neoplasias como en cáncer de orofaringe se asocia a mejor pronóstico y respuesta al tratamiento con quimioterapia y radioterapia.

En la actualidad, desconocemos si los pacientes mexicanos con cáncer de esófago o de la UEG localmente avanzado o metastásicos tienen mejor respuesta al tratamiento de acuerdo al nivel de expresión de ERCC1 y/o a presencia de infección por VPH. Será importante poder evaluar a nuestros pacientes de acuerdo a estos biomarcadores, buscando identificar el subgrupo de pacientes que se beneficien del tratamiento multimodal.

HIPÓTESIS

Hipótesis nula:

En pacientes con cáncer de esófago o de la UEG, la subexpresión ERCC1 y/o infección por VPH no se asocian a la respuesta a quimioterapia a base de platino.

Hipótesis alterna:

En pacientes con cáncer de esófago o de la UEG, la subexpresión ERCC1 y/o infección por VPH se asocian a la respuesta a quimioterapia a base de platino.

OBJETIVOS

General:

- Determinar el valor de expresión de ERCC1, e infección VPH y su asociación con respuesta a la quimioterapia a base de platino en pacientes con cáncer de esófago y de la UEG.

Específicos:

- Evaluar el valor de expresión de ERCC1 e infección por VPH en cáncer de esófago y de la UEG.
- Determinar el porcentaje de pacientes presenta respuesta patológica completa posterior al tratamiento con quimioterapia y radioterapia.
- Analizar la respuesta por tomografía al tratamiento con a base de platino, con o sin radioterapia concomitante.
- Determinar la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global.
- Analizar las características clínicas de los pacientes con subexpresión ERCC1 y compararlas con los pacientes que no presentan subexpresión de ERCC1.
- Analizar las características clínicas de los pacientes con infección por VPH y compararlas con los pacientes sin infección por VPH.

METODOLOGIA

Tipo de estudio: retrospectivo

Definición de las variables y la forma de medición:

Nombre	Fuente	Definición	Escala de medición	Calificación
Edad	Expediente	Pacientes entre 18 y 75 años	Cuantitativa discontinua	Numérica
Sexo	Expediente	Género	cualitativa	1. hombre 2. mujer
Histología	Expediente Patólogo	Tipo histológico reportado en el laboratorio de patología	cualitativa	1. adenocarcinoma 2. epidermoide
Grado	expediente Patólogo	Grado de diferenciación histológica reportado en el laboratorio de patología	cualitativa	1. Bien diferenciado 2. Moderadamente dif. 3. Poco dif.
Localización	Expediente	Sitio anatómico en esófago y unión esofagogástrica donde se localiza el epicentro del tumor	cualitativa	1. Superior 2. Medio 3. Inferior 4. Unión esofagogástrica
Número de Ciclos de QT	Expediente	Número de ciclos de quimioterapia de primera línea recibidos	Cuantitativa discontinua	Numérica
Quimioterapia de segunda línea	expediente	Pacientes que hayan recibido otro esquema de quimioterapia posterior a la progresión	Cualitativa	1.- Si 2.- No
Respuesta por TAC (dependiente)	Expediente RECIST V1.1	Modificación del diámetro mayor del tumor	Cualitativa	1.- Respuesta completa 2.- Respuesta parcial 3.- Enfermedad estable 4.- progresión
Respuesta por endoscopia (dependiente)	Expediente	Modificación de las características endoscópicas del tumor	cualitativa	1.-Respuesta completa 2.-Respuesta parcial 3.-Enfermedad estable 4.-Progresión

Respuesta por biopsia (dependiente)	Expediente	Ausencia de células neoplásicas posterior al tratamiento	Cualitativa	1.- Respuesta completa 2.- No respuesta completa
Etapa clínica	Expediente AJCC, 2010	Clasificación de la enfermedad de acuerdo a la profundidad de invasión tumoral, número de ganglios y presencia de metástasis a distancia.	Categoría, ordinal	T:1-4 N:1-3 M:0-1
Hemoglobina	Expediente	Concentración de hemoglobina inicial, expresada en gramos por decilitro,	Cuantitativa continua	Numérica
Albúmina	Expediente	Concentración de albúmina inicial, expresada en gramos por decilitro	Cuantitativa continua	Numérica
Antígeno carcinoembrionario	Expediente	Concentración sanguínea de antígeno carcinoembrionario inicial	Cuantitativa continua	Numérica
CA 19-9	Expediente	Concentración sanguínea de antígeno CA 19-9 inicial	Cuantitativa continua	Numérica
Tabaquismo	Expediente	Antecedente de consumo de tabaco	Cualitativa	0-no 1-si
Alcoholismo	Expediente	Antecedente de consumo de alcohol	Cualitativa	0-no 1-si
Expresión de ERCC1 por PCR	Laboratorio de medicina traslacional	Prueba realizada por PCR	Cuantitativa continua	Numérica
VPH por PCR	Laboratorio de medicina traslacional.	Prueba realizada por PCR	cualitativa	0-negativo 1-positivo

Población

La población incluye pacientes con cáncer de esófago y UEG con enfermedad localmente avanzada y metastásica, valorados por la Unidad Funcional de Gastrooncología del Instituto Nacional de Cancerología, en el periodo comprendido entre enero del 2011 y diciembre del 2012.

Criterios de Inclusión

- Pacientes con cáncer de esófago y UEG, que hayan recibido quimioterapia
- Pacientes de 18 años o mayores
- Pacientes que cuenten con estudio de tomografía al inicio del tratamiento.
- Pacientes que cuenten con estudio de tomografía, endoscopia y biopsia para evaluación de respuesta al tratamiento neoadyuvante.
- En caso de no contar con estudio para valorar la respuesta el paciente debe presentar datos de progresión clínica.

Criterios de Exclusión

- Pacientes con estado funcional bajo, que no hayan sido considerados candidatos a tratamiento con quimioterapia.
- Pacientes en los que esté contraindicado el uso de quimioterapia a base de platino.
- Pacientes que hayan sido considerados para cirugía de inicio.

Tipo de muestreo

Por cuota.

Tamaño de la muestra.

Fórmula del tamaño de la muestra para proporciones:

$$n = \frac{Z_{\alpha}^2 \cdot p_0 \cdot q_0}{d^2}$$

Para un error $\alpha=0.05$

$(\alpha=0,05; Z_{\alpha}=1,96)$

p=porcentaje estimado =0.4

q= 1-p =0.6

d= precisión =0.15

n= 40

p: el porcentaje estimado en base a la tasa de respuestas a la quimioterapia (40%)

d: la precisión en base a la diferencia esperada entre grupos (15%)

PROCEDIMIENTO

Las pruebas se realizaron en biopsias tomadas por el servicio de endoscopia del Instituto Nacional de Cancerología previo al inicio del tratamiento con quimioterapia.

El tejido fue revisado por un patólogo del Instituto Nacional de Cancerología.

La medición de ERCC1 por reacción de cadena de polimerasa en tiempo real (análisis cuantitativo) y la positividad para infección de VPH por la misma plataforma (análisis cualitativo) se realizaron en el Laboratorio de Medicina Traslacional del Instituto Nacional de Cancerología.

Mediante la base de datos tomada del expediente se analizarán las características clínicas, respuesta por tomografía, respuesta patológica y endoscópica, y se determinará si existe asociación entre la respuesta y la expresión del ERCC1 y positividad para VPH.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se analizará la expresión de ERCC1 y la positividad para VPH, así como su asociación con respuesta por tomografía, endoscopia y biopsia mediante la prueba de Ji Cuadrada. Las variables cuantitativas serán expresadas por medianas, se aplicará la prueba t de Student, para variables cuantitativas y chi cuadrada para variables cualitativas, para 2 colas, con $p < 0.05$ considerado estadísticamente significativo, el análisis se realizará por SPSS v.21

Detección de VPH por PCR en tiempo real

Desparafinación de muestras

Realizar de 5-10 cortes de muestras de tejido embebido en parafina de aproximadamente 25 mm.

1. Depositar en microtubos para centrifuga de 1.5 ml previamente etiquetados
2. Incubar con 1mL de xileno en horno de calor seco a una temperatura de 56°C durante una hora.
3. Sacar los tubos del horno y eliminar la mayor cantidad del volumen para volver a colocar 1 ml de xileno a cada uno de los tubos. Incubarán durante una hora a 56°C.
4. Eliminar la mayor cantidad de xileno posible y realizar 3 lavados por pipeteo con etanol absoluto
5. Elimina la mayor cantidad de etanol remanente y de dejar secar a 56°C.

Extracción de ADN genómico (ADNg)

La extracción del ADNg se realizará mediante el empleo del kit DNeasy[®] blood and tissue de QIAGEN siguiendo las siguientes instrucciones del proveedor:

1. Colocar en un tubo eppendorf de 1.5 mL previamente etiquetado, 180 µl de Buffer ATL, y agregar posteriormente 20 µL de proteinasa K, vortexear e incubar a 56°C hasta que el tejido este completamente lisado.
2. Vortexear 15 segundos y posteriormente adicionar 200 µl de Buffer AL y vortexear. Luego adicionar 200 µL de etanol (96–100%) y vortexear nuevamente.
3. Tomar de la mezcla de lisis (incluyendo cualquier precipitado) 550µl y colocarlos en la columna de DNeasy mini spin previamente etiquetada. Centrifugar a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 min. Desechar el filtrado y el tubo de colección.
4. Pasar la columna a un nuevo tubo de colección de 2 ml, adicionar 500 µl de Buffer AW1, y centrifugar a 6000 x g (8000 rpm) por 1 minuto. Desechar el filtrado con el tubo de colección.
5. Pasar la columna a un nuevo tubo de colección de 2 ml, adicionar 500 µl de Buffer AW2 y centrifugar por 3 minutos a 20,000 x g (14,000 rpm) para secar. Descartar el filtrado con el tubo de colección.
6. Pasar la columna a un tubo de Eppendorf nuevo de 1.5 ml previamente etiquetado y pipetear 200 µL de Buffer AE directamente sobre la membrana. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto, y luego centrifugar por 1 minuto a 6000 x g (8000 rpm) para eluir.

Cuantificación de ADNg

La cuantificación del ADNg se realizará mediante el empleo del espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific).

1. Dar doble Click al icono del software **NanoDrop™ 2000** y seleccionar cuantificación de ácidos nucleicos. Seleccionar **Add to report** antes de la medición para guardar los datos de las muestras automáticamente a un documento de trabajo.
2. Establecer el Blanco usando el Buffer apropiado. Pipetear 1-2 µl del Buffer, bajar el brazo y hacer clic en el botón **Blank**. La solución Blanco generalmente es la misma solución Buffer en que la molécula de interés fue disuelta.
3. Limpiar el blanco de los pedestales de medición utilizando un paño de laboratorio seco y sin pelusa. Introducir el ID de la muestra en el campo correspondiente. Vortexear durante 15 segundos el tubo que contiene la muestra y pipetear 1 µl y hacer clic en **Measure**.
4. Limpiar las muestras de los pedestales de medición y volver a repetir el punto 3 entre cada muestra.

Preparación de la muestra para PCR en tiempo real

1. Vortexear cada muestra por 15-20 segundos, inmediatamente transferir 400 µl de cada muestra al tubo de reacción.
2. Almacenar los reactivos control a 15-30 °C o a 2-8 °C,
 - Vortexear cada control por 15-20 segundos antes de usar, asegurar que el contenido de cada vial se encuentre al fondo.
 - Los controles deben estar almacenados a 2-8 °C por más de 24 horas antes de usar.
3. Los reactivos de amplificación deben estar a 15-30 °C hasta que sean requeridos para el procedimiento de amplificación master mix.
4. Preparar la master mix de amplificación
 - Asegurar que el contenido de los reactivos se encuentre al fondo del tubo, identificar como:
 - Reactivo de activación (1).
 - Reactivo de oligonucleótido (2)
 - Enzima ampliTaq Gold (3)
 - Se prepara la master mix usando una pipeta agregando 278 µl del reactivo de activación, 402 µL del reactivo de oligonucleótidos, junto al reactivo 3, mezclar gentilmente por pipeteo arriba y abajo por 6 veces,
 - Si se realizan de 25 a 48 reacciones, se prepara la master mix para 2 paquetes de reactivos.

Pre-PCR

5. Pipetear el contenido de la master mix a un tubo libre de DNasa, se mezcla gentilmente arriba y abajo 6 veces.
6. Previo a la adición de la master mix y muestra, insertar una placa de reacción óptica.
7. Usando una pipeta, repartir alícuotas de 25 µl de la master mix a cada celda de la placa de reacción óptica dependiendo del número de muestras que se correrán, incluyendo controles, verificar que los 25 µl hayan sido agregados.
8. Transferir la placa de reacción óptica en la base de soporte al área de preparación de la muestra.
9. En el área de preparación, transferir 25 µl de la muestra que se eluyó a la placa de reacción en la base de soporte, verificar que un total de 50 µl se haya repartido en cada una.

10. Sellar la placa de reacción de acuerdo al manual de operaciones.

Amplificación

11. Colocar la placa de reacción en el m2000rt e iniciar el protocolo Real Time HR HPV como se describe en el manual de operación. Al terminar el ensayo, los resultados serán reportados.
12. Después de que el m2000rt ha completado la amplificación, se remueve la placa de acuerdo a las instrucciones de precauciones de contaminación.

La prueba de PCR en tiempo real es una prueba que amplifica y detecta el ADN de VPH, a través de un cebador dirigido a una región del genoma del VPH de 14 serotipos considerados de alto riesgo, como son el VPH 16, VPH 18 y otros VPH no 16/18, como el 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68.

Detección de la expresión de ERCC1 por PCR en tiempo real

Desparafinación de muestras

1. Realizar de 5-10 cortes de muestras de tejido embebido en parafina de aproximadamente 25 μm .
2. Depositar en microtubos para centrifuga de 1.5 ml previamente etiquetados
3. Añadir 1mL de xileno y vortexear durante 20 segundos, incubar en horno de calor seco a una temperatura de 55°C durante 3 min.
4. Eliminar la mayor cantidad de xileno posible.
5. Añadir 1 ml de etanol absoluto y vortexear durante 20 segundos y retirar el etanol por pipeteo, repetir el lavado con etanol absoluto.
6. Elimina la mayor cantidad de etanol remanente y de dejar secar a 37°C.

Extracción RNA total

1. Agregar 240 μl de PKD y vortexear.
2. Agregar 10 μl de proteinasa K, mezclar gentilmente por pipeteo arriba y abajo.
3. Incubar a 56°C por 15 minutos, luego a 80 °C por 15 minutos.
4. Transferir a un nuevo tubo de 2 ml,
5. Incubar en hielo por 3 minutos, centrifugar por 15 minutos a máxima velocidad.
6. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo
7. Agregar buffer para DNasa equivalente a la décima del total de la muestra y 10 μl de DNasa I, mezclar invirtiendo el tubo, centrifugar para colectar el líquido residual de los lados del tubo
8. Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos.
9. Agregar 320 μl de buffer RBC para ajustar las condiciones de unión, y mezclar el lisado.
10. Agregar 1120 μl de etanol al 100%, y mezclar por pipeteo,
11. Transferir 700 μl de la muestra a una columna RNeasy MinElute en un tubo de 2 mL, cerrar gentilmente y centrifugar por 15 segundos a máxima velocidad, tirar el sobrenadante colocar de nuevo en el mismo tubo colector y añadir el restante de la muestra, centrifugar a máxima velocidad durante 15 segundos, tirar el sobrenadante y colocar de nuevo en el mismo tubo colector.
12. Agregar 500 μl de Buffer RPE a la columna RNeasy MinElute y centrifugar durante 2 minutos a máxima velocidad para lavar la membrana de la columna, tirar el sobrenadante el tubo colector.
13. Colocar la columna RNeasy MinElute en un nuevo tubo colector de 2 ml, se abre la tapa de la columna y centrifuga por 5 minutos,
14. Colocar la columna RNeasy MinElute en un nuevo tubo colector de 1.5 ml, se agrega 14 μl de agua libre de RNasa directamente en el centro de la membrana de la columna, se cierra la tapa y se centrifuga por 1 minuto.
15. Colocar los tubos con la muestra en hielo.

Cuantificación de ARN total

La cuantificación del ARN se realizará mediante el empleo del espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific), las muestras deben permanecer en hielo durante el proceso.

1. Dar doble Click al icono del software **NanoDrop™ 2000** y seleccionar cuantificación de ácidos nucleicos y seleccionar ARN en la pestaña del lado derecho. Seleccionar **Add to report** antes de la medición para guardar los datos de las muestras automáticamente a un documento de trabajo.
2. Establecer el Blanco usando el Buffer apropiado. Pipetear 1 µl del Buffer, bajar el brazo y hacer clic en el botón **Blank**. La solución Blanco generalmente es la misma solución Buffer en que la molécula de interés fue disuelta.
3. Limpiar el blanco de los pedestales de medición utilizando un paño de laboratorio seco y sin pelusa. Introducir el ID de la muestra en el campo correspondiente. Vortexear durante 15 segundos el tubo que contiene la muestra y pipetear 1 µL y hacer clic en **Measure**.
4. Limpiar las muestras de los pedestales de medición y volver a repetir el punto 3 entre cada muestra.

Síntesis de ADN complementario (ADNc).

Preparar la mezcla de reacción de acuerdo a la siguiente tabla:

Componente	Volumen/Reacción (µl)
2X RT buffer	10
20X RT mezcla de enzima	1.0
H2O libre de nucleasas	Lo necesario para ajustar el volumen a 20 µl
ARN	9 µl
Volumen total	20

Mezclar por pipeteo y volver a colocar los tubos en hielo.

Colocar los tubos en el termociclador punto final y programar las siguientes condiciones:

Condiciones	Paso 1	Paso 2	Paso 3
Temperatura	37	95	4
tiempo	60 min	5 min	∞

Iniciar la transcripción reversa, una vez terminada pasar las muestras a hielo.

Cuantificación ADNc

La cuantificación del ADNc se realizará mediante el empleo del espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific).

1. Dar doble Click al icono del software **NanoDrop™ 2000** y seleccionar cuantificación de ácidos nucleicos. Seleccionar **Add to report** antes de la

- medición para guardar los datos de las muestras automáticamente a un documento de trabajo.
2. Establecer el Blanco usando el Buffer apropiado. Pipetear 1-2 μl del Buffer, bajar el brazo y hacer clic en el botón **Blank**. La solución Blanco generalmente es la misma solución Buffer en que la molécula de interés fue disuelta.
 3. Limpiar el blanco de los pedestales de medición utilizando un paño de laboratorio seco y sin pelusa. Introducir el ID de la muestra en el campo correspondiente. Vortexear durante 15 segundos el tubo que contiene la muestra y pipetear 1 μL y hacer clic en **Measure**.
 4. Limpiar las muestras de los pedestales de medición y volver a repetir el punto 3 entre cada muestra.

Preparación de la muestra para PCR

Pre-PCR

Para preparar la reacción de PCR y la placa:

1. Para cada muestra, calcular el número total de reacciones requeridas
2. Calcular el volumen total requerido para cada componente de reacción:

$$\text{Volumen por reacción} \times \text{el número total de reacciones} + 10\%$$

Componente	Volumen para una reacción
	20mL de reacción (Placas de 96 pozos)
TaqMan Universal PCR master mix,	10 μl
Muestra de ADNg	9 μl
20X Taqman Gene Expression Assay	1.0 μl
Total de volumen de super mix	20 μl

3. Etiquetar tubos de 0.6 ml, añadir todos los componentes y mezclar por pipeteo.
4. Centrifugar brevemente para eliminar todas las burbujas.
5. Para cada conjunto de replicados, transferir alícuotas de super mix a un tubo, después añadir el gen constitutivo, (en este caso β - actina) a cada tubo.
6. Añadir los 20 μL mezcla de PCR en cada pozo de reacción de la placa de PCR.
7. Verificar que no haya presencia de burbujas en el fondo del pocillo, si fuera así, eliminarlas con una punta de micropipeta.
8. Cubrir la placa con una película adhesiva óptica y llevar al equipo de PCR.

Reacción de cadena de polimerasa en tiempo real (qPCR)

Encender el equipo de PCR y el ordenador. En el programa 7500 del sistema QPCR Applied Biosystems 7500 Fast:

1. Dar click en “7500 Fast Software” para abrir el programa
2. En la ventana principal, dar click a “Advanced setup” para desplegar en menú de opciones
3. Etiquetar el nombre del experimento y seleccionar el tipo de placa a utilizar (No. de pozos)

4. Seleccionar en el tipo de experimento “Quantification-Standard”
5. Seleccionar el tipo de reactivo (TaqMan)
6. Cambiar a la ventana “Plate setup” y seleccionar el número de blancos según el experimento (2)
7. Etiquetar cada pocillo iniciando por el gen constitutivo y seguido de las muestras.
8. Definir muestras seleccionando los pocillos de los blancos para cada muestra presionando la tecla “Control”. El etiquetado de muestras se debe realizar después.
9. Cambiar a la ventana “Run Method” en el cual, el método de corrida ya está preseleccionado. Definir el volumen de muestra a utilizar (20 o 10 ml)
10. Cambiar a la ventana “Reaction setup” y definir las concentraciones de la master mix (2.0X) y del ensayo (10.0X), automáticamente, aparecerán los volúmenes que se debieron utilizar en la preparación de la master.
11. Dar click en “Start run”

Análisis de Datos

Los pasos de análisis son:

1. Analizar los datos en el sistema de PCR en tiempo real, utilizando los siguientes ajustes de análisis:
 - 1.1. C_T manual (ciclo umbral): 0.2
 - 1.2. Basal automático: On

El programa del PCR en tiempo real determina los valores C_T para el ensayo de detección de mutación y las reacciones del Control positivo interno (IPC)

2. Revisar los gráficos de amplificación y/o valores C_T para todos los pozos de reacción:

Tipo de reacción	Parámetros
Las muestras analizadas con el gen de referencia (FAM)	Verificar que las curvas de amplificación tengan una distintiva, la fase de amplificación lineal y valores C_T estén dentro de un rango de 18-28 para 20 μ l y de 17-27 para 10 μ l
Muestras analizadas con un mutante alelo (FAM)	Revisar las curvas de amplificación y valores C_T . Presencia o ausencia de una distintiva, fase de amplificación lineal y valores C_T dependan de la cantidad de alelo mutante presente en la muestra.
Muestras control positivo	Verificar que las curvas de amplificación tengan una distintiva, fase de amplificación lineal y valores C_T estén dentro del rango esperado para la cantidad del blanco presente en la muestra.
Replicados	Verificar que los valores entre los replicados tengan valores C_T de similares

RESULTADOS

Características de los pacientes

Se incluyeron al estudio un total de 57 pacientes, de los cuales 46 (80%) fueron del sexo masculino, la mediana de edad fue de 66 años. Del total de pacientes, se reportó tabaquismo en 33 (58%) de los pacientes y alcoholismo en 33 (58%) de los pacientes. La mediana de valor de hemoglobina fue 14.2 gr/dl, la mediana del valor de albúmina fue 3.8 gr/dl, la mediana de valor de antígeno carcinoembrionario fue 3.3 ng/ml, la mediana de valor de Ca 19-9 fue de 7.1 U/ml.

Tabla 1. Características de los pacientes.

Característica	No.	%
Histología		
Adenocarcinoma	28	49
CCE	29	51
Localización		
Alto	6	10.5
Medio	16	28.1
Bajo	19	33.3
UEG	16	28.1
Grado histológico		
1	3	5.3
2	27	47.4
3	28	45.6
Se desconoce	1	1.8
Etapa clínica		
Localmente avanzado	43	75.4
Metastásico	14	24.6
Ganglionar	6	42
Visceral	7	50
Hueso	1	7.1
ECOG		
0	8	14
1	26	45.6
2	23	40.4
IMC		
<25	38	63.2
25-30	17	29.8
>30	4	7

Tratamiento

La mediana de ciclos de quimioterapia recibidos fue de 4 (1-14), el esquema de quimioterapia de cisplatino con fluororuracilo se aplicó en 47 (82.5%) de los pacientes. 39 pacientes recibieron radioterapia, el esquema de radioterapia más utilizado fue 23 Gy en 4Fx, 34 pacientes recibieron el esquema completo, mientras que 4 pacientes recibieron el esquema incompleto y en 1 paciente no se conoce esquema de radioterapia.

De los 57 pacientes, 7 fueron llevados a cirugía, de los cuales 3 (5.3%) tuvieron respuesta patológica completa posterior al tratamiento neoadyuvante (Ryan 0). Posterior a la progresión, 6 pacientes recibieron tratamiento con paclitaxel, con una mediana de 2 ciclos.

Tabla 2. Tratamiento.

Esquema de QT	No.	%
CDDP/5FU	47	82.5
CBP/5FU	7	12.3
otro	3	5.3
Esquema de Radioterapia (23Gy/4Fx)		
Completo	34	59.6
Incompleto	4	7.0
Se desconoce dosis	1	1.8
No recibió	18	31.6
Cirugía posterior a neoadyuvancia.		
Cirugía	7	12.3
Ryan 0 (RPC)	3	5.3
Ryan 1 ó mayor	4	7
No cirugía	50	87.7

Respuestas

Se realizó evaluación de la respuesta por tomografía, endoscopia y biopsia. Por tomografía se reportó tasa de respuestas (RC y RP) de 50.9%, mientras que por endoscopia se observó regresión macroscópica del tumor total o parcial (RC y RP) de 70.2%, así mismo, se reportó respuesta patológica completa en 29 (50%) de los pacientes. De los 5 pacientes que tuvieron respuesta por tomografía, todos tuvieron RPC. De los 24 pacientes que tuvieron respuesta parcial por tomografía, 16 tuvieron RPC.

Tabla 3. Respuestas

Respuesta por tomografía	No.	%
completa	5	8.8
parcial	24	42.1
Enfermedad estable	3	5.3
Progresión	11	19.3
No disponible	14	24.6
Respuesta por endoscopia		
Completa	9	15.8
Parcial	31	54.4
Progresión	2	3.5
No disponible	15	26.3
Respuesta por biopsia		
Completa	29	50.9
No completa	10	17.5
No disponible	18	31.6

PCR para VPH

De los 57 pacientes, 2 pacientes presentaron positividad para VPH genotipo 16, uno de ellos fue un paciente masculino de 56 años, con adenocarcinoma metastásico, ECOG de 2, recibió 1 ciclo de quimioterapia, 2 semanas después el paciente falleció. El otro fue un paciente femenino de 49 años, con adenocarcinoma localmente avanzado, con ECOG de 2, recibió 3 ciclos de quimioterapia, presentando progresión de la enfermedad, el paciente falleció 10 semanas después del inicio de quimioterapia.

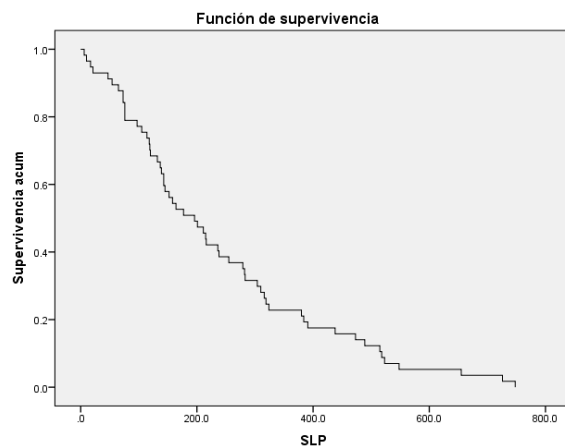
PCR para ERCC1

Al momento actual se encuentra en proceso la realización de las pruebas.

Supervivencia.

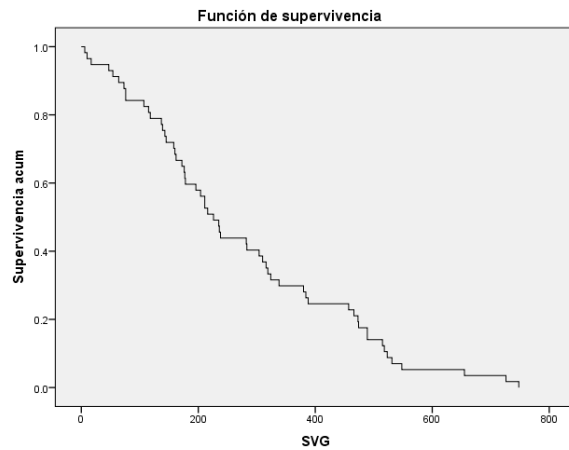
Al momento del corte fallecieron 15 pacientes (26%), además 8 pacientes (14%) tuvieron pérdida de seguimiento. En toda la población la mediana de supervivencia libre de progresión fue de 196 días) que equivale a 6.5 meses.

Figura 1. Supervivencia libre de progresión



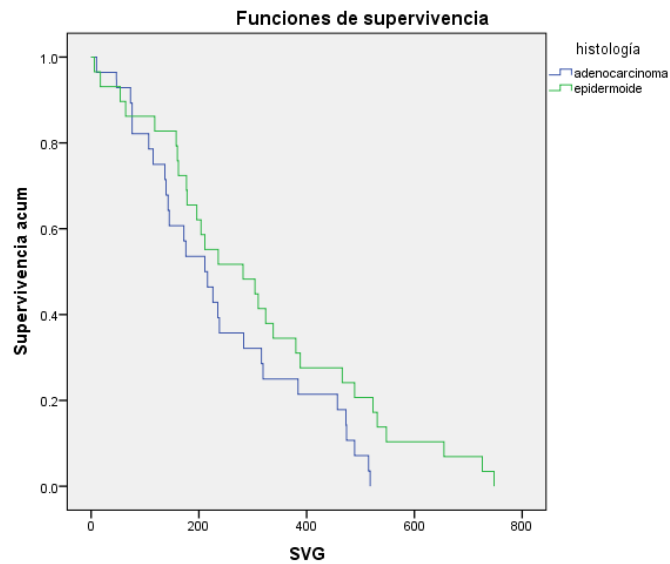
En toda la población la mediana de supervivencia global fue 226 días, que equivale a 7.5 meses.

Figura 2. Supervivencia global.



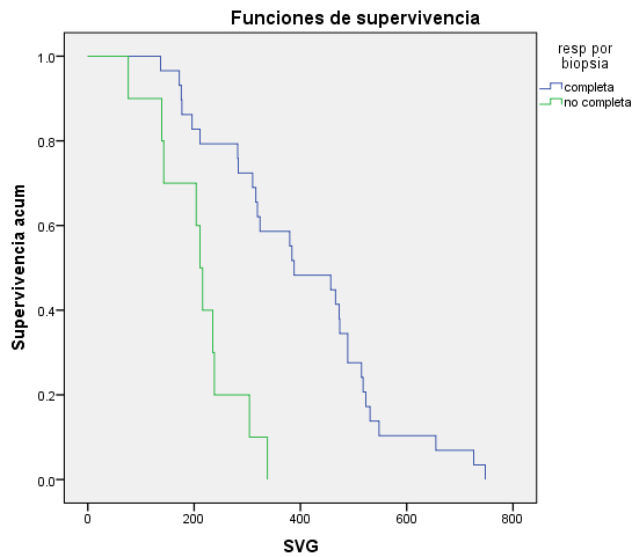
La supervivencia global de acuerdo a la histología: para adenocarcinoma la mSVG fue 211 días (7m), para CCE fue 282 días (9.4m) (p=NS).

Figura 3. SVG de acuerdo a histología.



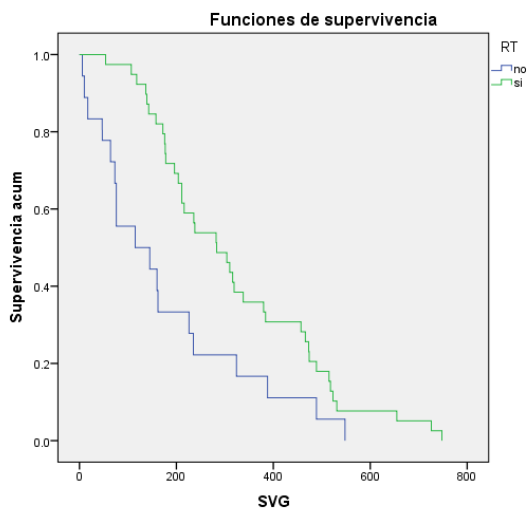
Se realizó biopsia posterior al tratamiento en 39 de 57 pacientes, los pacientes con RPC presentaron mSVG de 388 días (12.9 meses), los que no tuvieron RPC presentaron mSVG de 211 días (7.0 meses) (p<0.05).

Figura 4. SVG de acuerdo a RPC.



Los pacientes que recibieron quimioterapia y radioterapia concomitante presentaron una mediana de supervivencia de 293 días (9.4 meses), los pacientes que recibieron quimioterapia sola presentaron una mediana de supervivencia de 115 días (3.8 meses), ($P < 0.05$).

Figura 5. Supervivencia en pacientes que recibieron QT/RT VS QT.



DISCUSIÓN

En este estudio se reportó similar proporción de casos de adenocarcinoma y de CCE, no hubo diferencias en supervivencia entre ambas histologías, la enfermedad metastásica al diagnóstico se presentó en la cuarta parte de los pacientes.

El esquema más utilizado fue cisplatino y fluorouracilo, el cual recibió el 82% de los pacientes. Algunos pacientes recibieron carboplatino y fluorouracilo por presentar contraindicación para el uso de cisplatino.

7 pacientes fueron llevados a cirugía posterior a la neoadyuvancia, de estos, solo 3 pacientes tuvieron RPC.

Posterior a la progresión, 6 pacientes recibieron tratamiento con quimioterapia, que consistió en paclitaxel trisemanal, los pacientes recibieron de 1 a 3 ciclos, ninguno de los pacientes tuvo control de la enfermedad con este tratamiento.

Los pacientes que presentaron RPC tuvieron supervivencia global mayor a los que no tuvieron RPC, similar a lo descrito en la literatura, por lo que la RPC sigue siendo el factor pronóstico más importante de supervivencia en cáncer de esófago.

La frecuencia de VPH en cáncer de esófago fue menor que la reportada por Herrera *et al* y Acevedo *et al* en población mexicana, así como lo reportado por Castillo *et al* en otros países de Latinoamérica. Este estudio incluyó pacientes con ambas histologías, diagnosticados en el 2011 y 2012, mientras que el estudio de Herrera *et al* incluyó solo pacientes con CCE, diagnosticados entre el 2000 y 2008, esto sugiere que podría existir un cambio en la epidemiología del VPH en México en los últimos años.

En este estudio no fue posible determinar si existe asociación entre la infección por VPH y la respuesta al tratamiento, lo cual puede explicarse debido a que este estudio incluyó pocos pacientes, y debido a que los 2 pacientes con infección por VPH, ambos tuvieron pobre estado funcional y pobre supervivencia. Por lo que se necesita un estudio con mayor cantidad de pacientes para comprobar esta hipótesis.

CONCLUSIONES.

La RPC continúa siendo el factor pronóstico de supervivencia más importante. La frecuencia de VPH en cáncer de esófago fue baja, en este estudio no fue posible determinar si existe asociación entre infección por VPH y respuesta al tratamiento. Actualmente se encuentra pendiente los resultados de PCR para ERCC1 para determinar si existe asociación entre ERCC1 y respuesta al tratamiento.

Recomendaciones

En cáncer de esófago es necesario realizar más estudios para identificar biomarcadores predictivos de respuesta al tratamiento.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Tew W P, Kelsen D P, Ilson D H. Targeted therapies for esophageal cancer. *The oncologist* 2005; 10: 590-601.
- 2.- Pennathur A, Gibson M K, Jobe B A, Luketich J D. Oesophageal carcinoma. *Lancet* 2013; 381: 400–12.
- 3.- Almhanna K, Meredith K L, Targeting the Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 in Esophageal Cancer. *Cancer Control* 2013; Vol 20, No. 2.
4. Malvezzi M, Bosetti C, Chatenoud L, Rodríguez T, Levi F, Negri E, La Vecchia C. Trends in cancer mortality in Mexico, 1970-1999. *Ann Oncol* 2004; 15: 1712-1718.
- 5.- Dirección General de Información en Salud (DGIS). Base de datos defunciones 1979- 2008. Proyecciones de la población en México CONTEO 2005 1990-2012. Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS)
- 6.- Castillo A, Aguayo F, Koriyama C, Torres M, Carrascal E, Corvalan A, Roblero JP, Naquira C, Palma M, Backhouse C, Argandona J, Itoh T, Shuyama K, Eizuru Y, Akiba S. Human papillomavirus in esophageal squamous cell carcinoma in Colombia and Chile. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6188-6192.
- 7.- Acevedo E, Gonzalez A, Vazquez G, Human Papillomavirus DNA and Protein in Tissue Samples of Oesophageal Cancer, Barrett's Oesophagus and Oesophagitis. *Anticancer Research* 2004; 24:1319-1324.
- 8.- Herrera R, Lizano M, Akiba S, Human Papilloma virus and esophageal carcinoma in Latin-America region *World J Gastroenterol* 2009; 15(25): 3142-3147
- 9.- De Villiers E M, Gunst K, Stein H, Scherubl H Esophageal squamous cell cancer in patients with head and neck cancer: Prevalence of human papilloma virus DNA sequences. *Journal International du Cancer* 2004;109:253–258.
- 10.- Löfdahl H E, Du J, Näsman A. Prevalence of Human Papillomavirus (HPV) in Oesophageal Squamous Cell Carcinomain Relation to Anatomical Site of the Tumour. *PLoS ONE* 7(10):e46538.
- 11.- Zandberg D, Bhargava R, Badin S. Role of Human Papillomavirus in Non genital Cancers. *CA Cancer J Clin* 2013;63:57-81.
- 12.- Ang K K, Harris J, Wheeler R, Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med.* 2010;363(1):24.
- 13.- Gábor B, Imdahl A, György L, Pál O. HPV-infection in esophageal cancer as possible predictive factor after neoadjuvant therapy]. *Magy Seb* 2006;59(2):97-104.
- 14.- Dreilich M, Bergqvist M, Moberg M, Brattström D. High-risk human papilloma virus (HPV) and survival in patients with esophageal carcinoma: a pilot study. *BMC Cancer.* 2006;18;6:94.

- 15.- Galea AM, Murray V The interaction of cisplatin and analogues with DNA in reconstituted chromatin. *Biochim Biophys Acta* 2002;1579(2-3):142.
- 16.- S.L. Bruhn, J.H. Toney, S.J. Lippard Biological processing of DNA modified by platinum compounds. *Prog. Inorg. Chem.: Bioinorg. Chem* 38 (1991), pp. 478–517.
- 17.- Kim M K, Cho K J, Kwon G Y, Park S I, Kim Y H. Patients with ERCC1-negative locally advanced esophageal cancers may benefit from preoperative chemoradiotherapy. *Clin Cancer Res* 2008;14(13):4225-31.
- 18.- Lee S, Park Y H, Kim K H, Cho E Y. Thymidine synthase, thymidine phosphorylase , and excision repair cross-complementation group 1 expression as predictive markers of capecitabine plus cisplatin chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2010;103(6):845–51.
- 19.- Besse B, Olaussen K A, Soria J C. ERCC1 and RRM1: Ready for Prime Time? *J Clin Oncol* 2013; 131:1050-1060.
20. Zhu X D, Niedernhofer L, Kuster B, ERCC1/XPF removes the 3' overhang from uncapped telomeres and represses formation of telomeric DNA-containing double minute chromosomes. *Mol Cell* 2003;12:1489-1498.
21. Kamileri I, Karakasilioti I, Sideri A, Defective transcription initiation causes postnatal Growth failure in a mouse model of nucleotide excision repair (NER) progeria. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:2995-3000, 2012.
22. Núñez F, Chipchase MD, Clarke A R, Nucleotide excision repair gene (ERCC1) deficiency causes G(2) arrest in hepatocytes and a reduction in liver binucleation: The role of p53 and p21. *FASE B J* 14:1073-1082, 2000.
23. Rageul J, Frémin C, Ezan F, The knock-down of ERCC1 but not of XPF causes multinucleation. *DNA Repair (Amst)* 10:978-990, 2011.
24. Lord R V, Brabender J, Gandara D, Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:2286-2291.
25. Metzger R, Gail C, Danenberg K, ERCC1 mRNA Levels Complement Thymidylate Synthase mRNA Levels in Predicting Response and Survival for Gastric Cancer Patients Receiving Combination Cisplatin and Fluorouracil Chemotherapy. *J Clin Oncol* 1998;16:309-316.
26. Warnecke-Eberz U, Metzger R, Miyazono F. High Specificity of Quantitative Excision Repair Cross-Complementing 1 Messenger RNA Expression for Prediction of Minor Histopathological Response to Neoadjuvant Radiochemotherapy In Esophageal Cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:3794-3799.

27. Swisher S G, Hofstetter W, Wu T T. Proposed Revision of the Esophageal Cancer Staging System to Accommodate Pathologic Response (pP) Following Preoperative Chemoradiation (CRT). *Ann Surg* 2005;241:810–820.

28. Huang J, Zhou Y, Zhang H, Qu T. A phase II study of biweekly paclitaxel and cisplatin Chemotherapy for recurrent or metastatic esophageal squamous Cell carcinoma: ERCC1 expression predicts response to chemotherapy. *Med Oncol*. 2013;30(1):343.

29. Fareed K R, Al-Attar A, Soomro I N, Tumour regression and ERCC1 nuclear protein expression predict clinical outcome in patients with gastro-oesophageal cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Br J Cancer*. 2010 May 25;102(11).