

# Tumores germinales testiculares: mecanismos de adquisición de resistencia al cisplatino y desarrollo de una aproximación terapéutica para el tratamiento de tumores refractarios

Clara Muñoz Almendros

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.





**TUMORES GERMINALES TESTICULARES: MECANISMOS DE ADQUISICIÓ  
DE RESISTENCIA AL CISPLATINO Y DESARROLLO DE UNA APROXIMACIÓ  
TERAPÉUTICA PARA EL TRATAMIENTO DE TUMORES REFRACTARIOS**

**Memoria de Tesis Doctoral**

**Clara Muñoz Almendros**

**Barcelona, Septiembre 2013**



**TUMORES GERMINALES TESTICULARES: MECANISMOS DE ADQUISICIÓN  
DE RESISTENCIA AL CISPLATINO Y DESARROLLO DE UNA APROXIMACIÓN  
TERAPÉUTICA PARA EL TRATAMIENTO DE TUMORES REFRACTARIOS**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por

Clara Muñoz Almendros

Para optar al Grado de Doctora por la Universidad de Barcelona

Tesis realizada bajo la dirección del Dr. Alberto Villanueva Garatachea  
en el Instituto Catalán de Oncología y el Instituto de  
Investigación Biomédica de Bellvitge

Tesis adscrita al Departamento de Ciencias Fisiológicas II  
Programa de Doctorado en Biomedicina  
Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona

L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, septiembre 2013

**Alberto Villanueva**

Director

**Francesc Viñals**

Tutor

**Clara Muñoz**

Doctoranda



A mis padres,  
porque sin vosotros no habría podido llegar hasta aquí,  
y en especial a mi madre por despertarme la  
curiosidad por la biología y el mundo en general.





## AGRADECIMIENTOS

Después de estos meses escribiendo la tesis, ahora estoy sentada de nuevo delante del ordenador con una hoja en blanco y, con tantas cosas por decir, la verdad es que no sé ni por dónde empezar.

Recuerdo cuando llegué al laboratorio, hace ya unos cuantos años, con la incertidumbre de si sería capaz de sacar adelante un proyecto de tesis, si encontraría un ambiente laboral agradable, si la persona con la que me había entrevistado sería un buen jefe, en resumidas cuentas: si había tomado la decisión correcta. Y la realidad, vista de manera retrospectiva a día de hoy, es que lo que he vivido durante estos años ha superado con creces mis expectativas. Por eso, creo que es el momento de agradecerle a toda esa gente que ha conseguido hacer de este tiempo una experiencia inolvidable e inigualable, a la vez que me han ayudado a que esta tesis sea hoy una realidad tangible, aportando ideas, experiencia técnica y, sobretodo, mucho apoyo para esos momentos difíciles en los que tienes ganas de tirar la toalla. Sin todos vosotros esto no hubiera sido posible!

Quiero empezar dándole las gracias a Alberto por lo que me has aportado científicamente, pero también a nivel personal. Aunque en algún momento me hubiera gustado que tuvieras un poco más de tiempo para discutir el proyecto, los resultados obtenidos y los que no salieron nunca, tengo que reconocer que has estado ahí en otros aspectos igual o más importantes, por lo que te agradezco sinceramente todo lo que has hecho por mí. Pienso que es difícil encontrar un jefe que se preocupe por la gente que trabaja para él de la manera que tú lo haces. Además, sin tu ayuda la experiencia que he vivido en Londres estos dos últimos años no habría sido posible y eso siempre será una de las cosas que más te voy a agradecer, puesto que este tiempo ha sido un gran impulso para mi tanto a nivel profesional como personal.

También quiero agradecer a toda la gente del laboratorio con la que he tenido el placer de trabajar estos años y sin los cuales no habría sido posible llegar hasta aquí. Algunos ya no están, otros han llegado hace poco y el resto habéis compartido conmigo muchos de los años que he pasado en el laboratorio. Como no podía ser de otra forma, quiero empezar por mis niñas CCR con las que he compartido tantos momentos geniales dentro y fuera del laboratorio. Sarita, tú has estado ahí desde el principio y, además, fuiste la persona con la que más afín me sentí desde el primer momento. Son tantos los grandes momentos que hemos compartido que desde hace ya mucho tiempo te considero mucho más que una compañera de trabajo, sin olvidar toda la ayuda a nivel

profesional y apoyo técnico recibido por tu parte, mil gracias! María, siempre dispuesta a ayudar en lo que hiciera falta, no hay duda que quede sin resolver teniéndote cerca (y no sólo laboral, con quién sino podría investigar cosas como los efectos del yeso sobre el crecimiento del pelo?), de verdad que no sé cómo has tenido tanta paciencia conmigo. Sin ti esta tesis no tendría ni continente ni contenido. Eres el pilar del grupo!! Mireia, aunque técnicamente estemos en dos grupos distintos, para mi has sido siempre una CCR más. Mil gracias por las conversaciones “a les escales”, por los ánimos, el apoyo y por tener siempre un abrazo preparado en el momento necesario. Laureta, que aunque ya hace tiempo que abandonara el barco, fuiste la que pasaste más horas enseñándome técnicas en mi primer año en el laboratorio. Tampoco puede faltar mención a la última adquisición del grupo: Curro, con tu humor y tus parecidos entre personajes variopintos y gente del hospital has conseguido que nunca falten carcajadas en la sala de becarios, las comidas ni en ningún otro momento. También Cris Santos, que aunque últimamente seas difícil de ver, siempre has estado ahí para resolver dudas médicas y demás. Mónica, aunque casi no hayamos coincidido, ha sido un placer tenerte al lado en la poyata siempre con una sonrisa o dispuesta a hablar de lo que hiciera falta. Natalia, con tu energía desbordante, tu buen humor y tus ganas de hacer cosas, espero que sigas mucho tiempo en Barcelona! Samu, eres un gentleman, con rosa o sin! Siempre que he necesitado a alguien para echarme un cable con las inmunos o lo que fuera, estabas ahí.

Muchas gracias a la gente del resto de grupos del LRT1, por haberme ayudado a aprender, por prestarme reactivos siempre que lo necesitaba (lo cual solía pasar con frecuencia...) pero sobretodo por ser tan buenos compañeros y por todos los momentos especiales que hemos pasado dentro y fuera del lab. Lara, siempre pendiente de tener detalles y ayudar a todo el mundo, eres una de las personas con más paciencia que conozco, un ejemplo a seguir! Gracias por todas esas conversaciones y buenos momentos. La gente de virus: Cris, Edu, Raúl, Marta, Rafa, Luis, Alba, Miriam, y también los que habéis llegado hace menos como Ahmed, Carlos y Marcel, y los que ya no están como Miguel o Jordi. Tampoco puede faltar mención al grupo de angio: Elisenda, Mar, Marta, Agnès, Mariona, Gaby, Lídia, Nicklas, pero sobre todo a Mercè, no solo por ser la que mejor me entiende cuando me desespero con las líneas celulares de teste, sino por toda la ayuda prestada en todos los aspectos habidos y por haber de mi tesis y por los grandes momentos dentro y fuera del trabajo... Visca Mr Bolas! También a Helena, Jack y Gorka, así como Griselda y otras personas que hace tiempo que dejaron el laboratorio como Ernest, Maria o Jéssica, con quien también he pasado muy buenos momentos. Y también a gente del LRT2 como Vane, Joan, Paco, Nuri, Gau... Con mención especial a mis compañeras de zulo, con quien tantos ratos de escritura, dudas, nervios y alguna que otra queja he compartido. Juntas hemos perfeccionado el arte de mantener a ralla las plagas de avispas, una gran experiencia!!!

Gracias a Marga Nadal por las horas de paciencia dedicadas al FISH y darme otra visión científica de las cosas, a Francesc Viñals por aceptar la tutorización de la tesis y a August Vidal por toda la ayuda interpretando resultados histológicos y por la visión clínica que me has aportado y que me ha permitido entender muchas cosas.

Tampoco me puedo olvidar de toda la gente con la que he tenido el placer de compartir los últimos dos años en Londres. Isabel, por haberme enseñado muchas más cosas de las que podría haberme imaginado aprender, por estar siempre ahí con la paciencia y la energía que te caracteriza. Eres una de las personas más brillantes a nivel científico y personal que he conocido. Esta aventura no hubiera sido posible sin ti. También a Maite por todo lo que hemos vivido juntas dentro, pero sobretodo fuera del lab, sabes que estás en un puesto de honor entre mis amistades. Mariecke por tu paciencia y por compartir tus conocimientos interminables conmigo, Isaac por los buenos ratos y las risas en la *quiet room*, Sari por darme una visión diferente de muchas cosas, y un largo etcétera de personas que hicieron mi integración y mi trabajo en el laboratorio del Institute of Cancer Research algo fácil, cómodo y una experiencia inolvidable. Olatz y Alberto, por esas conversaciones interminables, por tantos buenos momentos juntos, los viajes y *road trips*, y un largo etc. Martín, que estuviste ahí literalmente desde el primer día y con quien he podido contar siempre para cualquier cosa. A Georgina y Carla por hacerme sentir como en casa, y al resto del grupo de “Els Catalans”. Gracias también a Tanja y a The Pennard’s Road Family porque sin vosotros Londres no hubiera sido lo mismo!!! Sobre todo a Paco: estuviste ahí casi desde el principio de mi aventura en Londres ayudándome, animándome y poniéndome en mi sitio cada vez que perdía el rumbo. Cerca o lejos, gracias por hacerme sentir que siempre estas a mi lado, por todo lo que hemos vivido juntos y por lo mucho que nos queda por vivir!

Finalmente, pero no por eso menos importante, quiero agradecer a Aisea y Míquel toda vuestra ayuda. Después de tantísimos años juntos, ya os considero mis hermanos! En realidad, no hacen falta palabras porque ya sabéis todo lo que significáis para mí. A Sara, Alberto, Carlos, Mónica, Ira, Aleix y Llanos por todos los buenos momentos. A Joel, *dear cousin*, por tu energía, entusiasmo y visión positiva de la vida. A mi queridísima y admirada tía Alicia, por ser un referente para mí en muchos aspectos y ayudarme a convertir los sueños en realidades. A Carles, Montse y a mis abuelos Bernardo, Geli, Joan y Elodia por todo lo que me habéis enseñado de la vida. Pero, sobre todo, un agradecimiento muy especial a mis padres que han conseguido que haya llegado hasta donde me encuentro hoy. Sin vuestro apoyo incondicional, ánimos y ayuda, ni esta tesis ni muchas otras cosas hubieran sido posibles.

**Muchísimas gracias a todos!!!**



# ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	1
INTRODUCCIÓN.....	5
1. TUMORES GERMINALES .....	7
2. TUMORES GERMINALES TESTICULARES .....	9
2.1. Epidemiología y factores de riesgo .....	11
2.2. Anatomía patológica .....	13
2.2.1. Seminoma .....	15
2.2.2. No seminoma.....	16
2.3. Diagnóstico y estadificación.....	18
2.4. Bases moleculares de los TCGTs.....	21
2.4.1. Biología de las células germinales.....	21
2.4.2. Neoplasia intratubular de células germinales ( <i>carcinoma in situ</i> ).....	22
2.4.3. Alteraciones genéticas asociadas a TCGTs .....	23
2.4.4. Epigenética.....	26
3. TRATAMIENTO.....	28
3.1. Tratamiento del estadio I.....	29
3.2. Tratamiento de la enfermedad avanzada.....	30
3.3. Tratamiento de rescate .....	32
3.4. Toxicidad del tratamiento .....	32
3.5. Nuevas combinaciones y dianas terapéuticas.....	34
4. CISPLATINO .....	36
4.1. Mecanismo de acción .....	38
4.2. Mecanismos de resistencia .....	39
4.2.1. Mecanismos de resistencia antes de la unión al DNA .....	39
4.2.2. Mecanismos de resistencia tras la unión al DNA.....	41
4.3. Mecanismos de resistencia en TCGTs .....	44
4.3.1. Mecanismos de resistencia antes de la unión al DNA .....	45
4.3.2. Mecanismos de resistencia tras la unión al DNA.....	47
5. EL MODELO <i>IN VIVO</i> : LOS XENOIMPLANTES ORTOTÓPICOS .....	51
5.1. Animales modificados mediante ingeniería genética .....	51
5.2. Animales con xenoinjertos.....	52
HIPÓTESIS.....	55
OBJETIVOS.....	59
MATERIALES Y MÉTODOS.....	63

<b>CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA AL CISPLATINO EN TCGTs <i>IN VITRO</i></b> .....	65
1. LÍNEAS CELULARES DE TCGTs .....	65
2. CURVAS DE VIABILIDAD CELULAR.....	66
3. SECUENCIACIÓN DE ÚLTIMA GENERACIÓN .....	67
3.1. Extracción de gDNA de las muestras .....	68
3.2. Enriquecimiento de dianas y preparación de las muestras .....	68
3.3. Secuenciación .....	70
3.4. Análisis bioinformático.....	70
4. <i>SCREEN</i> CON <i>SMALL INTERFERING RNAs</i> .....	71
4.1. Optimización.....	72
4.2. <i>Screen</i> .....	75
4.3. Análisis estadístico .....	77
5. VALIDACIÓN <i>HITS</i> POTENCIALES .....	79
5.1. Curvas de viabilidad con siRNAs <i>pool</i> .....	79
5.2. Curvas de viabilidad con oligos individuales .....	79
6. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE PARP6.....	79
6.1. Líneas celulares.....	80
6.2. Curvas de viabilidad celular .....	80
6.3. Transfección con siRNAs.....	80
6.4. <i>Time lapse</i> .....	81
6.5. Citometría de flujo.....	82
6.6. Extracción proteica .....	85
6.7. Western Blot.....	86
6.8. Inmunofluorescencia para $\gamma$ -H2AX .....	88
<b>ESTUDIO DE LA ADQUISICIÓN DE RESISTENCIA <i>IN VIVO</i></b> .....	90
1. GENERACIÓN <i>IN VIVO</i> DE TUMORES RESISTENTES AL CDDP .....	90
1.1. Recogida y procesado de muestras.....	90
1.2. Implantación ortotópica.....	90
1.3. Tratamiento con dosis crecientes de fármaco.....	92
1.4. Determinación sérica de $\beta$ -HCG y AFP .....	94
2. NGS DE TUMORES SENSIBLES/RESISTENTES A CDDP .....	95
<b>EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LA TERAPIA COMBINADA CDDP+PARPi</b> .....	98
1. ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> .....	98
1.1. Ensayos de viabilidad celular .....	98
1.1.1. Ensayos de corta duración.....	98
1.1.2. Ensayos de formación de colonias .....	99
1.2. Inmunofluorescencia para $\gamma$ -H2AX y RAD51.....	99
1.3. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo.....	100
2. TERAPIA COMBINADA <i>IN VIVO</i> .....	100
2.1. Fármacos.....	100

2.2. Esquema de tratamiento de los animales .....	101
2.3. Tinción hematoxilina-eosina .....	102
2.4. Inmunohistoquímica Ki67 .....	103
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>105</b>
<b>OBJETIVO 1. Caracterización de los mecanismos de resistencia al cisplatino en TCGTs <i>in vitro</i>.</b> .....	<b>107</b>
1. CARACTERIZACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DIFERENCIAL AL CISPLATINO EN LÍNEAS CELULARES PAREADAS DE CÁNCER TESTICULAR .....	107
2. ESTUDIO DE MUTACIONES ASOCIADAS AL FENOTIPO SENSIBLE/RESISTENTE EN UNA LÍNEA CELULAR DE TCGT .....	108
3. EFECTO DE LAS MUTACIONES SELECCIONADAS SOBRE LA SUPERVIVENCIA CELULAR Y BÚSQUEDA DE OTROS GENES RELACIONADOS CON LA ADQUISICIÓN DE RESISTENCIA A CDDP .....	110
4. VALIDACIÓN DE LOS <i>HITS</i> POTENCIALMENTE IMPLICADOS EN EL PROCESO DE ADQUISICIÓN DE RESISTENCIA .....	115
<b>OBJETIVO 2. Caracterización funcional del gen <i>PARP6</i> y valoración de su relevancia en mecanismos relacionados con resistencia al CDDP.</b> .....	<b>119</b>
1. EFECTO DE LOS CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE <i>PARP6</i> SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR .....	119
2. PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA <i>PARP6</i> EN LA REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR .....	122
3. PAPEL DE <i>PARP6</i> EN REPARACIÓN DE LESIONES INDUCIDAS EN EL DNA .....	125
<b>OBJETIVO 3. Estudio de la adquisición de resistencia al cisplatino <i>in vivo</i> en un modelo de tumores testiculares xenoimplantados ortotópicamente en ratones.</b> .....	<b>128</b>
1. DESARROLLO DE UN MODELO DE RESISTENCIA ADQUIRIDA <i>IN VIVO</i> AL CDDP .....	128
2. ESTUDIO DE LAS MUTACIONES ASOCIADAS CON LA APARICIÓN DEL FENOTIPO RESISTENTE EN MUESTRAS DE TUMORES .....	129
2.1. Perfil mutacional del caso 1 (TGT21, tumor mixto SE y NSE) .....	133
2.2. Perfil mutacional del caso 2 (TGT12, CE) .....	134
2.3. Perfil mutacional del caso 3 (TGT1, TSE) .....	134
2.4. Perfil mutacional del caso 4 (TGT17, Chr) .....	135
2.5. Perfil mutacional del caso 5 (TGT44, TSE y Ter) .....	136
2.6. Perfil mutacional del caso 6 (TGT47, TSE) .....	136
2.7. Perfil mutacional del caso 7 (TGT49, Chr) .....	137
2.8. Perfil mutacional del caso 8 (TGT38, Chr) .....	137
2.9. Perfil mutacional del caso 9 (TGT34, CE) .....	138
3. ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS MUTACIONES DESCRITAS EN CÉLULAS Y MUESTRAS DE TUMORES .....	138

<b>OBEJTIVO 4. Evaluación de la eficacia de la terapia combinada con cisplatino y un inhibidor de las PARPs en tumores testiculares refractarios al tratamiento convencional.</b>	141
1. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR EN UNA LÍNEA PAREADA SENSIBLE vs RESISTENTE AL CDDP TRATADA CON LA COMBINACIÓN DE FÁRMACOS	141
2. EFECTO DE LA TERAPIA COMBINADA SOBRE LA CAPACIDAD CELULAR DE REPARAR LESIONES EN EL DNA	143
3. EVALUACIÓN DEL CICLO CELULAR EN CÉLULAS TRATADAS CON CDDP + OLAPARIB	146
4. EFICACIA DE LA COMBINACIÓN <i>IN VIVO</i> EN RATONES ATÍMICOS XENOINJERTADOS CON TUMORES REFRACTARIOS	148
<b>DISCUSIÓN</b>	155
1. MECANISMOS GENÉTICOS DE ADQUISICIÓN DE RESISTENCIA A CISPLATINO EN TUMORES TESTICULARES	157
1.1. Estudio de mutaciones asociadas al fenotipo resistente	158
1.2. Caracterización de <i>PARP6</i> y papel en la adquisición de resistencia	170
2. TERAPIA COMBINADA DE CDDP CON UN PARPi EN EL TRATAMIENTO DE TUMORES REFRACTARIOS	173
<b>CONCLUSIONES</b>	179
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	183
<b>ANEXOS</b>	205
ANEXO PRIMERO	207
ANEXO SEGUNDO	219



## **ABREVIATURAS**



## ABREVIATURAS

<b>AFP</b>	Alfa-fetoproteína
<b>ALX4</b>	<i>ALX homeobox 4</i>
<b>ATP</b>	<i>Adenosine triphosphate</i>
<b>BAX</b>	<i>BCL2-associated X protein</i>
<b>BCL-2</b>	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
<b>BEP</b>	Bleomicina + etopósido + cisplatino
<b>BER</b>	<i>Base excision repair</i>
<b>BRCA2</b>	<i>Breast cancer 2, early onset</i>
<b>BSA</b>	<i>Bovine serum albumin</i>
<b>β-HCG</b>	<i>Human chorionic gonadotropin</i>
<b>CBDCA</b>	Carboplatino
<b>CE</b>	Carcinoma embrionario
<b>CDDP</b>	Cisplatino (cis-diaminodicloroplatino(II))
<b>CDK-2</b>	<i>Cyclin-dependent kinase 2</i>
<b>CGC</b>	<i>Cancer gene census</i>
<b>CGH</b>	<i>Compared genomic hybridization</i>
<b>CGP</b>	Célula germinal primordial
<b>Chr</b>	Coriocarcinoma
<b>CIS</b>	Carcinoma <i>in situ</i>
<b>CTG</b>	<i>CellTiter-Glo</i>
<b>CTR1/2</b>	<i>Copper transporter receptor 1/2</i>
<b>D.O.</b>	Densidad óptica
<b>DAM</b>	Desviación absoluta media
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DEPC</b>	dietilpirocarbonato
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
<b>DSB</b>	<i>Double-strand breaks</i>
<b>DSBR</b>	<i>Double-strand break repair</i>
<b>dsRNA</b>	<i>Double strand RNA</i>
<b>ED</b>	Efecto de la droga

<b>ERCC1</b>	<i>Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1</i>
<b>FANCA</b>	<i>Fanconi anemia, complementation group A</i>
<b>FBS</b>	<i>Fetal bovine serum</i>
<b>FDA</b>	<i>US food and drug administration</i>
<b>FS</b>	Fracción superviviente
<b>FSh</b>	<i>Frameshift</i>
<b>gDNA</b>	DNA genómico
<b>GFP</b>	<i>Green fluorescent protein</i>
<b>Gy</b>	Gray
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina-eosina
<b>H<sub>2</sub>O<sub>d</sub></b>	Agua destilada
<b>HR</b>	Recombinación homóloga
<b>HRP</b>	<i>Horseradish peroxidase-linked</i>
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>ICL</b>	<i>Interstrand crosslink</i>
<b>ICR</b>	<i>Institute of Cancer Research</i>
<b>IF</b>	Inmunofluorescencia
<b>IGCCCG</b>	<i>International germ cell cancer collaborative group</i>
<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímica
<b>KD</b>	<i>Knock-down</i>
<b>LARP</b>	Linfadenectomía retroperitoneal
<b>LDH</b>	Lactato deshidrogenasa
<b>MDM2</b>	<i>MDM2 oncogene, E3 ubiquitin protein ligase</i>
<b>miRNA</b>	microRNA
<b>MMR</b>	<i>Mismatch repair</i>
<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>MRP</b>	<i>Multidrug resistance-associated protein</i>
<b>MSH</b>	<i>MutS homologue protein</i>
<b>MSI</b>	<i>Microsatellite instability</i>
<b>NER</b>	<i>Nucleotide excision repair</i>
<b>NGS</b>	<i>Next generation sequencing</i>
<b>NITCG</b>	Neoplasia intratubular de células germinales
<b>NMD</b>	<i>Nonsense-mediated mRNA decay</i>
<b>NSC</b>	No sinónima codificante (mutación)

<b>NSE</b>	No seminoma
<b>O/N</b>	<i>Overnight</i>
<b>OMS</b>	Organización mundial de la salud
<b>OptiMEM</b>	<i>Optimized minimal essential medium</i>
<b>PARP</b>	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i>
<b>PARPi</b>	Inhibidor de PARP
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<b>PBS-T</b>	<i>Phosphate buffered saline-triton X-100</i>
<b>PEI</b>	Cisplatino + etopósido + ifosfamida
<b>PI</b>	Ioduro de propidio
<b>PLAP</b>	<i>Placental alkaline phosphatase</i>
<b>PLK1</b>	<i>Polo-like kinase 1</i>
<b>qPCR</b>	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
<b>QT</b>	Quimioterapia
<b>R</b>	Resistente
<b>RB</b>	Retinoblastoma
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic acid</i>
<b>RNAi</b>	RNA de interferencia
<b>RPMI</b>	<i>Roswell park memorial institute medium</i>
<b>RT</b>	Radioterapia
<b>S</b>	Sensible
<b>SE</b>	Seminoma
<b>SG</b>	Stop ganado
<b>siRNA</b>	<i>Small interfering RNA</i>
<b>SL</b>	Stop perdido
<b>SMARCB1</b>	<i>SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1</i>
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SNP</b>	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
<b>SRB</b>	<i>Sulforhodamine-B assay</i>
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TBS</b>	<i>Tris-buffered saline</i>
<b>TCG</b>	Tumor de células germinales
<b>TCGT</b>	Tumor de células germinales testiculares
<b>TE</b>	Teratoma

<b>WB</b>	<i>Western blot</i>
<b>wt</b>	<i>Wild type</i>
<b>XPA</b>	<i>Xeroderma pigmentosum complementation group A</i>
<b>XPF</b>	<i>Xeroderma pigmentosum complementation group F</i>
<b>YS</b>	Tumor del seno endodérmico
<b>γ-H2AX</b>	<i>H2A histone family, member X (fosforilada)</i>

# **INTRODUCCIÓN**



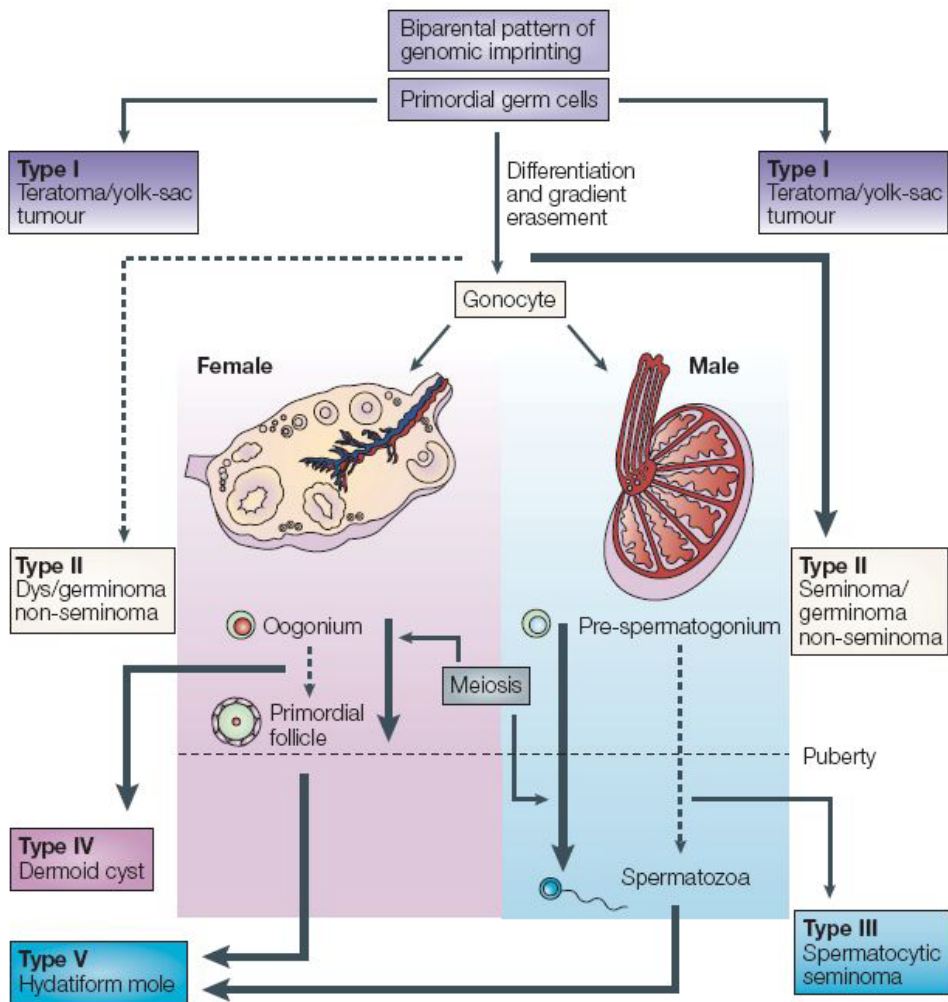


## 1. TUMORES GERMINALES

Los tumores de células germinales (TCGs) son un grupo heterogéneo de neoplasias que se originan en células provenientes del linaje de células germinales. Suelen desarrollarse en las gónadas, aunque también pueden aparecer a lo largo de toda la línea media del organismo, por ejemplo en el mediastino, retroperitoneo o la glándula pineal y, muy raramente, en otros órganos (Oosterhuis and Looijenga, 2005). Esta distribución anatómica probablemente está relacionada con la ruta de migración de las células germinales primordiales durante la embriogénesis (Oosterhuis and Looijenga, 2005; Wylie, 1999).

El comportamiento clínico de estos tumores depende del sexo y la edad del paciente, así como de la localización anatómica y composición histológica del tumor (Looijenga and Oosterhuis, 1999). Se dividen, según la clasificación aceptada en 2004 por la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 5 entidades con diferente epidemiología, curso clínico, histología y genética, tal y como se muestra en la **tabla 1** (Oosterhuis and Looijenga, 2005; van de Geijn et al., 2009). Los TCGs tipo I comprenden los teratomas y tumores del seno endodérmico o *yolk sac* de neonatos y niños, que se desarrollan, en la mayoría de los casos, en testículos, ovarios, región sacra o retroperitoneal, cabeza y cuello, o sistema nervioso central. Los TCGs tipo II comprenden tumores seminomatosos (llamados seminomas cuando ocurren en los testículos o en el mediastino anterior, disgerminomas cuando aparecen en los ovarios y germinomas cuando ocurren en el cerebro) y no seminomatosos que pueden presentarse también en todas las localizaciones descritas anteriormente para los tumores seminomatosos. De todos ellos, los TCGs testiculares de adolescentes y adultos (TCGTs tipo II) han captado la mayor parte de la atención por ser el tipo más frecuente, así como por su incomparable sensibilidad a la quimioterapia (QT), incluso en estadios avanzados (Piulats et al., 2009). Los TCGs tipo III o seminomas espermatocíticos son tumores exclusivamente testiculares y ocurren predominantemente en pacientes mayores de 50 años, siendo en la gran mayoría de los casos tumores benignos. Los TCGs tipo IV comprenden los quistes dermoides que se

desarrollan a partir de oogonias u oocitos en el ovario y, al igual que los tumores tipo III, suelen ser las variantes más benignas. Finalmente, los TCGs tipo V son las molas hidatidiformes que se desarrollan a partir de un óvulo vacío fecundado por un espermatozoide (Oosterhuis and Looijenga, 2005; van de Geijn et al., 2009).



**Figura 1.-** Representación esquemática del origen propuesto para los diferentes tipos de tumores de células germinales (extraído de *Oosterhuis and Looijenga, Nat Rev Cancer 2005*).

**Tabla 1.-** Clasificación de los tumores de células germinales aceptada por la OMS.

Tipo	Localización	Fenotipo	Edad	Origen	Genotipo	Modelo Animal
I	Teste/ovario/región sacra/retroperitoneo/mediastino/cuello/SNC/otros	Teratoma/TSE	Neonatos y niños	CGP/gonocito	Diploide (teratoma). Aneuploide (TSE). Ganancias 1q, 20q y 12(p13); pérdidas 1p, 4 y 6q	Teratoma murino
II	Teste	Seminoma/NSE	>15 años	CGP/gonocito	Aneuploide (+/- tripl). Ganancias X, 7, 8, 12p, y 21; pérdidas Y, 1p, 11, 13 y 18	No disponible
	Ovario	Disgerminoma/NSE	>4 años	CGP/gonocito	Aneuploide	No disponible
	Disgenesia gonadal	Disgerminoma/NSE	Congénito	CGP/gonocito	Diploide/tetraploide	No disponible
	Mediastino anterior	Seminoma/NSE	>15 años	CGP/gonocito	Diploide/tri-tetraploide	No disponible
	SNC (pineal)	Germinoma/NSE	Niños	CGP/gonocito	Diploide/tri-tetraploide	No disponible
III	Teste	Seminoma espermatocítico	>50 años	Espermatogonia/espermatocito	Aneuploide: ganancia 9	Seminoma canino
IV	Ovario	Quiste dermoide	Niños/adultos	Oogonia/oocito	Diploide/tetraploide. Ganancias X, 7, 12 y 15	Ratón ginogenote
V	Placenta/útero	Mola hidatidiforme	Edad fértil	Óvulo vacío/espermatozoa	Diploide (XX y XY)	Ratón androgenote

(SNC: Sistema Nervioso Central; TSE: Tumor del Seno Endodérmico; NSE: No Seminoma; CGP: Célula Germinal Primordial).

## 2. TUMORES GERMINALES TESTICULARES

De entre los 5 grupos mencionados en el apartado anterior, los tumores de células germinales de testículo (TCGTs) están representados en 3 de ellos: los teratomas y tumores del seno endodérmico (TSE) de los recién nacidos y niños (tipo I); los tumores tipo seminoma (SE) y no seminoma (NSE) de adolescentes y adultos jóvenes (tipo II); y, por último, los seminomas espermatocíticos (tipo III) (Oosterhuis and Looijenga, 2005).

Los TCG tipo I son tumores que pueden aparecer tanto en las gónadas masculinas como en los ovarios, a la vez que en otras regiones a lo largo de la línea media, como el área sacrococcigea. La incidencia es bastante baja, alrededor de 0,12 por cada 100.000 personas. La forma más frecuente de presentación es el teratoma sacro, siendo este el

tumor sólido más frecuente del recién nacido. Suelen ser tumores con un comportamiento benigno pero pueden recidivar si la resección quirúrgica no es completa y progresar a tumores del seno endodérmico, que sí tienen la capacidad de metastatizar y tienen que ser abordados de manera más agresiva con esquemas de tratamiento que incluyan QT (Oosterhuis and Looijenga, 2005).

Los TCG tipo III o seminomas espermatocíticos son tumores que aparecen en el testículo a edades superiores a los 50 años. Su incidencia es baja, alrededor de 0,2 por cada 100.000 personas (Chung et al., 2004). Se trata de una enfermedad exclusivamente testicular y se puede presentar de forma bilateral (aprox. 5% de los casos). El comportamiento clínico es el de un tumor benigno que se cura con la extirpación del testículo u orquiectomía. Es extremadamente raro, pero en algunos casos estos tumores pueden progresar a sarcomas (Oosterhuis and Looijenga, 2005).

Tanto los TCGs tipo I como los tipo III cuentan con modelos preclínicos para su estudio (Damjanov et al., 1971; Looijenga et al., 1994; Solter and Damjanov, 1979; Stevens, 1970) (**tabla 1**). Sin embargo, existe una remarcable falta de modelos preclínicos bien establecidos para el estudio de los TCGTs de tipo II o SE y NSE del adolescente o adulto joven (Piulats et al., 2009; van de Geijn et al., 2009), que son el tipo de tumor más frecuente entre los tres grupos mencionados y también la neoplasia más usual entre varones de 15 a 40 años de edad (Hussain et al., 2008; Viatori, 2012). Este hecho se debe, posiblemente, a la falta de conocimiento de las alteraciones genéticas que predisponen a desarrollar esta enfermedad. Por ser el foco de estudio del presente trabajo, a partir de ahora nos centraremos exclusivamente en los TCGTs de tipo II.

Los TCGTs tipo II (o, simplemente, TCGTs a partir de ahora) comprenden más del 95% de todos los tumores testiculares (Ye and Ulbright, 2012) y constituyen una enfermedad paradigmática en Oncología ya que, a pesar de ser poco frecuentes, afectan a pacientes jóvenes y en edad reproductiva. Son considerados tumores de verdaderas células madre, capaces de diferenciarse a tejidos somáticos, extra-embrionales e, incluso, el mismo linaje de células germinales (van de Geijn et al., 2009). Se caracterizan, además,

por su respuesta sin igual a terapias de daño en el DNA (del inglés *deoxyribonucleic acid*), lo que se traduce en una elevada tasa de curaciones, incluso en estadios avanzados (Nitzsche et al., 2010; Schrader et al., 2009). Actualmente, la investigación clínica en este campo se centra en la reducción de la toxicidad asociada a la terapéutica en los estadios precoces, mediante el concepto de tratamiento adaptado al riesgo, y en la búsqueda de terapias aún más eficaces y con menos efectos secundarios a corto y largo plazo para aquellos casos de mal pronóstico o con enfermedad refractaria al tratamiento convencional.

## 2.1. Epidemiología y factores de riesgo

Los TCGTs representan el 2% de todas las neoplasias del varón. Sin embargo, son el tumor maligno más frecuente entre los 15 y 40 años de edad en hombres caucásicos (Mannuel et al., 2012; Viatori, 2012; Winter and Albers, 2011). Se estima que unos 8.000 casos nuevos son diagnosticados cada año en Estados Unidos (EE.UU.), de los cuales 360 mueren a causa de la enfermedad (Viatori, 2012). La probabilidad de padecer esta enfermedad a lo largo de la vida para individuos masculinos nacidos en EE.UU. es de 1 por cada 271 (Ye and Ulbright, 2012). Su incidencia en los países occidentales se ha duplicado en los últimos 30-40 años (Gilbert et al., 2011a; Mannuel et al., 2012), fundamentalmente los estadios más precoces, hecho atribuible a factores tanto prepuberales como postpuberales (Garner et al., 2005). Se ha observado que la raza blanca es más proclive a sufrir esta enfermedad, siendo 5 veces más común entre hombres blancos que negros (Viatori, 2012). Globalmente, las tasas más altas de incidencia ocurren en el oeste y norte de Europa, seguidos por Australia y América del Norte, mientras que las tasas más bajas se registran en el este de Asia y África (Meeks et al., 2012). En España se diagnostican anualmente unos 400-500 casos nuevos, lo que representa 1,5-2 casos/100.000 varones y año (Germa-Lluch et al., 2002).

La edad media de presentación se sitúa en los 35 años para SE y los 25 para NSE, mientras que los tumores mixtos aparecen entre ambas edades. Las neoplasias

testiculares por encima de los 50 años son excepcionales y suelen corresponder a linfomas o seminomas espermatocíticos (Chung et al., 2004; Eble, 1994).

La etiología es desconocida, pero su origen más probable parece estar relacionado con varias afecciones genitourinarias que han sido asociadas con un mayor riesgo de padecer esta enfermedad, como la criptorquidia, presente en los antecedentes de un 10% de los pacientes y asociada con un riesgo incrementado de hasta 5-8 veces de padecer este tipo de neoplasias (Manuel and Hussain, 2009; Meeks et al., 2012), hernia inguinal, hidrocele, disgenesias testiculares o espermatogénicas y desarrollos testiculares anómalos como los asociados al síndrome de Klinefelter, disgenesia XY y síndrome de Down (Gilbert et al., 2011a; Houldsworth et al., 2006; Oosterhuis and Looijenga, 2005). Otro factor de riesgo a tener en cuenta en el desarrollo de un cáncer de testículo es la existencia de un tumor germinal contralateral previo, lo que sucede en un 1-5% de los casos (Taberner et al., 2004). También se han identificado agregaciones familiares con un riesgo incrementado de 6 a 10 veces de padecer TCGT en parientes de primer grado. El riesgo acumulado a los 50 años de padecer esta enfermedad en hermanos de un paciente afecto es de 2.2% (Chia et al., 2009). Sin embargo, sólo un 1% de todos los TCGTs parecen tener una etiología hereditaria y es difícil separar la genética de una exposición ambiental común o factor en el estilo de vida (Meeks et al., 2012). Los estudios de agregación genética que se han llevado a cabo en individuos con agregación familiar indican que el *locus* Xq27 podría contener un gen de susceptibilidad a la enfermedad, aunque el estudio llevado a cabo posteriormente por el mismo grupo con un número mayor de familias no pudo demostrar la importancia de un área concreta, pero sí múltiples *loci* de susceptibilidad más débil (Crockford et al., 2006; Rapley, 2007). El cromosoma Y también podría jugar un papel importante en la susceptibilidad a padecer TCGTs. Así, la existencia de una delección de 1.6 Mb en este cromosoma designada *gr/gr* ha sido relacionada en varios estudios con infertilidad y el desarrollo de neoplasias testiculares (Nathanson et al., 2005; Rapley, 2007; Turnbull and Rahman, 2011).

Otro aspecto que se ha estudiado es la importancia de los niveles de andrógenos durante la adolescencia en la aparición de estos tumores. Parece ser que niveles altos de

estas hormonas durante la pubertad podrían estar asociados a un menor riesgo de padecer tumores testiculares (Trabert et al., 2011).

Las infecciones prenatales también han sido postuladas como un contribuidor potencial al riesgo de padecer TCGTs (Mannuel and Hussain, 2009). *Holl y cols.* llevaron a cabo un estudio de caso-control para evaluar el papel de infecciones congénitas o neonatales producidas por el virus de Epstein-Bar (EBV) o el citomegalovirus (CMV) como factores de riesgo para el desarrollo de TCGTs. Los resultados mostraron una asociación entre niveles elevados de anticuerpos inmunoglobulina G (IgG) maternos contra EBV y un aumento significativo del riesgo de padecer cáncer testicular en neonatos. Por el contrario, madres seropositivas para IgG contra CMV se asociaron con un menor riesgo de TCGT en sus descendientes (Holl et al., 2008).

Finalmente, exposiciones ambientales y ocupacionales parecen tener un papel cada vez más relevante como factores de riesgo en TCGTs. Recientemente, ha sido postulado que niveles alterados de hormonas del embarazo podrían iniciar un ambiente prenatal favorable para el desarrollo del cáncer testicular (Gilbert et al., 2011a; Mannuel et al., 2012). También parece estar relacionada la hipertensión gestacional en el útero, aumentando el riesgo de padecer tanto SE como NSE casi un 50% (Cook et al., 2008). Otro factor que podría jugar un papel en la predisposición a padecer estos tumores son los disruptores endocrinos, como los pesticidas organoclorados, ftalatos y polivinilcloruro (PVC). Varios estudios parecen encontrar relaciones entre la exposición a estos compuestos y el riesgo de desarrollar estas neoplasias (Meeks et al., 2012; Winter and Albers, 2011).

En resumen, las evidencias apuntan a una combinación de factores genéticos y ambientales en la etiología de estos tumores.

## **2.2. Anatomía patológica**

Las neoplasias testiculares pueden derivar de cualquiera de las células presentes en el testículo, como son las células germinales, las células del estroma gonadal o tejido

de soporte, etc. (**tabla 2**). Aunque la mayoría de estos tumores se originan en el testículo, existe un grupo reducido (menos del 10%) que aparece en localizaciones extragonadales a lo largo de la línea media, como el mediastino, retroperitoneo y sistema nervioso central.

**Tabla 2.-** Clasificación histológica de los tumores testiculares.

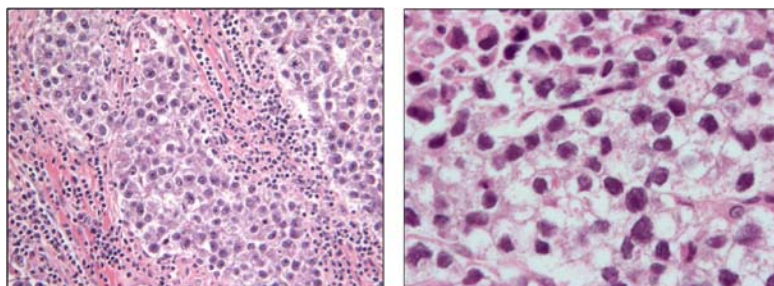
<b>TUMORES DE CÉLULAS GERMINALES</b>
<b>SEMINOMA</b>
Clásico
Anaplásico
Espermatocítico
<b>CARCINOMA EMBRIONARIO</b>
<b>TERATOMA</b>
Maduro
Inmaduro
Con transformación maligna
<b>CORIOCARCINOMA</b>
<b>TUMOR DEL SENO ENDODÉRMICO</b>
<b>TUMOR MIXTO</b>
<b>TUMORES DEL ESTROMA GONADAL</b>
<b>TUMOR DE CÉLULAS DE SERTOLI</b>
<b>TUMOR DE CÉLULAS DE LEYDIG</b>
<b>TUMOR DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA</b>
<b>TUMORES MIXTOS (CÉLULAS GERMINALES Y ESTROMALES)</b>
<b>GONADBLASTOMA</b>
<b>TUMORES ANEXIALES Y PARATESTICULARES</b>
<b>ADENOCARCINOMA DE RETE TESTIS</b>
<b>MESOTELIOMA</b>
<b>MISCELANEA</b>
<b>CARCINOIDE</b>
<b>LINFOMA</b>



El carcinoma *in situ* (CIS), o neoplasia germinal intratubular, está presente en la práctica totalidad de los TCGTs y es la lesión precursora de los tumores germinales invasivos tipo II (Oosterhuis and Looijenga, 2005). Los TCGTs tipo II se clasifican en SE y NSE en función de su origen, histología y capacidad de diferenciación *in vivo*. La mayoría de tumores NSE son mixtos e incluyen múltiples tipos celulares, pudiendo incluso encontrarse SE. Además, se ha observado que los SE pueden transformarse en NSE mediante un fenómeno llamado reprogramación o activación de pluri(toti)potencia (van de Geijn et al., 2009). Estos tumores testiculares crecen como masas únicas o múltiples que van sustituyendo progresivamente el parénquima testicular, pudiendo alcanzar un gran tamaño antes de atravesar la capa albugínea o cápsula testicular.

### 2.2.1. Seminoma

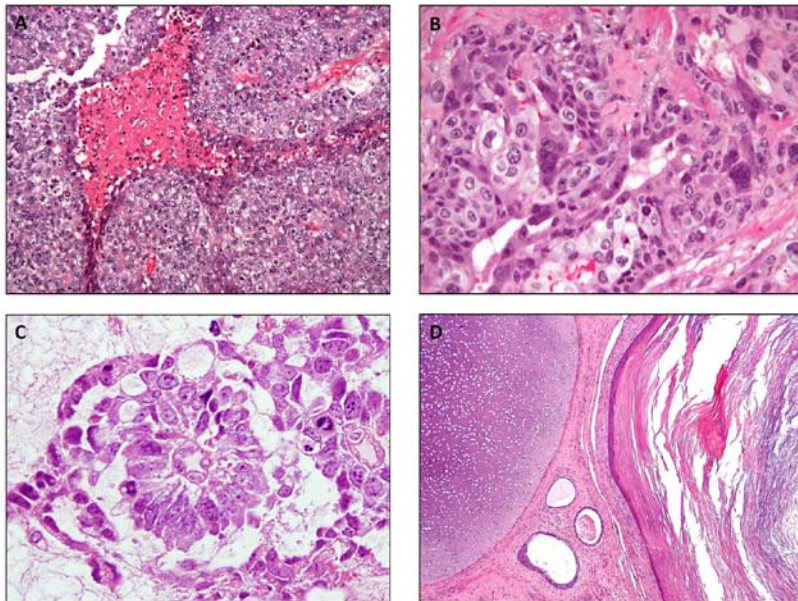
Los seminomas representan, aproximadamente, el 40% de los TCGTs (Mannuel et al., 2012) y son más frecuentes entre los 30 y 40 años. Morfológica e inmunofenotípicamente recuerdan células germinales embrionarias. Suelen tener un índice mitótico elevado, células gigantes sincitiotrofoblásticas, infiltración linfocitaria y niveles séricos elevados de gonadotropina coriónica humana ( $\beta$ HCG) hasta en un 20% de los casos, circunstancias que no modifican su pronóstico aunque varios autores confieren mayor agresividad a los tumores con cifras de  $\beta$ HCG superiores a 1.000 U/L. La mayoría de marcadores tisulares están ausentes, excepto la fosfatasa alcalina placentaria (PLAP), que presenta un patrón predominante de membrana (Ye and Ulbright, 2012). La incidencia de metástasis al diagnóstico en el seminoma clásico se sitúa en un 20-30% (Krege et al., 2008a).



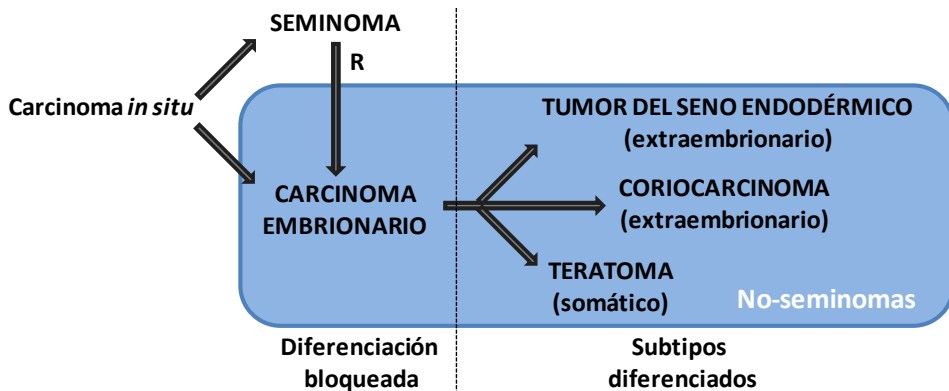
**Figura 2.-** Hematoxilina & eosina (H&E) de un seminoma. Como se puede observar, es un tumor formado por células con citoplasma claro y abundante; y con célula linfocitaria acompañante.

### 2.2.2. No seminoma

El pico de incidencia de los tumores NSE se sitúa entre la segunda y tercera década de la vida. Representan aproximadamente el 50% de todos los TCGTs tipo II. Esta clase de tumor incluye varios subtipos: carcinoma embrionario, coriocarcinoma, tumor del seno endodérmico y teratoma. Predominan las formas mixtas, sobre todo las asociaciones de teratoma y carcinoma embrionario (teratocarcinoma, 28% de los NSE), carcinoma embrionario y tumor del seno endodérmico (26%), así como carcinoma embrionario y seminoma (tumor mixto, 14%). Las variantes puras son raras (carcinoma embrionario 3%, coriocarcinoma 1%, teratoma 1%). El carcinoma embrionario es el más indiferenciado, como demuestra el hecho de que expresa marcadores de células madre como OCT3/4 y NANOG, con capacidad totipotencial para diferenciarse en los otros subtipos; puede producir concentraciones séricas elevadas de alfafetoproteína (AFP),  $\beta$ HCG o ambas. Está compuesto por células que recuerdan un carcinoma anaplásico. El coriocarcinoma se compone de citotrofoblastos y sincitiotrofoblastos; es raro en su forma pura y se asocia habitualmente con una diseminación metastásica hematogena extensa, acusada tendencia al sangrado y niveles muy elevados de  $\beta$ HCG. El tumor del seno endodérmico se asemeja histológicamente al saco vitelino embrionario y casi siempre produce AFP; en su forma pura se encuentra con frecuencia en los tumores germinales mediastínicos. Se caracteriza microscópicamente por la presencia de los cuerpos embrioides de Shiller-Duval. Estos dos últimos subtipos muestran diferenciación extraembrionaria. El teratoma se compone de varios tipos celulares somáticos de cualquiera de las tres capas de células germinales embrionarias (ectodermo, mesodermo o endodermo). Los teratomas maduros constan de tipos celulares con diferenciación adulta como cartílago y epitelio glandular productor de mucina. Por su lado, los teratomas inmaduros presentan diferenciación somática parcial similar a los tejidos fetales y embrionarios, todos de características benignas. Ocasionalmente, un teratoma puede desarrollar un crecimiento agresivo y maligno, y recordar histológicamente una neoplasia somática como rhabdomyosarcoma o adenocarcinoma (Krege et al., 2008a; Oosterhuis and Looijenga, 2005; Winter and Albers, 2011).



**Figura 3.-** H&E representando los diferentes subtipos de NSE. El carcinoma embrionario (A) recuerda un tumor indiferenciado. El coriocarcinoma (B) presenta áreas de citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto. En la imagen C, tumor del seno endodérmico, podemos observar una morfología muy característica presente en estos tipos de tumores: los cuerpos embrioides de Shiller-Duval. La imagen de un teratoma (D) muestra tejido procedente de las tres capas germinales: mesodermo (cartílago inmaduro), endodermo (glándulas gastrointestinales) y ectodermo (epidermis).



**Figura 4.-** Esquema de las histologías de TCGTs tipo II. Los diferentes subtipos de no-seminomas se muestran dentro del área azul. La letra R (reprogramación) indica el proceso mediante el cual un seminoma puede convertirse en NSE (adaptado de *van de Geijn y cols., Birth Defects Research, 2009*).

### 2.3. Diagnóstico y estadificación

La presencia de una masa testicular dura e indolora en un varón joven es patognomónica de un TCGT. Esto sólo ocurre en la mitad de los casos, siendo también posible la presencia de un dolor testicular difuso, tumefacción, aumento de consistencia del testículo o una combinación de los anteriores.

Los pacientes con tumores metastásicos pueden presentar dolor lumbar por infiltración retroperitoneal, disnea o hemoptisis por afectación pulmonar y ginecomastia en relación con cifras elevadas de  $\beta$ HCG en suero (Bosl and Motzer, 1997; Krege et al., 2008a).

Se ha demostrado que un intervalo prolongado entre el primer síntoma y la orquiectomía se relaciona con estadios de presentación más avanzados y, por lo tanto, con un peor pronóstico (Harding et al., 1995).

Entre otras pruebas, se deben determinar los marcadores tumorales séricos AFP,  $\beta$ HCG y lactato deshidrogenasa (LDH) tanto antes de la orquiectomía como después de esta de forma seriada, ya que tienen valor pronóstico y, además, sirven para monitorizar la respuesta al tratamiento (Winter and Albers, 2011). Niveles elevados de AFP y/o  $\beta$ HCG, incluso sin alteraciones clínicas o radiológicas implican enfermedad activa y pueden justificar el inicio del tratamiento. Tras la cirugía y QT o radioterapia (RT), las concentraciones séricas de estos marcadores deben disminuir; por contra, una meseta o descenso subóptimo sugieren actividad neoplásica residual. Además, existe una correlación entre los niveles de marcadores y el volumen de enfermedad metastásica presente y, por lo tanto, con el pronóstico de la enfermedad (Germa-Lluch et al., 1980).

La clasificación actual por estadios de los TCGTs se muestra en la **tabla 3**. Se denomina sistema de estadificación TNM y, básicamente, considera la extensión intratesticular (T), la afectación ganglionar (N), la existencia de metástasis (M) y los valores de los marcadores tumorales séricos (S). De hecho, es la primera neoplasia cuyos

marcadores séricos se incluyen en el sistema TNM del *American Joint Committee on Cancer / International Union Against Cancer (AJCC/UICC)*.

**Tabla 3.-** Clasificación de los TCGTs según el sistema TNM de la AJCC/UICC.

<b>T – Tumor primario</b>	<b>T1.</b> Tumor limitado a testículo y epidídimo, sin invasión vascular ni linfática <b>T2.</b> Tumor limitado a testículo y epidídimo con invasión vascular o linfática <b>T3.</b> Invasión del cordón espermático <b>T4.</b> Invasión del escroto			
<b>N – Adenopatías regionales</b>	<b>N1.</b> Adenopatía única o múltiples < 2 cm <b>N2.</b> Adenopatía única o múltiples entre 2 y 5 cm <b>N3.</b> Adenopatía única o múltiples > 5 cm			
<b>M – Metástasis a distancia</b>	<b>M1a.</b> Adenopatías no regionales o metástasis pulmonares <b>M1b.</b> Metástasis viscerales extrapulmonares			
<b>S – Marcadores tumorales</b>	<b>LDH</b>	<b>βHCG (UI/l)</b>	<b>AFP (ng/ml)</b>	
<b>S1.</b>	< 1,5 xVN	< 5.000	< 1.000	
<b>S2.</b>	1,5 – 10 xVN	5.000 – 50.000	1.000 – 10.000	
<b>S3.</b>	> 10 xVN	> 50.000	> 10.000	
<b>Agrupación por estadios</b>				
<b>Estadio 0</b>	pTis	N0	M0	S0
<b>Estadio I</b>	pT1 - 4	N0	M0	Sx
Estadio I A	pT1	N0	M0	S0
Estadio I B	pT2 - 4	N0	M0	S0
Estadio I C	Cualquier T	N0	M0	S1 – 3
<b>Estadio II</b>	Cualquier T	N1 - 3	M0	Sx
Estadio II A	Cualquier T	N1	M0	S0 - 1
Estadio II B	Cualquier T	N2	M0	S0 - 1
Estadio II C	Cualquier T	N3	M0	S0 - 1
<b>Estadio III</b>	Cualquier T	Cualquier N	M1	Sx
Estadio III A	Cualquier T	Cualquier N	M1a	S0 - 1
Estadio III B	Cualquier T	N1 – 3	M0	S2
	Cualquier T	Cualquier N	M1a	S2
Estadio III C	Cualquier T	N1 – 3	M0	S3
	Cualquier T	Cualquier N	M1a	S3
	Cualquier T	Cualquier N	M1b	S0 - 3

Para estimar el riesgo en los tumores metastásicos y comparar series, hoy en día se acepta universalmente la clasificación del *International Germ Cell Cancer Collaborative Group* (IGCCCG) (**tabla 4**), basada en un análisis retrospectivo de 5.202 pacientes con tumores NSE y 660 pacientes con SE tratados con esquemas de cisplatino (CDDP) (IGCCCG, 1997). Este sistema ha supuesto un gran avance para estratificar a los pacientes, solucionando el problema de la existencia de múltiples clasificaciones pronósticas como la del *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center* (MSKCC) o la *European Organization for Research and Treatment of Cancer* (EORTC). Para los tumores NSE, son factores pronóstico independientes la localización primaria en mediastino, niveles elevados de los marcadores séricos descritos anteriormente y la presencia de metástasis viscerales extrapulmonares. Para los SE, el único factor pronóstico adverso es la existencia de metástasis viscerales no pulmonares. Hasta la fecha, sin embargo, no se ha identificado ningún marcador molecular asociado a pronóstico en esta enfermedad (Motzer et al., 2007), aunque se ha sugerido una asociación entre la presencia de invasión vascular (factor pronóstico de recidiva metastásica) y la expresión de *CCL2* en NSE (Gilbert et al., 2011b; Manuel et al., 2012).

**Tabla 4.-** Clasificación pronóstica del IGCCCG.

Pronóstico	Supervivencia a 5 años (%)	No Seminoma	Seminoma
Bueno	90	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Tumor testículo o primario retroperitoneal</li> <li>· No metástasis viscerales extrapulmonares</li> <li>· Marcadores bajos: AFP&lt;1.000 ng/ml y βHCG&lt;5.000 IU/l y LDH&lt;1,5 x nivel normal</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Cualquier localización primaria</li> <li>· No metástasis viscerales extrapulmonares</li> <li>· Cualquier nivel marcadores</li> </ul>
Intermedio	75	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Tumor testículo o primario retroperitoneal</li> <li>· No metástasis viscerales extrapulmonares</li> <li>· Marcadores intermedios: AFP 1.000 – 10.000 ng/ml y/o βHCG 5.000 – 50.000 IU/l y/o LDH 1,5 – 10 x nivel normal</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Cualquier localización primaria</li> <li>· Presencia metástasis viscerales extrapulmonares (hígado, SNC, hueso, intestino)</li> <li>· Cualquier nivel marcadores</li> </ul>
Malo	50	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Primario mediastínico con o sin testículo o primario retroperitoneal</li> <li>· Presencia metástasis viscerales extrapulmonares (hígado, SNC, hueso, intestino)</li> <li>· Marcadores elevados: AFP&gt;10.000 ng/ml y/o βHCG&gt;50.000 IU/l y/o LDH&gt;10 x nivel normal</li> </ul>	--

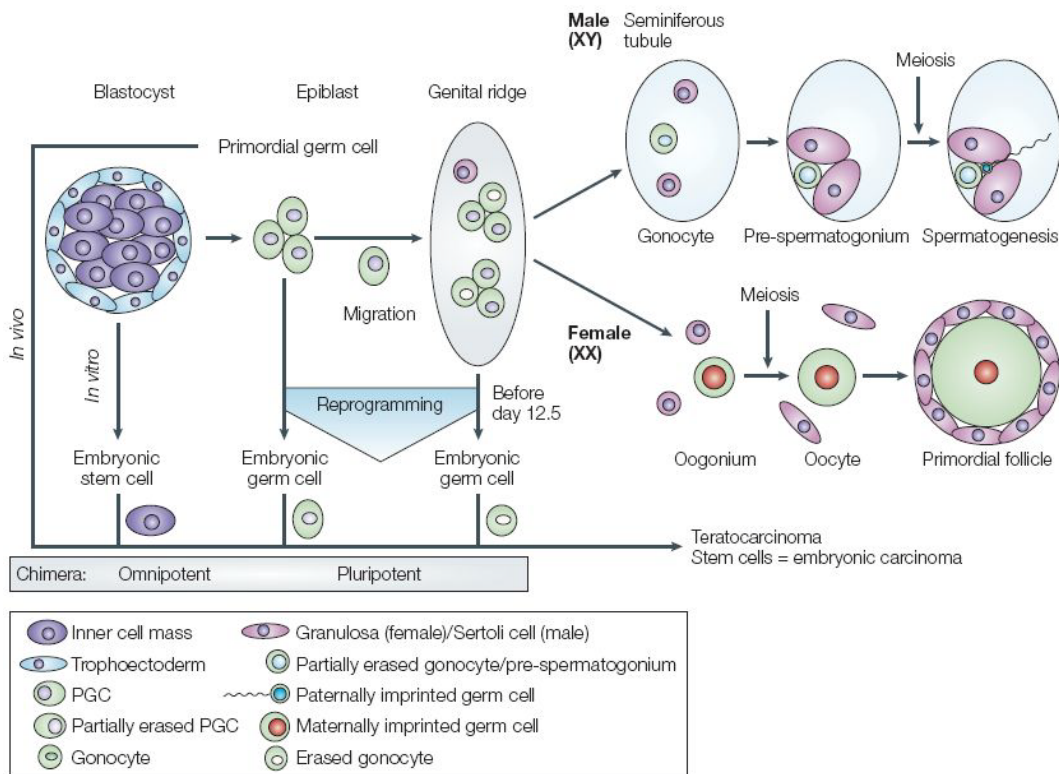
## 2.4. Bases moleculares de los TCGTs

### 2.4.1. Biología de las células germinales

Las células germinales juegan un papel fundamental en el proceso de transmisión del material genético e información epigenética de una generación a otra. Durante su ciclo vital sufren un proceso de división y diferenciación progresiva hasta la formación de los gametos. Estos últimos entran, tras la fertilización, en una intrincada cascada de procesos moleculares requeridos para la embriogénesis. Por eso, no es de extrañar que la transformación de estas células germinales resulte en tumores capaces de utilizar todos esos procesos que suceden durante la gametogénesis y embriogénesis.

Los TCGTs derivan de las células germinales primordiales (CGPs). Estas células se identifican ya en el proceso de gastrulación de los embriones humanos y migran hasta su lugar definitivo de desarrollo en las gónadas bajo el control de los genes *KIT* y *CXCR4* (**figura 5**), así como señales de la vía AKT-PI3K (Gilbert et al., 2011a; McLaren, 1992; Saitou et al., 2005). Así lo demuestran estudios como el llevado a cabo por Roskoski y cols., en el que comprobaron en ratones que la inactivación en homocigosis de *KIT* causaba infertilidad debido al fallo en el desarrollo de las células germinales progenitoras (Roskoski, 2005). Las CGPs se dividen de forma activa durante este proceso de migración hasta llegar a su destino, donde la población empieza a autorregularse mediante apoptosis (Houldsworth et al., 2006). Una vez en las gónadas, estas células pasan a denominarse gonocitos, los cuales se diferenciarán, en varones, a espermatogonias durante el segundo y tercer trimestre del embarazo mediante un descenso en la expresión de marcadores de pluripotencia, como *OCT3/4* y *NANOG*. La expresión de la región asociada con la determinación del sexo en el cromosoma Y (*Sry*) en las células germinales y señales JAK-STAT provenientes de las células somáticas de la gónada, observado en *Drosophila Melanogaster*, permiten la mitosis de las CGPs produciendo espermatogonias (Gilbert et al., 2011a). Después del nacimiento, estas espermatogonias sufren varias rondas de división y diferenciación en los túbulos seminíferos, pero siempre manteniendo una población de células con capacidad de autoregenerarse. Ya llegada la

pubertad, estas células entran en replicación premeiótica y, finalmente, meiosis, dando como resultado 4 gametos haploides que madurarán a espermátidas y, eventualmente, a espermatozoides (Houldsworth et al., 2006).



**Figura 5.-** Representación esquemática del desarrollo embrionario normal y origen de las células germinales (extraído de Oosterhuis y cols., *Nat Rev Cancer*, 2005).

#### 2.4.2. Neoplasia intratubular de células germinales (carcinoma *in situ*)

Los TCGTs tipo II se originan a partir de una lesión precursora conocida como neoplasia intratubular de células germinales (NITCG) o carcinoma *in situ* (Houldsworth et al., 2006; Skakkebaek, 1972). Las células de la NITCG ocupan el lugar donde deberían estar las espermatogonias dentro de los túbulos seminíferos. Esta lesión precursora se encuentra, en la práctica totalidad de los casos, adyacente a las lesiones invasivas de los NSE y en la mayoría de los SE (Jacobsen et al., 1981; Oosterhuis et al., 2003). La incidencia de estas lesiones en varones caucásicos es similar a la posibilidad de padecer un TCGT ya



que, aparentemente, no existen regresiones espontáneas de este tipo de lesión, por lo que, eventualmente, todos los pacientes con NITCG desarrollarán el tumor de testículo. La progresión entre la lesión precursora y el tumor maligno sucede en un plazo de 5 años en el 50% de los pacientes (Gilbert et al., 2011a).

La NITCG parece estar causada por un retraso o bloqueo en la maduración de los gonocitos, probablemente como resultado o consecuencia de un síndrome de disgenesia gonadal, motivo por el cual las células suelen ser tetraploides (Oosterhuis et al., 1989). Esta semejanza entre las células de la NITCG y las CGP/gonocitos es evidente en los estudios de expresión genética, actividad de la telomerasa e impronta genética (Gilbert et al., 2011a; Sonne et al., 2009). Se han realizado estudios de expresión mediante *arrays* comparando áreas de las NITCG adyacentes a tumores invasivos con tejido testicular normal. Los resultados del mismo objetivaron una expresión negativa de los genes asociados con espermatogénesis en la NITCG, a la vez que sobreexpresión de marcadores de CGP o fenotipo de célula madre como *POU5F1*, *NANOG*, *XBP1*, *XIST*, *LIN28*, *TFAP2C*, *PDPN*, *PRDM1*, *SOX17* y *KIT*. También se encontraron niveles altos de expresión de genes que codifican proteínas con conocido potencial oncogénico como *TCL1A*, *MYCN* y *PIM2* (Almstrup et al., 2004).

#### **2.4.3. Alteraciones genéticas asociadas a TCGTs**

La alteración más importante y recurrente en estos tumores encontrada hasta la fecha es la presencia del isocromosoma 12p. Esta alteración fue descrita hace 30 años por *Atkin-Baker y cols.* en metafases de células en cultivo procedentes de TCGTs (Atkin and Baker, 1983). Posteriormente, este descubrimiento fue confirmado mediante la técnica de hibridación fluorescente *in situ* (FISH), donde se pudo observar que alrededor del 90% de los TCGTs presentaban copias extra del brazo corto del cromosoma 12, en forma de i(12p) en el 85% de los casos o como duplicaciones en tándem en el resto de los pacientes (Rodríguez et al., 1993). Este descubrimiento no sólo ha permitido avanzar en el conocimiento de la etiología genética de la enfermedad, sino que también tiene aplicabilidad diagnóstica e importantes consecuencias a la hora de abordar el tratamiento

de estos pacientes, permitiendo identificar tumores indiferenciados en la línea media y confirmar que estos se originan en células germinales que probablemente no entraron en apoptosis durante la etapa embrionaria (Ladanyi et al., 1990; Motzer et al., 1995).

Existe todavía controversia sobre cuándo aparece el i(12p) en el proceso neoplásico. Algunos estudios afirman identificar la presencia de esta alteración ya en la NITCG, mientras que otros la asocian a la adquisición de la capacidad de invadir y salir de los túbulos seminíferos (Goddard et al., 2007; Rosenberg et al., 2000; Summersgill et al., 2001; Vos et al., 1990).

Por otro lado, ha sido demostrado que las células madre embrionarias adquieren, entre otras alteraciones cromosómicas, la presencia del i(12p) cuando son cultivadas *in vitro*, lo cual sugiere que esta adquisición y la expresión aberrante de los genes que se encuentran en esa región participaría de forma activa en la capacidad de crecimiento de las células pluripotenciales en ambientes no favorables (Draper et al., 2004). Esta alteración cromosómica mantendría el fenotipo de célula pluripotencial de forma aberrante en la célula germinal, a la vez que le daría capacidad de proliferación. El brazo corto del cromosoma 12 contiene, aproximadamente, 400 genes. El hecho de que se encuentre amplificado prácticamente en su totalidad sugiere que deben existir, al menos, dos *loci* distantes implicados en la enfermedad (Hussain et al., 2008).

Los trabajos realizados hasta la fecha para identificar genes del brazo corto del cromosoma 12 sobreexpresados en TCGTs han revelado algunos candidatos interesantes con funciones en crecimiento celular como los proto-oncogenes *CCND2* y *KRAS*, el transportador de glucosa *GLUT3* y enzimas glicolíticas como *GAPDH* y *TPI1*; o genes implicados en renovación celular y pluripotencia como son *NANOG*, *DPPA3* y *GDF3* (Ezeh et al., 2005; Houldsworth et al., 1997; Juric et al., 2005; Korkola et al., 2006). Estos tres últimos genes han sido identificados en un *cluster* de 200 Kb regulado como tal en células madre embrionarias (Clark et al., 2004; Giuliano et al., 2005; Korkola et al., 2006).

Posteriormente, los estudios mediante hibridación genómica comparada (CGH) han permitido caracterizar otras aberraciones, como la amplificación en 17q, presente en

aproximadamente el 70% de los casos (Kraggerud et al., 2002), y que también ha sido asociada a las alteraciones que adquieren las células embrionarias *in vitro*, como ya se ha comentado anteriormente en el caso del i(12p) (Draper et al., 2004). Un *cluster* de genes presente en esta región que codifican para citocinas inflamatorias, incluyendo *CCL2*, ha sido asociado con la presencia de invasión vascular en estos tumores, que a su vez es un factor pronóstico para recidiva metastásica (Mannuel et al., 2012).

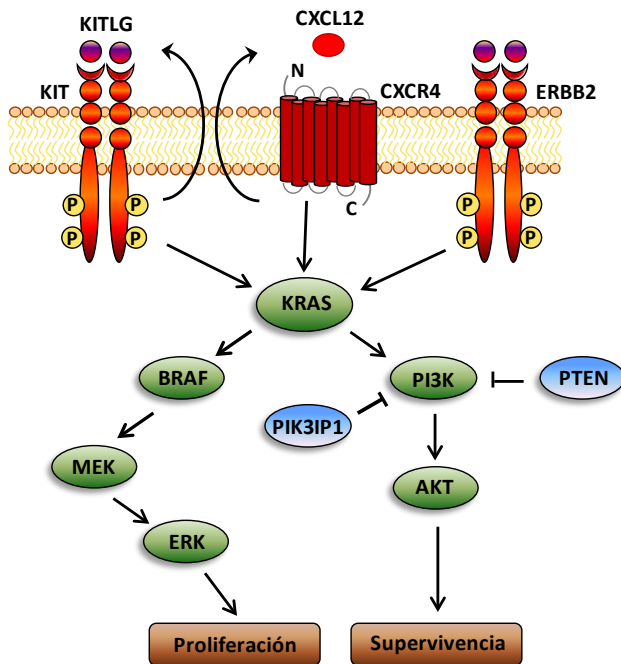
Además del i(12p) y 17q, han sido identificadas mediante análisis de cariotipado otras alteraciones genéticas relativamente comunes en TCGTs, como son las ganancias en la totalidad o partes de los cromosomas X, 21, 7, 8 y 14; y deleciones en los cromosomas 22, 4, 5, 13, 16 y Y (Skotheim et al., 2006).

Por otro lado, se ha realizado un estudio de secuenciación de los genes que codifican para 518 proteínas con función quinasa y los resultados muestran que la presencia de mutaciones en los TCGTs son raras, con excepción de *KIT* (Bignell et al., 2006). En el caso de este gen, amplificación, sobreexpresión y mutaciones activantes han sido reportadas en SE y, en menor medida, en NSE (McIntyre et al., 2008; McIntyre et al., 2004). Además, la desregulación del ligando de *KIT* (*KITLG*) también parece estar implicada, por su relación con *KIT*, con un retraso en la diferenciación de las CGP provocando, de manera subsecuente, el desarrollo de TCGTs (Gilbert et al., 2011a; Turnbull and Rahman, 2011).

Aunque poco frecuentes, mutaciones activantes, sobreexpresión y amplificación de *KRAS* también han sido encontradas en TCGTs (McIntyre et al., 2008). Por su parte, mutaciones activantes en *BRAF* han sido identificadas en una pequeña proporción de NSE (9%) (Sommerer et al., 2005).

Otro gen a destacar es el que codifica para la fosfatasa PTEN, cuya infraexpresión o pérdida ha sido implicada en la progresión de NITCG hacia enfermedad invasiva. La pérdida de esta proteína, cuya función es la inhibición de PI3K para regular la vía de AKT, provoca la activación constitutiva de esta vía (Di Vizio et al., 2005; McIntyre et al., 2008).

Además, también se ha descrito una pérdida de *PIK3IP1*, otro regulador negativo de la señalización a través de PI3K, en NSE (Gilbert et al., 2011a).



**Figura 6.-** Vías de señalización desreguladas en TCGTs. Los genes en verde muestran amplificación o sobreexpresión, mientras los genes en azul presentan pérdida genómica y/o niveles reducidos de proteína (adaptado de Gilbert y cols, *Nat Rev Cancer*, 2011; y Goddard y cols, *Int J Androl*, 2007).

Según los datos reportados en el catálogo de mutaciones somáticas en cáncer (COSMIC; <http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>) procedentes de varios estudios, otras mutaciones presentes en una pequeña proporción de los casos son, en el caso de los SE: *TP53* (10/128 muestras), *NRAS* (7/95), *HRAS* (5/66) y *FGFR3* (2/30); y en el caso de los NSE (histologías mixtas): *BRAF* (4/19), *TP53* (1/1), *STK11* (1/2).

Sin embargo, y a pesar del conocimiento sobre todas estas alteraciones genómicas descritas, aún se desconoce cuáles son las lesiones genéticas concretas que originan la enfermedad.

#### 2.4.4. Epigenética

Las modificaciones epigenéticas están íntimamente ligadas a la regulación en la expresión génica durante el desarrollo embrionario normal. Sin embargo, la

hipermetilación aberrante de los promotores de los genes produce silenciamiento génico de los mismos. Este fenómeno es importante en cáncer cuando el gen silenciado es, por ejemplo, un gen supresor de tumores, ya que esto pone en peligro el correcto funcionamiento de la célula. Sin embargo, este escenario no parece encajar en la tumorigénesis de los TCGTs, ya que la metilación *de novo* de genes supresores de tumores o genes relacionados con cáncer es rara en esta enfermedad (Okamoto, 2012). *Ohm y cols.* han demostrado que los genes que están frecuentemente hipermetilados en tumores humanos generalmente se mantienen desmetilados en carcinomas embrionarios (Ohm et al., 2007). También el grupo de *Costello y cols.* describió una baja frecuencia de metilación aberrante general en TCGTs (Costello et al., 2000). Aún así, se han descrito algunos genes con metilación diferencial entre SE y NSE como *RASSF1A* y *SCGB3A1*, lo que sugiere un papel de estos en la transformación de las células germinales (Okamoto, 2012). Además, se ha observado un menor nivel de metilación global de los SE comparado con los NSE (Koychev et al., 2011; Okamoto, 2012). Por otro lado, los elementos repetitivos del genoma (Alu y LINE1) están extensamente hipometilados en SE, mientras que en el caso de los NSE, LINE1 sigue el mismo patrón, pero los elementos Alu parecen estar metilados. La hipometilación de estas secuencias repetitivas es frecuente en cánceres humanos a diferencia del patrón fuertemente hipermetilado que se encuentra en los tejidos normales (Okamoto, 2012). También se ha descrito la relación potencial entre la hipometilación de LINE1 y un incremento en el riesgo de padecer TCGT hereditario, sobretodo en el caso de tumores de tipo SE, sugiriendo este evento como mecanismo alternativo de susceptibilidad a este tipo de cáncer (Mirabello et al., 2010).

Una regulación correcta de las células germinales embrionarias también depende de la expresión bien organizada tanto temporal como espacial de los llamados microRNAs (miRNAs). Estas moléculas pertenecen a los llamados RNAs no codificantes y funcionan como efectores endógenos de interferencia del RNA celular, regulando así la expresión de muchos genes. En el caso de los tumores testiculares, se han descrito unos niveles globales de expresión de la mayoría de los miRNAs inferiores al tejido normal en SE, mientras que los NSE muestran niveles crecientes de expresión relacionados con los

subtipos más diferenciados, encontrándose muchos de ellos sobreexpresados en teratoma (Gillis et al., 2007). Además, se ha postulado el potencial oncogénico de miRNA-372 y miRNA-373-3p en tumores testiculares, cuya desregulación permitiría a las células un crecimiento tumorigénico en presencia de p53 funcional (Voorhoeve et al., 2006). Más recientemente, un estudio en el que se analizó el perfil de expresión de miRNA en TCGs malignos descubrió la sobreexpresión de los *clusters* miRNA-371-3 y miRNA-302 en estas neoplasias (Palmer et al., 2010). Recientemente, se ha propuesto incluso el uso de miRNA-371-3 como marcador sérico para esta enfermedad (Dieckmann et al., 2012).

Por lo descrito en este apartado, es evidente que diferentes mecanismos epigenéticos juegan un papel importante en el desarrollo de esta enfermedad. Sin embargo, queda mucho por estudiar en este campo, para llegar a una comprensión más completa de la biología de los TCGTs.

### **3. TRATAMIENTO**

La orquiectomía inguinal es la primera opción terapéutica en todos los TCGTs. Como excepción, en pacientes con tumores metastásicos muy avanzados puede posponerse esta intervención con el fin de comenzar la QT de forma inmediata ante el riesgo vital. El tratamiento postorquiectomía depende del estadio y la histología. Debe ofrecerse a los pacientes la posibilidad de criopreservación de espermatozoides antes de cualquier tratamiento. Sin embargo, algunos pacientes recuperan la fertilidad de manera espontánea, incluso tras la QT o RT. Este hecho es más frecuente en pacientes con buenos recuentos basales de espermatozoides, edad inferior a 30 años y que no han recibido más de 4 ciclos de QT (Krege et al., 2008a).

### 3.1. Tratamiento del estadio I

Un TCGT en estadio I se define como un tumor confinado en el testículo sin evidencia clínica de enfermedad metastásica. Los marcadores séricos deben haberse normalizado tras la orquiectomía. Actualmente, cerca del 76% de los seminomas y el 32% de los no-seminomas se presentan en estadio clínico I. En esta situación, la probabilidad de supervivencia a 5 años es próxima al 100%. Existen varias opciones terapéuticas disponibles y su eficacia final es similar si se llevan a cabo por equipos multidisciplinarios especializados. Por ello, el objetivo de los estudios actuales es mantener estos resultados minimizando los efectos adversos del tratamiento, especialmente la morbilidad aguda y tardía, preservando la fertilidad y la calidad de vida de los enfermos (Aparicio and Germa, 2006; Nitzsche et al., 2010). Esto puede conseguirse con el uso de terapias menos tóxicas o limitando su empleo a aquellos enfermos con mayor riesgo de recidiva.

La aproximación tradicional tras la orquiectomía, anterior a la introducción del CDDP, consistía en la RT adyuvante en los pacientes con SE y la linfadenectomía retroperitoneal (LARP) para aquellos con tumores NSE (ya que estos no responden a la radioterapia). Sin embargo, ambas modalidades implican tratar a todos los pacientes y no están exentas de morbilidad. Por eso, se han desarrollado procedimientos alternativos que ofrecen resultados equivalentes con menor toxicidad, entre ellos el seguimiento clínico, la QT adyuvante o los protocolos de tratamiento adaptado al riesgo individual de recidiva (de Wit and Fizazi, 2006).

Actualmente, los SE en estadio I se tratan con RT adyuvante, aunque también está aceptado el uso de carboplatino (CBDCA) en monoterapia, pues los porcentajes de curación son equivalentes. En el caso de los NSE, dos ciclos de CDDP, etopósido y bleomicina (BEP) son considerados como terapia estándar sistémica en este estadio clínico. Más recientemente se ha postulado la posibilidad de conseguir un efecto suficiente con un solo ciclo de QT (Schrader et al., 2009).

	Seminoma	No seminoma
<b>Aproximación tradicional</b>	Orquiectomía	
	Radioterapia	LARP
<b>Aproximación actual</b>	Orquiectomía	
	Radioterapia/ Carboplatino	2 ciclos BEP

**Tabla 5.-** Esquema de tratamiento del estadio I. BEP: Bleomicina, Etopósido y Cisplatino. LARP: linfadenectomía retroperitoneal.

### 3.2. Tratamiento de la enfermedad avanzada

Desde finales de los años 70, aproximadamente un 80% de pacientes con TCGTs metastásicos alcanzan una respuesta completa duradera mediante QT basada en CDDP, siendo este uno de los hitos fundamentales en la Oncología moderna. Para obtener estos resultados, se requiere emplear la QT a dosis plenas, monitorizar periódicamente los marcadores tumorales séricos y emplear cirugía de rescate en las lesiones residuales (Krege et al., 2008b).

En efecto, se admite que la QT en estos casos debe administrarse sin retraso y que no está justificado reducir la dosis, por lo que deben emplearse todas las medidas de soporte necesarias. QT inductiva con 3 – 4 ciclos de BEP es todavía el régimen estándar para pacientes con SE o NSE y enfermedad diseminada. Los marcadores tumorales deben determinarse semanalmente hasta su negativización, ya que los cambios en sus niveles tienen una estrecha correlación con la evolución de la enfermedad, por lo que tienen gran utilidad en el seguimiento y monitorización de la respuesta al tratamiento. Por último, tras la negativización de los niveles de marcadores séricos debe valorarse siempre la necesidad de resección de las lesiones residuales en función del tamaño e histología inicial (Krege et al., 2008b).

Siguiendo la clasificación de la IGCCCG, la supervivencia proyectada a 5 años para los pacientes con enfermedad diseminada con buen pronóstico, intermedio y malo es de 90%, 75% y 50% respectivamente. Ello justifica la adopción de aproximaciones terapéuticas individualizadas.



En el caso de pacientes con buen pronóstico, se considera que es adecuado el uso de 3 ciclos de BEP. Sin embargo, para aquellos enfermos con factores de riesgo pulmonar se deben administrar 4 ciclos de PE o 3 ciclos de PEI (I, ifosfamida) (Calabro et al., 2012; Schrader et al., 2009).

Para aquellos pacientes clasificados como “pronóstico intermedio”, la combinación BEP en 4 ciclos es el tratamiento de elección (Schrader et al., 2009).

Los pacientes clasificados como “mal pronóstico” también reciben 4 ciclos de BEP, pero debido al bajo porcentaje de supervivencia a largo plazo en este grupo, se han evaluado 3 alternativas:

- Incrementar la dosis de una de las sustancias: se ha estudiado el efecto de doblar la dosis de CDDP en el régimen tradicional (BEP). Desafortunadamente, no se ha descrito ninguna mejora pero sí una toxicidad marcadamente aumentada (Nichols et al., 1991).
- Integrar nuevos fármacos: ni los regímenes de primera línea incluyendo ifosfamida, ni los regímenes alternados secuencialmente de bleomicina/ vincristina/ cisplatino/ etopósido/ ifosfamida/ cisplatino/ bleomicina difirieron de manera significativa del procedimiento estándar en cuanto a remisión completa o porcentajes de supervivencia (Kaye et al., 1998; Nichols et al., 1998).
- Terapia de dosis intensificada con soporte de células madre hematopoyéticas autólogas: los resultados para esta aproximación fueron, en un principio, prometedores pues un estudio no randomizado de supervivencia a largo plazo mostró una ventaja de hasta 20% respecto el tratamiento convencional (Bokemeyer et al., 1998). Sin embargo, ningún estudio prospectivo randomizado ha demostrado todavía que esta opción tenga beneficios respecto al régimen convencional (Calabro et al., 2012; Schrader et al., 2009).

**Tabla 6.-** Esquema de tratamiento según el grupo pronóstico en TCGTs diseminados.

Clasificación IGCCCG	Aproximación actual	Alternativas terapéuticas
<b>Buen pronóstico</b>	3 ciclos BEP	4 ciclos PE o 3 ciclos PEI si existe riesgo pulmonar
<b>Pronóstico intermedio</b>	4 ciclos BEP	4 ciclos BEP + Paclitaxel
<b>Mal pronóstico</b>	4 ciclos BEP	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Aumentar dosis de una substancia</li> <li>· Integrar nuevos fármacos</li> <li>· Dosis intensificada + células madre hematopoyéticas</li> </ul>

### 3.3. Tratamiento de rescate

Las recidivas que se producen en los TCGTs en estadio I inicial tras el seguimiento, RT o LARP suelen rescatarse con éxito consiguiendo más de un 90% de curaciones con QT. Además, los pacientes con enfermedad refractaria o que recidivan tras la QT de primera línea para enfermedad avanzada, presentan aún opciones de curación con terapia convencional a dosis altas. Esta segunda oportunidad es otra característica importante en los tumores germinales.

Mientras que sólo un 10-20% de los pacientes de buen pronóstico precisan tratamiento de rescate, la incidencia de recidivas o progresiones al tratamiento de primera línea en los casos de mal pronóstico puede superar el 50% de los casos. Aquellos que tuvieron una respuesta completa al tratamiento inicial y cuyo tumor primario es testicular, presentan una mejor evolución y pueden rescatarse con esquemas de QT convencional. Por el contrario, los que no alcanzaron una respuesta completa o cuyo tumor primario es mediastínico, tienen una probabilidad de supervivencia a largo plazo inferior al 10% con esquemas de segunda línea (Kollmannsberger et al., 2006; Kondagunta and Motzer, 2006).

### 3.4. Toxicidad del tratamiento

El CDDP puede producir importantes efectos adversos a corto y largo plazo. Entre los primeros, que son aquellos que se presentan durante o justo después del tratamiento

y persisten menos de un año, destacan la emesis, alopecia, astenia, neutropenia, toxicidad renal y neurotoxicidad, siendo este último el factor limitante de la dosis tolerada por el paciente (Calabro et al., 2012; Rabik and Dolan, 2007). También puede producir daño en los nervios sensoriales periféricos y auditivos. Aunque estos síntomas suelen desaparecer en la mayoría de pacientes entre los 6 y 12 meses, hay evidencias de que existe un daño permanente en una proporción significativa de enfermos (Efstathiou and Logothetis, 2006).

Una complicación particular de la QT es la toxicidad pulmonar de la bleomicina. En la mayoría de los estudios, la incidencia de cambios radiológicos o disnea es de un 6-8%, mientras que la neumonitis grave es del 0,5-1%. Los factores de riesgo son la edad superior a 40 años, tabaquismo y presencia de metástasis al diagnóstico, entre otras (Calabro et al., 2012; Carver et al., 2007).

La QT también puede producir azoospermia, aunque un 70-80% de los pacientes recuperan la fertilidad unos meses después de la finalización del tratamiento. El riesgo de infertilidad se relaciona con la dosis acumulada de CDDP y con el uso de alquilantes (Efstathiou and Logothetis, 2006).

Uno de los efectos secundarios a largo plazo es el aumento de eventos cardiovasculares, que dobla la incidencia respecto a controles sanos, y que se observa a largo plazo. Además, cerca del 16% de pacientes con TCGTs que recibieron QT basada en CDDP presentan obesidad e hipertensión (Efstathiou and Logothetis, 2006; Nuver et al., 2002).

Por otro lado, aunque las segundas neoplasias son relativamente raras, el riesgo de cáncer gastrointestinal, particularmente gástrico, y de sarcomas está aumentando en pacientes que han recibido radioterapia. Por último, el etopósido se ha relacionado con una incidencia aumentada de leucemia aguda no linfoblástica. Este riesgo es de 0,1-0,5% con dosis acumuladas de 2.000 mg/m<sup>2</sup> del fármaco y se incrementa aún más con dosis superiores. La asociación de factores hematopoyéticos parece aumentar el riesgo (Efstathiou and Logothetis, 2006; Travis et al., 1997; Travis et al., 2005).

### 3.5. Nuevas combinaciones y dianas terapéuticas

Hasta el presente, se han evaluado una gran variedad de agentes diferentes en pacientes de TCGTs con enfermedad refractaria a QT, en base a resultados prometedores obtenidos con líneas celulares y modelos preclínicos de animales xenoinjertados subcutáneamente con líneas celulares ya establecidas. El etopósido oral ha sido, hasta hace relativamente poco, la única opción terapéutica con moderada actividad en la enfermedad refractaria (Miller and Einhorn, 1990), antes de la ola de nuevos agentes que han aparecido durante la última década del siglo XX y primera del siglo XXI. Cabe destacar que la mayoría de ensayos clínicos en monoterapia han sido llevados a cabo en pacientes altamente politratados, por lo que pequeños índices de actividad deberían tenerse en cuenta para no descartar drogas que podrían ser efectivas en estadios más precoces de la enfermedad, como sería el caso de la gemcitabina, el oxaliplatino, irinotecán y temozolamida (Kollmannsberger et al., 2006). Además, la combinación de algunos de estos medicamentos ha demostrado ser aún más efectiva en el tratamiento de pacientes refractarios, como sería el caso del régimen combinado con oxaliplatino más gemcitabina. Los estudios *in vitro* de esta combinación sugerían un efecto supraaditivo de las dos drogas (Faire et al., 1999), lo que llevó a la realización de dos ensayos de fase II con pacientes refractarios y altamente politratados (Kollmannsberger et al., 2004; Pectasides et al., 2004). Los resultados de los ensayos muestran respuesta en 46 y 32% de los pacientes respectivamente, además de 3 remisiones completas en el primer estudio y 4 en el segundo. Posteriormente el grupo de De Giorgio y cols. realizó otro ensayo de fase II en el que de los 18 pacientes tratados con la combinación, dos consiguieron remisión completa y uno parcial (De Giorgio et al., 2006).

Por otra parte, el mayor conocimiento adquirido en la última década sobre la biología del cáncer en general, ha permitido identificar vías de señalización y procesos celulares de gran importancia en el desarrollo y progresión de la enfermedad. Esto ha significado la aparición reciente de gran cantidad de nuevos compuestos que tienen como diana moléculas implicadas en procesos imprescindibles para la célula tumoral, como la proliferación y la angiogénesis. Algunas de estas moléculas son ya tratamientos

aprobados y forman parte de la QT de primera línea o están siendo testadas actualmente en ensayos clínicos, como es el caso de la combinación de lapatinib más capecitabina en tumores HER2-positivos en cáncer de mama, el uso de inhibidores de las poli (ADP ribosa) polimerasas (PARPi) en tumores de ovario o mama con mutaciones inactivantes en *BRCA1* y *2*, el uso de sorafenib en tumores renales, bevacizumab en cáncer colorrectal metastásico, etc. (Dean et al., 2012; Escudier et al., 2007; Geyer et al., 2006; Hurwitz et al., 2004; Kaye et al., 2012; Vidal et al., 2012). Sin embargo, en el caso del cáncer testicular, la falta de conocimiento de los mecanismos moleculares que desencadenan la enfermedad dificulta la aplicación racional de algunos de estos fármacos con dianas terapéuticas muy concretas. A esto se suma la falta de modelos preclínicos que mimeticen de manera correcta las principales características de la enfermedad, lo cual hace difícil testar nuevos compuestos o combinaciones y evaluar su efectividad. Es por eso que nuestro grupo se ha dedicado a la realización y optimización de un modelo preclínico representativo de NSE basado en tumores de pacientes xenoinplantados de manera ortotópica en los testículos de ratones atómicos.

Algunos de estos fármacos aprobados para el tratamiento de otros tumores están siendo o han sido testados en TCGTs, como es el caso del Imatinib, una pequeña molécula que inhibe, entre otras quinasas, c-KIT y que podría ser efectiva puesto que se han descrito amplificaciones o sobreexpresión de este gen en TCGTs. Sin embargo, de los dos ensayos clínicos realizados, ninguno pudo demostrar la presencia de regresión tumoral (Einhorn et al., 2006). Por otra parte, *Moroni y cols.* llevaron a cabo un estudio que parecía indicar el potencial de los inhibidores de EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), por lo que se inició un ensayo de fase II con erlotinib, una pequeña molécula inhibidora de EGFR, en pacientes con TCGTs. También se ha propuesto el uso de nutlina, un antagonista selectivo de MDM2, que inhibe la interacción entre p53 y MDM2, para reactivar p53 secuestrado en esta unión (Koster et al., 2011). Otro ejemplo es el trabajo realizado por el equipo liderado por el Dr. Francesc Viñals en colaboración con nuestro grupo, en el que se demostró que la angiogénesis tiene un papel importante en el crecimiento del tumor y puede ser una diana terapéutica a valorar en estudios con

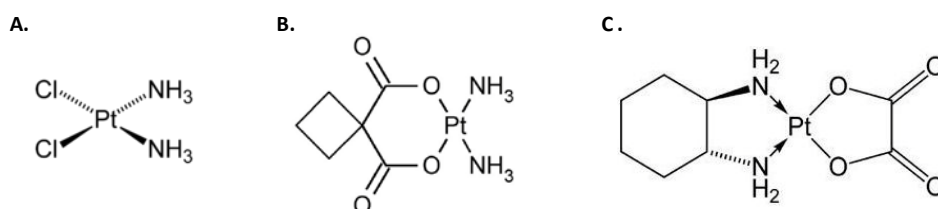
pacientes (Castillo-Avila et al., 2009). También se ha probado la eficacia de combinar el oxaliplatino con bevazizumab, obteniendo unos resultados de actividad clínica moderada y un caso de remisión completa (Jain et al., 2013). Aún así, todavía existen pacientes que no responden a ninguno de los tratamientos que se han probado, por lo que es necesario seguir estudiando nuevos fármacos o combinaciones efectivas en estos casos. Con esta finalidad, en el presente estudio se evalúa la actividad de los PARPi en monoterapia o en combinación con CDDP en TCGTs resistentes a la QT convencional.

## 4. CISPLATINO

La historia del CDDP comenzó de forma accidental, hace ya más de 40 años, en el laboratorio del físico Barnett Rosenberg, en la universidad estatal de Míchigan. Rosenberg estaba interesado en aplicar radiación electromagnética a bacterias y células eucariotas para investigar el efecto del campo eléctrico y magnético bipolar en la división celular. Cuando aplicaba corriente en sus experimentos con *Escherichia Coli* observó que inhibía la división de estas, y que este efecto no era debido al campo eléctrico sino al uso de electrodos hechos con platino, material considerado inerte hasta ese momento. El análisis químico del medio identificó dos complejos activos como causantes del efecto biológico que observaba: el *cis*-diamino-tetracloro-platino (IV) y el *cis*-isómero [PtII(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]. Este segundo complejo es el que acabó modificándose para dar CDDP. La forma isomérica *trans* resultó ser mucho menos efectiva. Estos hallazgos fueron publicados en 1965 (Rosenberg et al., 1965). Después de los resultados obtenidos en bacterias, el Dr. Rosenberg anticipó que este efecto debería reflejarse también en la proliferación de células con gran potencial de división, como las tumorales. Durante 1968 el CDDP fue administrado por vía intraperitoneal en ratones portadores de células de Sarcoma-180 a dosis de 8 mg/kg demostrando su actividad antitumoral tras causar una importante regresión de los tumores en este modelo (Rosenberg et al., 1969). En 1971 se

trató por primera vez un paciente con CDDP dentro de un ensayo clínico, y su aprobación por la *US Food and Drug Administration* (FDA) llegó en 1978 (Kelland, 2007).

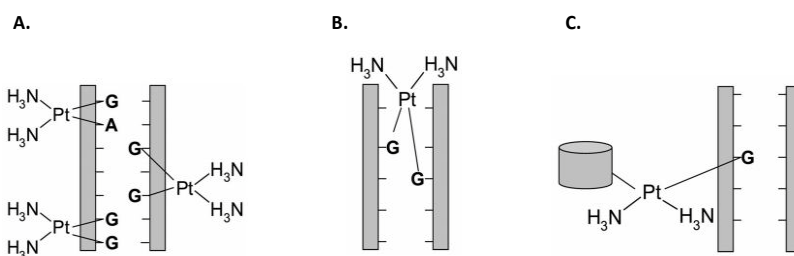
Desde entonces, el CDDP se ha convertido en uno de los agentes quimioterapéuticos más prescritos y más importantes en el tratamiento de tumores sólidos. Además, a principios de los años 80 se desarrollaron compuestos de platino de segunda generación con el objetivo de disminuir los efectos secundarios del CDDP, como la toxicidad renal y neurológica, dando lugar, por ejemplo, al CBDCA (aunque su potencia es menor respecto al CDDP y la mayoría de tumores resistentes a CDDP también lo son a CBDCA), y por otro lado de aumentar su biodistribución, como el satraplatino (Harrap, 1985; Kelland, 2007). Una segunda vía de investigación se abrió con el objetivo de intentar entender los mecanismos que desembocan en la adquisición de resistencia al fármaco. Este fenómeno puede ocurrir durante el curso del tratamiento, como suele suceder en los tumores de ovario o TCGs, o presentarse de forma intrínseca desde el inicio del tratamiento, como sucede en el cáncer colorrectal, de próstata, pulmón o mama (Kelland, 2007). La búsqueda de nuevos derivados del CDDP llevó a la introducción en 2002 del oxaliplatino en la clínica, cuya molécula presenta ciertas variaciones respecto a las del CDDP y CBDCA. Sin embargo, los datos clínicos sugieren que existe un cierto grado de resistencia cruzada (Stordal et al., 2007). Es por eso que en la actualidad se suele apostar por tratamientos de poliquimioterapia, donde el CDDP se combina con otros fármacos como la bleomicina y el etopósido. A pesar de esto, hasta un 20% de los pacientes diagnosticados con enfermedad diseminada en TCGTs no conseguirán remisiones duraderas debido a una respuesta incompleta al tratamiento y fallecerán a causa de la enfermedad (Bosl and Motzer, 1997; Kollmannsberger et al., 2006; Krege et al., 2008b).



**Figura 7.-** Estructura química del cisplatino (A), carboplatino (B) y oxaliplatino (C).

### 4.1. Mecanismo de acción

Una vez la droga ha sido internalizada mediante difusión pasiva o transportadores de membrana como los transportadores de cobre 1 y 2 (CTR1 y 2) y los transportadores de cationes orgánicos (SLC22), esta es activada en el citoplasma gracias a la hidratación de uno o dos de sus grupos cloro, lo que convierte el compuesto anteriormente inerte en un potente electrófilo que reacciona con nucleófilos, incluyendo ácidos nucleicos, glutatión reducido, metalotioneínas y grupos sulfhidril de proteínas (Basu and Krishnamurthy, 2010). Debido a esto, el CDDP tiene la capacidad de deplecionar equivalentes reducidos y decantar el balance rédox hacia el estrés oxidativo, lo cual facilita el daño en el DNA (Galluzzi et al., 2012). Sin embargo, se cree que el DNA es la diana biológica más importante del fármaco y es a través de la unión con este que ejerce su principal efecto antitumoral. El CDDP se une de manera covalente al DNA mediante los átomos de platino, para formar puentes cruzados intra y entre cadenas, o entre una hebra del DNA y una proteína (Galluzzi et al., 2012). Estos aductos en el DNA interfieren con su replicación y transcripción. Por eso, la formación de estos activa de manera inmediata varias rutas de señalización celular para reconocer y reparar el daño causado en el material genético de la célula. De manera paralela, el ciclo celular es detenido, hasta que la lesión ha sido reparada o, si la célula no es capaz de hacerlo, se inician programas de muerte celular por apoptosis para eliminar esa célula genéticamente inestable. En estos procesos, se cree que tiene un rol principal la proteína supresora de tumores p53 que, tras el reconocimiento del daño, actúa deteniendo el ciclo celular vía transactivación de p21 proporcionando tiempo a la célula para reparar el DNA y, si esto no es posible, induce apoptosis mediada por proteínas como las de la familia *B-cell CLL/lymphoma 2* (Bcl-2) (Basu and Krishnamurthy, 2010; Kelland, 2007; Siddik, 2003).



**Figura 8.-** Aductos producidos por el CDDP en el DNA. Las lesiones pueden ser A) *intrastrand crosslinks*, B) *interstrand crosslinks*, y C) uniones entre el DNA y proteínas (extraído de Rabik and Dolan, *Cancer Treat Rev*, 2007).



## 4.2. Mecanismos de resistencia

A pesar de los prometedores resultados obtenidos inicialmente con el CDDP, pronto la atención de los investigadores se centró en intentar dilucidar los mecanismos por los que la enfermedad adquiría resistencia o la presentaba desde un principio. Los primeros estudios *in vitro* demostraron que la resistencia podía ser mediada por dos mecanismos: (I) la incapacidad de conseguir niveles intracelulares suficientes del fármaco para ejercer su acción sobre el DNA; (II) imposibilidad de conseguir la muerte de la célula una vez el medicamento se une al DNA. Esta resistencia ha mostrado tener patrones de los más variados y mixtos en diferentes tipos de células tumorales, que combinan alteraciones en diferentes partes del proceso: captación de la droga, reconocimiento de daño, reparación del DNA y apoptosis (Basu and Krishnamurthy, 2010).

### 4.2.1. Mecanismos de resistencia antes de la unión al DNA

- Acumulación de CDDP dentro de la célula:

Una observación común y repetidamente reportada a lo largo de los años es que en muchas células tumorales con resistencia adquirida a CDDP existe una reducción en la acumulación de fármaco en comparación con la célula de origen (Kelland et al., 1992b). Hasta hace relativamente pocos años, el complejo mecanismo por el cual el CDDP era internalizado en las células estaba muy poco definido. Esta droga es una molécula muy polar y entra en las células de manera pasiva muy lentamente en comparación con otros agentes para tratar el cáncer (Galluzzi et al., 2012). La captación celular pasiva del CDDP se encuentra influida por factores como la concentración de sodio y potasio, el pH o la presencia de agentes reductores. En 1981 se propuso, por primera vez, que el CDDP utilizaría transportadores de membrana para penetrar en el interior de la célula. Este mecanismo de transporte activo podría ser más importante que la difusión pasiva, a la vez que jugaría un papel en los mecanismos de resistencia (Basu and Krishnamurthy, 2010). Así, se descubrió que el transportador responsable de la homeostasis del cobre CTR1 tiene un rol sustancial en la entrada de CDDP al espacio intracelular (Galluzzi et al., 2012; Koberle et al., 2010b). En experimentos utilizando fibroblastos embrionarios de

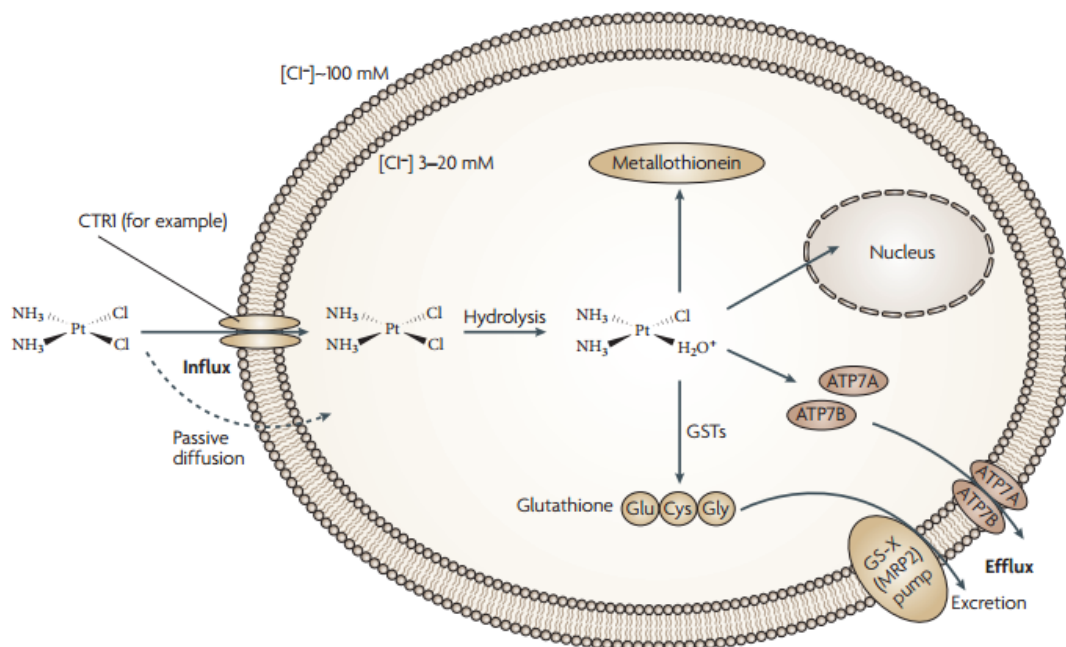
ratón *Ctr1*<sup>-/-</sup>, estos fueron expuestos a concentraciones de 2  $\mu$ M de CDDP. Estas células acumularon alrededor de un 35% de la cantidad del fármaco que acumularon las mismas células *wild type* (wt), además, la pérdida de *CTR1* llevaba a un aumento de la resistencia de 2 a 3 veces (Holzer et al., 2006). También se ha observado que tanto el cobre como el CDDP a concentraciones clínicamente relevantes producen una rápida regulación negativa de la cantidad de CTR1. Esto ocurre vía internalización del transportador por macropinocitosis seguida de degradación en el proteosoma (Holzer and Howell, 2006). Este hecho podría explicar, al menos de manera parcial, la adquisición de resistencia después de los primeros ciclos de tratamiento. Sin embargo, existe controversia sobre el papel de este transportador en la falta de respuesta al fármaco. *Beretta y cols.* concluyeron, de sus experimentos con la línea celular cancerosa A431 y su derivada resistente a CDDP, que la sobreexpresión de *CTR1* no causaba un incremento en la acumulación del fármaco en el interior de las células sugiriendo, por lo tanto, que esta proteína no jugaría un papel importante en este fenómeno (Beretta et al., 2004).

Por otro lado, algunos estudios sugieren que ABC ATPasas, como las proteínas de resistencia multi-droga (MRP)1, MRP2, MRP3 y MRP5, también podrían estar involucradas en la resistencia al fármaco incrementando el eflujo de este hacia el exterior de la célula. En particular, los resultados de un estudio donde se usó RNAi (del inglés *ribonucleic acid interference*) apuntaron a MRP2 como la principal ATPasa responsable de este fenómeno (Galluzzi et al., 2012). Además, en los últimos años, también han tomado protagonismo a este nivel bombas involucradas en la eliminación del cobre: las ATPasas ATP7A y B. Células de carcinoma de ovario transfectadas con *ATP7A* mostraron un pequeño incremento en la expresión de esta bomba, pero esto fue suficiente para causar resistencia a CDDP (Samimi et al., 2004).

- Interacción del CDDP con tioles citoplasmáticos:

Como se ha comentado anteriormente, las moléculas de fármaco acuosas tienen una gran afinidad hacia proteínas y complejos con azufre, incluyendo el glutatión, las metalotioneínas y otras proteínas ricas en cisteína. Este hecho, por un lado, puede favorecer la acción del fármaco, ya que decanta el balance intracelular hacia el estrés

oxidativo (Galluzzi et al., 2012). Pero, por otro lado, estas especies nucleofílicas actúan como *scavengers* citoplasmáticos, limitando así la cantidad de droga activa para ejercer su efecto uniéndose al DNA. En un estudio preliminar *in vitro* con 8 líneas celulares de ovario se observó una correlación significativa entre sensibilidad a CDDP y niveles celulares de glutatión (Mistry et al., 1991). Otros estudios demuestran que un incremento en las enzimas que catalizan el proceso de unión, como la glutatión-S-transferasa (GST) también puede comportar aumento de resistencia (Galluzzi et al., 2012). Sin embargo, estos resultados han causado controversia, puesto que algunos estudios no objetivan relación entre incremento de estas moléculas y resistencia (Basu and Krishnamurthy, 2010).



**Figura 9.-** Mecanismos de resistencia a CDDP anteriores a la unión al DNA y que evitan concentraciones intracelulares adecuadas de fármaco (extraído de *Kelland y cols., Nat Rev Cancer, 2007*).

#### 4.2.2. Mecanismos de resistencia tras la unión al DNA

- Reparación de lesiones en el DNA:

Una vez el CDDP se ha unido al DNA, la supervivencia celular y, por lo tanto, la resistencia, puede producirse mediante mecanismos de reparación del material genético

que eliminan los aductos formados por el fármaco o por mecanismos de tolerancia a las lesiones producidas. Se ha demostrado en varias líneas celulares de ovario que las células resistentes a platino presentan una capacidad superior de reparación del DNA si se comparan con células sensibles (Johnson et al., 1994). De las 4 vías principales de reparación del DNA que son el *nucleotide-excision repair* (NER), *base-excision repair* (BER), *mismatch repair* (MMR) y *double-strand break repair* (DSBR), parece ser que NER es la que juega el papel principal en la eliminación de las lesiones producidas por el CDDP (**figura 10**) (Rabik and Dolan, 2007). Esta vía de reparación se encarga de eliminar los enlaces formados por el platino entre dos guaninas o una guanina y una adenina de la misma hebra del DNA (*intrastrand crosslinks*), lo cual representa alrededor del 90% de las lesiones producidas por el CDDP. Sin embargo, alrededor de un 5% de las lesiones son enlaces entre las dos hebras del DNA (*interstrand crosslinks* o ICLs) y estas son reparadas mediante un mecanismo diferente: la vía de reparación de ICLs (Usanova et al., 2010).

Las proteínas más estudiadas de la vía NER son la *excision repair cross-complementing 1* (ERCC1) y la *xeroderma pigmentosum complementation group F* (XPF). Estas proteínas forman un heterodímero y actúan cortando en el extremo 5' de la zona de la hebra donde el platino se ha unido al DNA para permitir, posteriormente, la eliminación del aducto y la síntesis de un nuevo trozo de cadena correcta. La sobreexpresión de estas proteínas parece estar relacionada con resistencia. Incluso algunos autores sugieren su utilización como marcador de quimioresistencia, entre otros, en cáncer gástrico (Hirakawa et al., 2013). Por el contrario, en algunos casos se han asociado ciertos polimorfismos del gen de *ERCC1* con reducción en su expresión y, consecuentemente, mayor respuesta a esquemas de QT que incluyan platino (Reed, 2005).

Además, el incremento de la tolerancia al daño inducido por el platino puede darse por una pérdida de función de la vía del MMR. La lesión en el DNA es reconocida por las *MutS homologue protein* (MSH)2, MSH3 y MSH6 y MLH1 (Zdraveski et al., 2002). Normalmente, las proteínas del MMR detectan el daño y transmiten señales proapoptóticas. Es por este motivo que la pérdida de función de la vía MMR produciría un

descenso de la muerte celular, lo cual puede desembocar en resistencia a la droga (Galluzzi et al., 2012). Por ejemplo, en el caso de la línea de cáncer de ovario A2780, procedente de un paciente no tratado, existe un derivado resistente a CDDP que presenta una pérdida de la actividad MMR debido a la falta de expresión de MLH1. La restauración de la expresión de esta proteína consigue restaurar la sensibilidad a CDDP hasta el nivel de la línea parental sensible al fármaco (Durant et al., 1999).

Otro mecanismo de tolerancia al daño está relacionado con el *by-pass* replicativo de la lesión inducida por CDDP que ciertas clases de polimerasas, como la  $\beta$ , la  $\eta$  y la  $\zeta$ , son capaces de realizar. Esto hace que la síntesis del DNA no sea bloqueada y, en consecuencia, no se activen vías apoptóticas (Albertella et al., 2005; Bassett et al., 2002; Galluzzi et al., 2012). Así, varios estudios han demostrado que la sobreexpresión de la DNA polimerasa  $\beta$  produce resistencia, mientras que la inhibición de su expresión mediante el uso de siRNAs (*small interfering RNAs*) recupera la sensibilidad al fármaco (Bergoglio et al., 2001; Horton et al., 1995). De manera similar, estudios realizados con fibroblastos humanos con mutaciones inactivantes en el gen que codifica para la polimerasa  $\eta$  han correlacionado la ausencia de esta proteína con un incremento significativo en la sensibilidad a CDDP (Albertella et al., 2005).

- Desregulación de la muerte celular inducida por CDDP:

Finalmente, la tolerancia al CDDP y otras drogas puede deberse a un descenso en la expresión o pérdida de alguna de las proteínas involucradas en vías de señalización de apoptosis, como la inducción de muerte celular por la vía intrínseca o mitocondrial mediante activación de p53 que activa la cascada de señales hasta las moléculas efectoras como *BCL2-associated X protein* (Bax) (Mayer et al., 2003a). Por ejemplo, se ha demostrado que existen mutaciones en la región codificante de *TP53* en aproximadamente el 50% de cánceres humanos, lo cual produce una pérdida de actividad apoptótica y aparición de resistencia a una gran variedad de tratamientos clínicos, entre los que se encuentra el CDDP (Martinez-Rivera and Siddik, 2012). También las caspasas, moléculas con un rol primordial en la ejecución del suicidio celular, pueden estar inactivadas o infraexpresadas, como se ha demostrado y correlacionado con resistencia a

fármacos en el caso de las caspasas 3, 8 y 9 en neuroblastoma, cáncer cervical, de cabeza y cuello, de ovario y de mama (Ding et al., 2000; Duiker et al., 2011; Kim et al., 2001; Kuwahara et al., 2003).

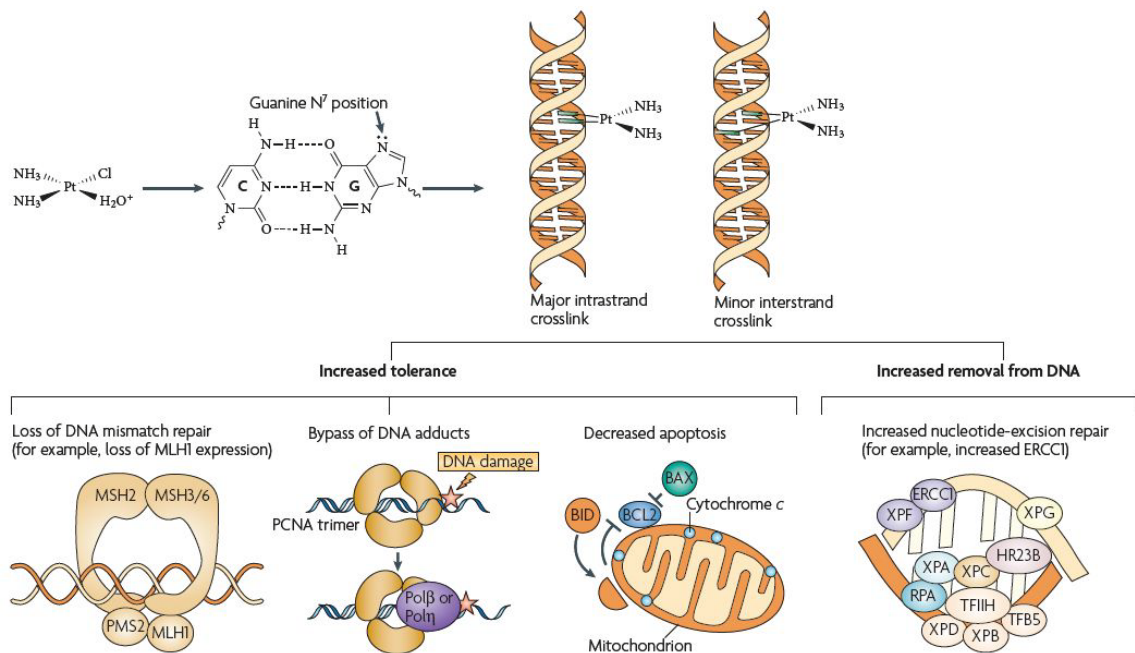


Figura 10.- Mecanismos de evasión tumoral al CDDP tras la unión al DNA.

Como apunte final hay que remarcar que, normalmente, los estudios realizados muestran que esta adquisición de resistencia no es debida o no puede explicarse por la desregulación de un solo mecanismo o vía, sino como resultado de una compleja adición de diferentes factores que acaban desembocando en la falta de respuesta del tumor a la droga.

### 4.3. Mecanismos de resistencia en TCGTs

Como ya se ha comentado en esta introducción, los TCGTs son un excelente modelo para la identificación de mecanismos moleculares asociados a la adquisición de resistencia al CDDP por la exquisita sensibilidad que presentan de manera natural al tratamiento. En el caso de los SE, estos son altamente sensibles tanto a la QT como la RT.

En cambio, los NSE son menos sensibles a la RT pero, a excepción de los teratomas, son altamente sensibles a la QT. Esta gran sensibilidad podría ser debida a las características de las células de las que se originan: las células madre embrionarias, las cuales entran en apoptosis ante el mínimo insulto tóxico que haga peligrar la integridad de su DNA (Koberle et al., 1999; Schrader et al., 2009). Las células germinales comparten esta propiedad con el objetivo de minimizar el paso de mutaciones a la siguiente generación. La pérdida de estas características embrionarias podría estar detrás del desarrollo de resistencia a tratamientos que dañan el DNA (Houldsworth et al., 2006; Oosterhuis and Looijenga, 2005).

La única excepción a estas características generales de los TCGTs es el teratoma maduro, que es resistente de manera intrínseca a los efectos de la QT, a pesar de que no se han identificado diferencias genéticas entre este y otros subtipos histológicos invasivos (Galluzzi et al., 2012; Mayer et al., 2003a; Mueller et al., 2006). Parece ser que el fenotipo resistente está inducido por cambios a nivel de expresión de diferentes genes que se manifiestan en el curso de la pérdida de las características embrionarias y la consolidación de la diferenciación somática que caracteriza a esta histología. Se sabe que los teratomas maduros expresan las proteínas RB (*retinoblastoma*), p21 y p27, lo que indica que estas neoplasias son capaces de parar el ciclo celular en G<sub>1</sub>/S. También, a diferencia de otros TCGTs invasivos, los teratomas presentan una ratio baja Bax/Bcl-2 (Mayer et al., 2003b; Strohmeyer et al., 1991). Todos estos hallazgos sugieren que los teratomas responden al daño con CDDP parando el ciclo celular en lugar de entrar en apoptosis mediada por Bax, posiblemente a causa de la diferenciación somática que presenta esta histología (Oosterhuis and Looijenga, 2005).

#### **4.3.1. Mecanismos de resistencia antes de la unión al DNA**

- Acumulación de CDDP dentro de la célula:

La evidencia en la literatura del papel de las bombas de membrana en la resistencia a CDDP en TCGTs es más bien escasa. En un estudio que compara muestras de pacientes con enfermedad sensible y refractaria a CDDP, la expresión de las proteínas

MDR, MRP2 y *lung resistance protein* (LRP, otra bomba de membrana que parece estar implicada en la eliminación celular del fármaco), no presentaron diferencias significativas que permitieran sacar conclusiones (Mayer et al., 2003b). Únicamente un estudio realizado, que comparaba muestras de pacientes sensibles y refractarios, pareció apuntar a un papel de la expresión de LRP en la evolución clínica, siendo peor cuando había expresión de esta proteína. Sin embargo no logró encontrar diferencias en MDR, MRP1 ni BCRP (Zurita et al., 2003). Otro estudio, utilizando la línea celular testicular GCT27, tampoco demostró relación entre la adquisición de resistencia y la sobreexpresión de los transportadores ABC *in vitro*, mientras sí lograron demostrarlo en una línea de cáncer de ovario y colorrectal (Kool et al., 1997). Finalmente, no se han reportado estudios que correlacionen cambios en la expresión de transportadores como CTR1 ni bombas de detoxificación (ATP7A y B) con adquisición de resistencia en TCGTs.

- Interacción del CDDP con tioles citoplasmáticos:

Como ya se ha comentado anteriormente, la conjugación del CDDP con el glutatión limita el efecto tóxico del primero (Jansen et al., 2002). Aunque algunos grupos han correlacionado la pérdida de actividad del fármaco y un incremento del glutatión y/o metalotioneínas *in vitro* en líneas celulares de TCGT como una posible pieza para explicar la sensibilidad y adquisición de resistencia en estos tumores (Koropatnick et al., 1995; Masters et al., 1996), otros autores afirman que no existen diferencias entre los niveles en TCGTs y otras líneas celulares provenientes de tumores resistentes a CDDP (Kelland et al., 1992a; Koberle et al., 2010b; Schrader et al., 2009). En cuanto al resto de proteínas, como las enzimas relacionadas con la vía de detoxificación mediada por glutatión, no existen estudios con evidencia clínica conclusiva que demuestren relación entre cambios en sus niveles y la adquisición del fenotipo resistente en TCGTs (Hussain et al., 2008).

En resumen, podemos afirmar que, aunque algunos estudios parecen correlacionar la expresión de bombas de membrana y glutatión con la adquisición de resistencia en algunos cánceres, las pruebas aportadas no son concluyentes ni suficientes para explicar la adquisición de resistencia en TCGTs, aunque puedan contribuir de manera esporádica en algunos casos.



#### 4.3.2. Mecanismos de resistencia tras la unión al DNA

- Reparación de lesiones en el DNA:

Aunque la vía del NER, por ser el principal mecanismo de reparación de las lesiones causadas por el CDDP, se ha relacionado en diferentes trabajos con la exquisita sensibilidad de las células de TCGTs al CDDP (Koberle et al., 1999; Usanova et al., 2010; Welsh et al., 2004), la implicación de un aumento funcional del NER con la aparición de resistencia en tumores testiculares ha creado controversia. Así, un estudio realizado por el grupo de *Koberle y cols.* utilizando la línea celular 833K transfectada con un plásmido de expresión de *xeroderma pigmentosum, complementation group A (XPA)*, no consiguió demostrar que la restauración de esta proteína en la célula se acompañara de un incremento en la resistencia al fármaco o a la radiación ultravioleta (Koberle et al., 2008). En otro estudio, en el que se utilizaron muestras de pacientes, se observó que la expresión de la proteína XPA, evaluada por inmunohistoquímica, es diferente según el subtipo histológico, siendo más homogénea y más frecuente en histologías más diferenciadas. Pero no se objetivaron diferencias entre muestras de tumores refractarios o sensibles ni se encontraron amplificaciones en el gen en ninguna de las muestras resistentes. Sin embargo, sí se encontró que todas las muestras provenientes de tumores en recaída tras QT eran positivas para XPA, aunque no se consiguió inducir la expresión de esta en líneas celulares tratadas con múltiples dosis sub-letales de CDDP, ni se pudieron correlacionar los niveles de proteína con sensibilidad a platino en células tratadas y derivadas resistentes (Honecker et al., 2003). En el caso de ERCC1 y XPF, que son las otras dos proteínas de la vía que parecen estar infraexpresadas en tumores testiculares sensibles según algunos estudios (Usanova et al., 2010; Welsh et al., 2004) y que podrían jugar un papel en la gran sensibilidad de estos tumores al platino, no existe literatura concluyente que demuestre que los tumores testiculares resistentes al CDDP tengan niveles incrementados de estas proteínas (Mayer et al., 2003a). En un estudio realizado por *Koberle y cols.* comparando los niveles de ERCC1 y XPF en muestras de TCGT de tipo SE y NSE y tejido testicular normal, se describen unos niveles superiores de ambas proteínas en tumores testiculares NSE en relación con SE y con tejido testicular normal,

pero sin poder relacionar un aumento en estas proteínas y una mayor resistencia al fármaco (Koberle et al., 2010a).

En cuanto a la inestabilidad de microsatélites (MSI), los TCGTs han demostrado ser bastante estables en estudios que muestran que solamente existe alrededor de un 6% de MSI en al menos 1 de los 8 *loci* investigados. En contraste con este dato, 5 de 11 (45%) muestras de pacientes con enfermedad refractaria mostraron MSI al menos en 2 *loci*, lo que sugiere la idea que el MMR esté implicado en el fallo para iniciar la apoptosis y consiguiente resistencia al tratamiento (Mayer et al., 2002). Otra vía por la que este mecanismo de MMR defectuoso podría estar implicado en la adquisición de resistencia sería la aparición de mutaciones secundarias que se producirían como consecuencia de la inestabilidad genética (Mayer et al., 2003a). Un estudio posterior en pacientes con TCGTs, realizado con un bajo número de casos, determinó un porcentaje de MSI de 31,4% pero no consiguió correlacionar este dato con ninguno de los parámetros clínicos evaluados, como estadio tumoral, histología o resistencia a QT (Olasz et al., 2005). Más recientemente, el grupo de Honecker y cols. ha utilizado un panel de 100 controles y 35 tumores refractarios a CDDP para demostrar una mayor incidencia de MSI en los tumores resistentes (26% vs 0%) en dos o más de los *loci* analizados. El panel de microsatélites utilizado consta de dos mononucleótidos (BAT25 y BAT26) y seis dinucleótidos (D2S123, D5S346, D17S250, BAT40, BATRII y MSH6). En este mismo trabajo se correlaciona, además, la presencia de mutaciones en *BRAF* y la adquisición de resistencia en TCGTs (Honecker et al., 2009). Se sabe que las mutaciones en *BRAF* y *KRAS* son eventos raros en tumores testiculares, habiéndose reportado en menos del 10% de los tumores en las series analizadas. En este trabajo se confirma que las mutaciones en *KRAS* se dan con muy baja frecuencia (2%) pero se objetiva por primera vez una proporción elevada de mutaciones en *BRAF* V600E en tumores resistentes (26% en tumores refractarios vs 1% en controles).

También se ha postulado que podrían existir deficiencias en la vía de la recombinación homóloga (HR) en estos tumores (Cavallo et al., 2012). Esta vía estaría

implicada en la reparación de los ICLs formados por el CDDP, pero no existen datos que apunten a un aumento de sus componentes en tumores resistentes.

- Desregulación de la muerte celular inducida por CDDP:

Una vez los mecanismos de reparación han hecho su función, y ante un insulto tóxico que no han sido capaces de reparar, la célula debe entrar en apoptosis. Las vías apoptóticas también son susceptibles de ser alteradas y, por lo tanto, causantes de resistencia. Este fenómeno puede ser debido a un aumento de factores anti-apoptóticos como moléculas de la familia de proteínas de Bcl-2 o defectos en proteínas efectoras del suicidio celular como las caspasas (Mayer et al., 2003a). Los estudios realizados en tejido tumoral testicular han observado una ratio elevada de Bax/Bcl-2 en los componentes invasivos no tratados, lo que parece indicar que la sensibilidad de los TCGTs también podría estar relacionada con una vía apoptótica intrínseca plenamente funcional en estas neoplasias.

En el estudio conducido por *Mueller y cols.*, se hipotetiza que el inicio de la apoptosis inducida por CDDP en tumores testiculares está mediado preferencialmente por la caspasa-9 y no la -8, y que las células resistentes abrogan la activación de la caspasa-9, evitando así el inicio de la muerte celular programada. Este fenómeno, según los autores, sería independiente del nivel de expresión de otros reguladores clave de la apoptosis como p53, las proteínas de la familia de Bcl-2 y el sistema Fas (Mueller et al., 2003).

En cuanto a p53, se sabe que los niveles de proteína *wt* son elevados en TCGTs, siendo una de las razones hipotetizadas como causante de la exquisita quimiosensibilidad que presentan (Gutekunst et al., 2011). La idea de su papel en la adquisición de resistencia surgió a raíz de los resultados de un estudio en el que se encontraron mutaciones en este gen tras la exposición a CDDP *in vitro* en la línea de teratocarcinoma P19 (Lutzker and Levine, 1996; Lutzker et al., 2001). Por otro lado, se realizaron dos trabajos en los que se analizó el estado mutacional de *TP53* en muestras de pacientes refractarios. En el primero se detectaron 4 mutaciones en una cohorte de 28 muestras de

pacientes, siendo tres de ellas teratomas maduros y la cuarta una histología somática derivada de la transformación de un teratoma maduro (Houldsworth et al., 1998). El teratoma, como ya se ha comentado, es una histología refractaria a QT *per se* y la contribución de *TP53* es difícil de estimar. En el segundo estudio, no se encontraron mutaciones en 18 casos de pacientes refractarios, y los niveles de p53 descritos eran similares a los del grupo de pacientes sensibles al fármaco (Kersemaekers et al., 2002). Por lo tanto, las disparidades en los resultados entre los dos estudios vienen posiblemente dadas por las diferencias en las histologías de las poblaciones estudiadas y, en conclusión, parece que las mutaciones adquiridas en *TP53* por sí solas no serían las responsables del fenotipo resistente. Sin embargo, otros factores a tener en cuenta son las interacciones de esta proteína con aquellas que la regulan, por ejemplo MDM2, que es la principal reguladora a través de diferentes mecanismos como promover la degradación de p53, estimulando el exporte nuclear e inhibiendo su acetilación. El estudio realizado por Koster y cols. apunta a que, en células resistentes, p53 sigue unida a MDM2 después del tratamiento con el fármaco, siendo secuestrada en el citoplasma, lo cual impediría activar la señalización que promueve la apoptosis, produciendo así resistencia a CDDP (Koster et al., 2011). En consonancia con estos resultados, otro trabajo sugiere la utilidad clínica de tratar a los pacientes con tumores testiculares refractarios al tratamiento convencional y con p53 *wt* con terapias combinadas de CDDP y moléculas inhibitoras de MDM2 como Nutlina-3 (Bauer et al., 2010). Por otro lado, es necesario tener en cuenta que podrían ser defectos en algún efector que se encuentre *downstream* en las vías en las que actúa p53 los que podrían bloquear la activación de apoptosis mediada por esta proteína. Existen estudios que sugieren que un aumento en la expresión de p21 podría ser la causa de la aparición de resistencia en TCGTs, comparando un panel de células testiculares sensibles y resistentes a la droga. Los resultados muestran unos niveles de p21 citoplasmática elevados en las líneas resistentes respecto a las sensibles. Esta proteína formaría un complejo en el citoplasma con CDK2, evitando así la función proapoptótica de esta última (Koster et al., 2010).

## 5. EL MODELO *IN VIVO*: LOS XENOIMPLANTES ORTOTÓPICOS

Como ya se ha comentado a lo largo de esta introducción, uno de los principales factores limitantes en el estudio de los TCGTs tipo II es la falta de modelos preclínicos representativos de la enfermedad. La mayoría de estudios realizados en este campo utilizan líneas celulares derivadas de TCGTs, pero existen relativamente pocas líneas disponibles y, las más utilizadas, fueron generadas hace más de 30 años, por lo que podrían haber adquirido nuevas características *in vitro* que ya no se correspondan con el tejido original, además de no existir una representación homogénea de todos los subtipos de TCGTs tipo II. Otro factor a tener en cuenta es que la falta del tejido acompañante propio del organismo, así como las interacciones fisiológicas, hacen que sea difícil valorar la eficacia de nuevos compuestos o combinaciones de estos, así como estudiar los patrones de diseminación a distancia o adquisición de resistencia en estos tumores.

### 5.1. Animales modificados mediante ingeniería genética

En cuanto a los modelos animales, aquellos modificados mediante ingeniería genética son, posiblemente, las herramientas más sofisticadas que existen para el estudio de las neoplasias, mimetizando de forma razonablemente precisa la patofisiología y las alteraciones moleculares de la enfermedad en humanos (Carver and Pandolfi, 2006; Frese and Tuveson, 2007; Sharpless and Depinho, 2006). Las principales ventajas de estos modelos son que los tumores se desarrollan en un entorno de inmunidad intacta y utilizan procesos fisiológicos requeridos para la progresión tumoral como la angiogénesis. Además, suelen evolucionar desde lesiones preneoplásicas, simulando el proceso de la enfermedad desde el inicio. El problema es que son caros de generar y se requiere un conocimiento previo de la biología y las alteraciones genéticas propias de la enfermedad. En el caso de los TCGTs tipo II, hasta el momento no se ha logrado generar ningún modelo de este tipo debido a la falta de conocimiento de las alteraciones genéticas causantes (Oosterhuis and Looijenga, 2005). Existe un modelo de malignización de las CGP en ratones 129/Sv-ter (Stevens, 1970; Stevens and Little, 1954; Walt et al., 1993). Pero se ha

demostrado que las mutaciones en *TER* en el contexto de ratones 129/Sv son un potente modificador de la susceptibilidad de presentar TCG (Asada et al., 1994; Lam and Nadeau, 2003). Los tumores que suelen originarse con este modelo son teratomas derivados de CGP. Sin embargo, sabemos que los TCGs tipo II se originan a partir de una lesión premaligna (NITCG), son hipertriploides y presentan amplificación en 12p, características que no se dan en este modelo animal, lo cual hace que no sea un buen modelo para el estudio de este tipo de tumores, estando más próximo a los TCGs tipo I, siendo para estos el modelo más importante hasta la fecha (Oosterhuis and Looijenga, 2005).

### **5.2. Animales con xenoinjertos**

Estos modelos han sido también decisivos en el estudio y conocimiento de los procesos biológicos relacionados con el cáncer, a la vez que se han utilizado ampliamente para investigar la eficacia de nuevos compuestos o combinaciones terapéuticas.

La mayoría son modelos de implantación heterotópica subcutánea de líneas celulares, aunque a veces también se implantan de esta forma biopsias de pacientes (Bibby, 2004; Frese and Tuveson, 2007; Hoffman, 1999; Man et al., 2007). Sin embargo, la aproximación subcutánea no es demasiado eficiente en TCGTs, puesto que pocos de los tumores engraftados de esta manera crecen. Además, la desventaja de este modelo es la falta del microambiente propio del órgano o tejido de origen del tumor, hecho que se acentúa en estos tumores, donde el entorno hormonal parece de vital importancia para su proliferación.

Por otro lado, tenemos los xenoinjertos ortotópicos, como los que hemos utilizado en el presente trabajo. Para este modelo, se utilizan ratones atímicos que tienen un déficit en linfocitos T (causado por una delección espontánea en el gen *FOXN1*), lo cual no les permite generar rechazo cuando se les trasplantan células o tejidos de origen humano. Este modelo ofreció un mayor número de implantaciones exitosas para TCGTs en nuestro laboratorio respecto al modelo subcutáneo. Además, esta opción presenta ventajas como el hecho que la generación de metástasis es más eficiente, mimetizando la

situación clínica tal como sucede en humanos. Otra ventaja es que los procesos como la invasividad o la angiogénesis son más fáciles de estudiar respecto a los modelos subcutáneos. En comparación con el estudio de muestras tumorales humanas, que suelen ser ricas en celularidad acompañante como fibroblastos, células endoteliales, macrófagos, etc., los tumores crecidos en ratón tienen la particularidad de haber sustituido estas células no tumorales de origen humano por homólogas de origen murino, lo cual nos permite trabajar con tejidos tumorales 100% puros sin contaminación de otras células humanas (Man et al., 2007; Voskoglou-Nomikos et al., 2003). Por otro lado, varios trabajos han demostrado su utilidad para el estudio de nuevos fármacos, correlacionando bastante bien con los resultados posteriores en ensayos clínicos (Kuo et al., 1993; Vidal et al., 2012; Voskoglou-Nomikos et al., 2003).

Sin embargo, esta técnica también tiene sus desventajas, como la dificultad de la implantación que requiere de una experiencia considerable por parte del investigador, así como el mayor tiempo requerido para llevar a cabo la implantación respecto a los tumores subcutáneos. Además, la medición de los tumores y, por lo tanto, el estudio de su evolución y/o respuesta a una droga es más complejo, ya que según el tejido u órgano en el que se implanta el espécimen es difícil valorar el tamaño del tumor desde el exterior. Afortunadamente, este problema se ha podido salvar gracias a la aparición de nuevas técnicas de imagen como la PET (*positron emission tomography*), RNM (resonancia nuclear magnética) o el uso de células transfectadas con genes productores de agentes bioluminiscentes que permiten monitorizar tanto el tumor primario como la presencia de metástasis (Bibby, 2004; Chishima et al., 1997; El Hilali et al., 2002). En el caso de los TCGTs, para salvar el gran coste de estas técnicas de monitorización, también se pueden cuantificar los marcadores séricos AFP y  $\beta$ HCG, que indican de una manera fiable la evolución en el crecimiento de los tumores, así como la respuesta al tratamiento con fármacos (Castillo-Avila et al., 2009). Otra desventaja a tener en cuenta es que para poder implantar tejido proveniente de humano en un ratón, el animal tiene que ser inmunodeficiente, por lo que se pierden aquellas respuestas asociadas a la respuesta

inmune, cuyo papel también es importante en los procesos del cáncer (Voskoglou-Nomikos et al., 2003).

Aún así, cada vez más laboratorios y compañías farmacéuticas eligen este modelo como herramienta para el estudio y caracterización del cáncer, así como para testar nuevos compuestos antes de pasar a la clínica, facilitando en algunos casos los trámites requeridos para aprobar su uso en humanos. Como ejemplo de esto, tenemos el caso de la lurbinectedina® (Pharmamar Zeltia), un fármaco que se une a la gruta menor del DNA y que actuaría de manera sinérgica con el CDDP, ayudando a revertir la resistencia a este en tumores de ovario (Vidal et al., 2012). Después de ser comprobada su eficacia en un modelo ortotópico de cáncer de ovario generado por nuestro grupo, el fármaco consiguió ser aprobado por la FDA (USA) y la EMEL (Europa) para ensayos clínicos en un periodo de tiempo sorprendente e inhabitualmente reducido, recibiendo la categoría de *orphan drug*. Habiendo superado actualmente de manera exitosa un ensayo de fase II, ya está en proceso de diseño/reclutamiento para un fase III.



**HIPÓTESIS**



Desde la introducción del cisplatino (CDDP) en la clínica, la esperanza de vida de los pacientes con tumores de células germinales testiculares se ha incrementado de manera muy significativa, llegando a un porcentaje de curaciones alrededor del 70-80% en los casos de enfermedad avanzada. A pesar de esto, aún existe un porcentaje importante de pacientes diagnosticados con enfermedad diseminada que no conseguirán remisiones duraderas y fallecerán a causa de la enfermedad. El desconocimiento de los mecanismos moleculares que subyacen a la aparición de resistencia al CDDP es uno de los principales puntos limitantes a la hora de mejorar los esquemas de tratamiento. Arrojar luz sobre este tema nos permitirá aplicar de una manera más racional nuevos tratamientos para aquellos enfermos que no responden a la quimioterapia convencional. Por lo tanto, un mejor conocimiento de los mecanismos de adquisición de resistencia ha de permitir mejorar la supervivencia y calidad de vida de los pacientes que no responden al tratamiento estándar.

Otro de los grandes problemas a la hora de evaluar nuevas opciones terapéuticas para estos tumores es la falta de modelos preclínicos que reproduzcan de una manera fidedigna la enfermedad, así como los patrones de diseminación y la adquisición de resistencia. El uso de ratones atímicos con xenoinjertos ha demostrado ser una herramienta útil en desarrollo preclínico de nuevos fármacos y combinaciones terapéuticas. De esta manera, creemos que el uso de un modelo murino de xenoinjertos ortotópicos (orthoxenografts) con resistencia adquirida al cisplatino puede permitirnos evaluar la eficacia y seguridad de una nueva combinación de fármacos para tratar tumores refractarios, así como estudiar *in vivo* los cambios genéticos inducidos durante el proceso de adquisición de resistencia al CDDP, fármaco clave en el tratamiento del cáncer de testículo.



## **OBJETIVOS**



A partir de la hipótesis planteada, los objetivos específicos del presente trabajo son:

## **OBJETIVO 1**

### **Caracterización de los mecanismos genéticos de resistencia al cisplatino en TCGTs *in vitro*.**

Con este propósito, se desarrollarán los siguientes puntos:

1. Estudio de las mutaciones asociadas a la adquisición del fenotipo resistente.
2. Evaluación de la relevancia de las mutaciones encontradas y búsqueda de otros genes potencialmente relacionados con la resistencia.

## **OBJETIVO 2**

### **Caracterización funcional del gen *PARP6* y valoración de su relevancia en mecanismos relacionados con resistencia al cisplatino.**

Para desarrollar este objetivo se evaluará:

1. Efectos de *PARP6* sobre viabilidad celular.
2. Participación de *PARP6* en regulación del ciclo celular.
3. Papel de *PARP6* en reparación de lesiones en el DNA.

### **OBJETIVO 3**

#### **Estudio de la adquisición de resistencia al cisplatino *in vivo* en una serie de tumores testiculares xenoinplantados ortotópicamente en ratones.**

La consecución de este objetivo se desglosa en los siguientes apartados:

1. Generación *in vivo* de tumores resistentes al fármaco.
2. Estudio de la evolución del estado mutacional de los tumores a lo largo del proceso de adquisición de resistencia.

### **OBJETIVO 4**

#### **Evaluación de la eficacia de la terapia combinada con cisplatino y un inhibidor de las PARPs en tumores testiculares refractarios al tratamiento convencional.**

Para desarrollar el siguiente objetivo evaluaremos:

1. Efectividad del tratamiento combinado en líneas celulares de cáncer testicular.
2. Efectos sobre la capacidad de reparación del DNA y regulación del ciclo celular.
3. Eficacia de la combinación *in vivo* en ratones xenoinjertados con tumores resistentes al CDDP.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**



# CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA AL CISPLATINO EN TCGTs *IN VITRO*

## 1. LÍNEAS CELULARES DE TCGTs

Las líneas de células de TCGTs utilizadas para los experimentos *in vitro* de resistencia al CDDP durante esta tesis fueron las siguientes:

- GCT27: los estudios de caracterización realizados indican que se trata de un carcinoma embrionario. Proviene de un paciente con TCGT que no fue tratado utilizando cisplatino (CDDP).
- SuSa: las características histológicas y citogenéticas indican que se trata de un carcinoma embrionario.
- 833K: línea celular proveniente de una metástasis abdominal de un paciente con TCGT. La histología de esa metástasis contenía células tumorales de carcinoma embrionario, teratoma, seminoma y focos de coriocarcinoma. El paciente fue tratado con varios fármacos, pero nunca se utilizó CDDP. Por los experimentos de caracterización *in vitro* e *in vivo* se ha llegado a la conclusión que las células derivadas de esta metástasis que crecen en cultivo son el elemento carcinoma embrionario del tejido original resecado del paciente.

Las células fueron mantenidas en medio RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*, Gibco) o DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Gibco) suplementado con un 20% de FBS (*fetal bovine serum*, Gibco) y un 0,2% de Primocin (InvivoGen) e incubadas en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

En los tres casos, se disponía de la línea original sensible a CDDP (S) y su derivada resistente a la droga (R). La resistencia se consiguió mediante el cultivo de las células S en concentraciones crecientes de fármaco durante un tiempo prolongado, alternado con periodos de descanso para permitir la recuperación y crecimiento de las células.

El CDDP (Sigma Aldrich) utilizado, adquirido en polvo, era disuelto en DMSO (dimetilsulfóxido) puro para preparar un stock 10mM. Para asegurar la estabilidad del fármaco, las alícuotas de stock nunca eran congeladas/descongeladas más de tres veces, y cada 2-3 meses se preparaba stock nuevo. El fármaco era diluido a la concentración deseada para cada experimento en el medio de cultivo que, posteriormente, se añadía a las células en estudio.

## 2. CURVAS DE VIABILIDAD CELULAR

Las 3 líneas pareadas (sensible/resistente) fueron tratadas con concentraciones crecientes de CDDP en un ensayo de corta duración, según el protocolo que se detalla a continuación:

Día 0. Sembrar 1.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos.

Día 1. Añadir las concentraciones pertinentes de droga. En este caso, se probaron concentraciones en un rango entre 10  $\mu$ M y 0,1 nM.

Día 6. Lectura de los resultados de viabilidad celular mediante el método de *CellTiter-Glo* (CTG, Promega).

El CTG es un método enzimático que da una idea de la cantidad de células viables en un cultivo, basándose en la cuantificación del ATP presente, el cual indica la presencia de células metabólicamente activas. La adición del reactivo produce la lisis celular y la subsecuente generación de una señal luminiscente proporcional a la cantidad de ATP presente lo cual, a su vez, guarda una correlación directa con el número de células viables en el cultivo. La señal es leída en un luminómetro que, después de los cálculos pertinentes, indica el número de células presentes en cada pocillo.



**Figura 11.** Reacción de la luciferasa. La mono-oxigenación de la luciferina es catalizada por el enzima luciferasa en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$ , ATP y oxígeno molecular.

Protocolo CTG:

1. Añadir 75  $\mu\text{l}$  de reactivo CTG sobre los 100  $\mu\text{l}$  de medio de cada pocillo de la placa.
2. Agitar suavemente durante 10 minutos en ausencia de luz.
3. Leer en el luminómetro.

### 3. SECUENCIACIÓN DE ÚLTIMA GENERACIÓN

El concepto básico de esta tecnología es similar a la secuenciación Sanger basada en la electroforesis capilar (CE), donde las bases de un pequeño fragmento de DNA son identificadas secuencialmente por señales radioactivas o fluorescentes emitidas durante la resintetización del fragmento. La secuenciación de última generación (NGS, del inglés *next generation sequencing*) mejora este proceso mediante millones de reacciones paralelas, en vez de limitarse a uno o pocos fragmentos de DNA. Este avance permite una rápida secuenciación de grandes regiones cromosómicas, incluso del genoma entero, siendo los instrumentos más modernos capaces de producir cientos de gigabases de datos en un solo experimento de secuenciación. Para ilustrar el mecanismo de funcionamiento de esta técnica, se puede considerar una sola muestra de DNA genómico (gDNA). Primeramente, este DNA es fragmentado produciendo una librería de pequeños segmentos que pueden ser secuenciados de manera uniforme y precisa en millones de reacciones paralelas. A continuación, las cadenas de bases identificadas, llamadas "lecturas" (del inglés *reads*), son ordenadas usando un genoma conocido como referencia (resecuenciación) o en ausencia de genoma "molde" (secuenciación *de novo*). La

alineación de todas las lecturas revela la secuencia completa de cada cromosoma en la muestra de gDNA estudiada.

En el presente caso, se realizó secuenciación exómica, también conocida como captura exómica dirigida, que es una estrategia de gran eficiencia para secuenciar de manera selectiva las regiones codificantes del genoma, siendo una alternativa más barata pero igualmente eficiente a la secuenciación del genoma entero. Sin embargo, la principal limitación de esta técnica es que sólo es capaz de identificar variantes presentes en regiones codificantes, no permitiendo la detección de aquellos cambios en el DNA que afectan regiones no codificantes del genoma.

Con esta técnica se secuenció el exoma de las células de TCGT SuSa S y R. La metodología se llevó a cabo en la unidad de secuenciación de última generación del *Institute of Cancer Research* (ICR), Londres, según los pasos que se describen a continuación a grandes rasgos y que se muestran esquemáticamente en la **figura 12** y **13**.

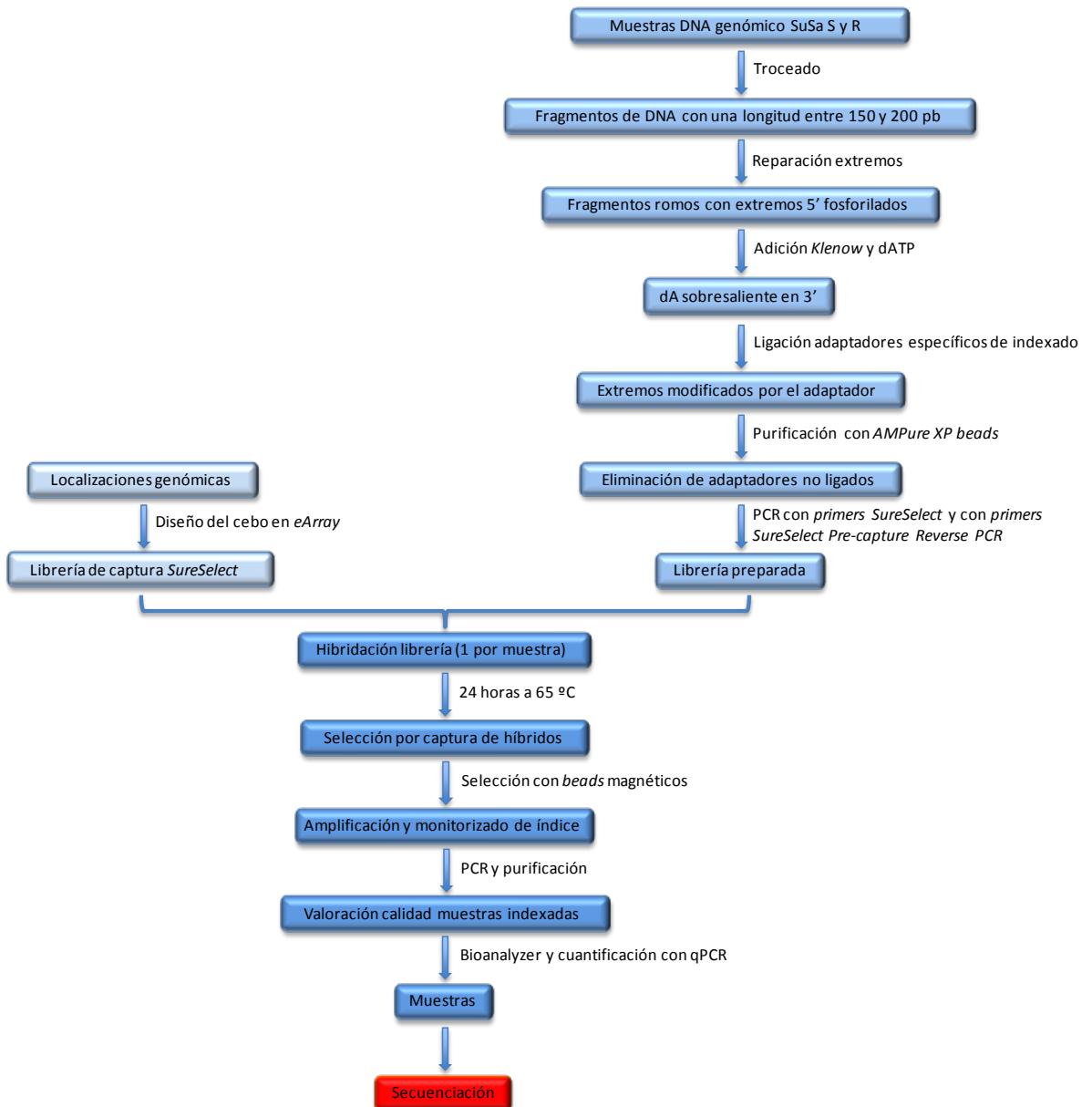
### **3.1. Extracción de gDNA de las muestras**

Para realizar el experimento de secuenciación, se necesita gDNA purificado de gran calidad. En este sentido, se utilizó el *Blood and Cell Culture DNA Maxi Kit* (Qiagen) para extraer el DNA de las células. Una vez obtenido, este se cuantificó utilizando el lector *Qubit* (Life Technologies), al mismo tiempo que se comprobaba que la densidad óptica de la ratio  $A_{260}/A_{280}$  estuviera en un rango entre 1,8 y 2.

### **3.2. Enriquecimiento de dianas y preparación de las muestras**

Este paso permite capturar de manera selectiva las regiones genómicas de interés de una muestra de DNA antes de su secuenciación. Los reactivos utilizados fueron *SureSelect Human All Exome v3* (Agilent Technologies) y los pasos seguidos fueron los estándares del protocolo "*SureSelectXT Target Enrichment System for Illumina Paired-End Sequencing Library*" (Agilent). El equipo utilizado para evaluar y cuantificar el DNA durante el proceso de enriquecimiento fue el *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies) y

las qPCRs (*quantitative polymerase chain reaction*) realizadas con el kit y equipo de KAPA SYBR FAST One-Step qRT-PCR (KAPA Biosystems).



**Figura 12.-** Esquema del protocolo de preparación de las muestras previo a la secuenciación.

### 3.3. Secuenciación

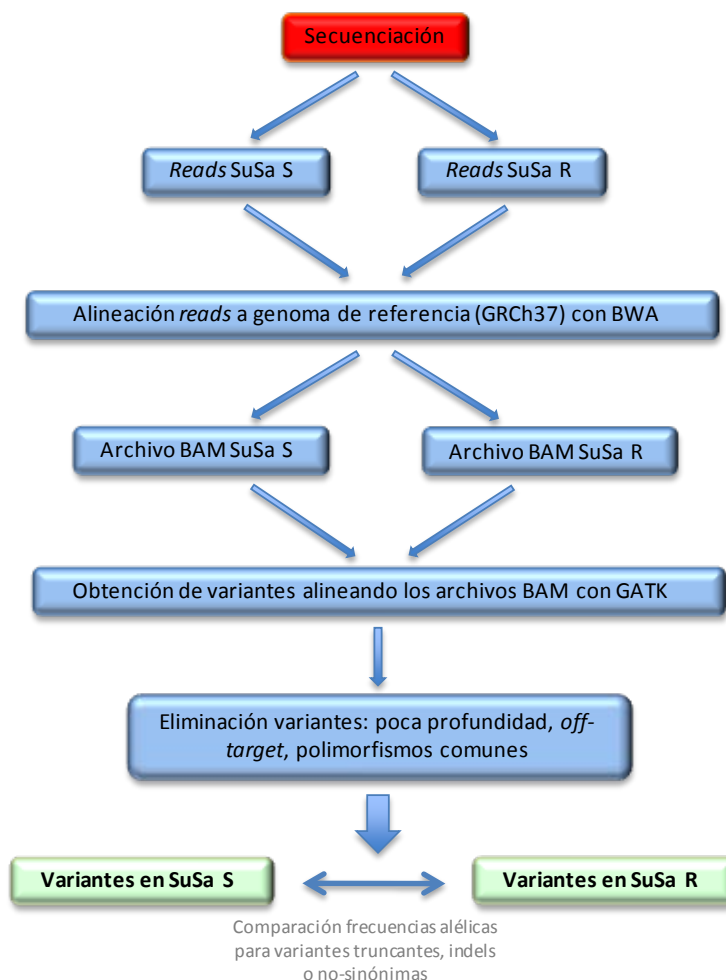
Las muestras fueron secuenciadas utilizando el aparato *HiSeq 2000* (Illumina), obteniendo lecturas de 2 x 76 pb.

### 3.4. Análisis bioinformático

El programa *Casava software* versión 1.8 (Illumina) fue utilizado para hacer el *demultiplex* de los datos obtenidos durante la secuenciación. El formato en el que se obtuvieron los datos de las secuencias fue *Fastq*. Las lecturas que no pasaron los filtros de “castidad” de Illumina fueron retiradas antes de continuar con el análisis.

A continuación, el programa *BWA* fue utilizado para alinear las lecturas obtenidas con el genoma humano de referencia (GRCh37). Los duplicados de PCR fueron eliminados antes de seguir con el procesado y detección de variantes de los datos. La obtención de variantes se hizo mediante el uso estándar de *GATK Broad Best Pipeline* versión 2. Las variantes que se encontraran fuera de las regiones exónicas y aquellas con una calidad de genotipo inferior a 30 fueron excluidas del análisis. Además, aquellas variantes cubiertas por menos de 5 lecturas en cualquiera de las muestras (SuSa S o R) o aquellas con una frecuencia alélica del 5% o superior en cualquier población de *HapMap* también fueron eliminadas. Las variables restantes tenían también que cumplir la condición de tener una presencia mínima del 15% en el DNA analizado de una de las muestras. Aquellas mutaciones que cumplieran todos estos requisitos fueron contrastadas con la base de datos de variantes de *Ensembl* (versión 61) para anotar cada una junto con la consecuencia predicha para el producto génico. En el caso de múltiples consecuencias predichas en una única localización, sólo la más severa fue anotada.





**Figura 13.-** Esquema del análisis realizado con los datos obtenidos en la secuenciación de las muestras.

#### 4. SCREEN CON SMALL INTERFERING RNAs

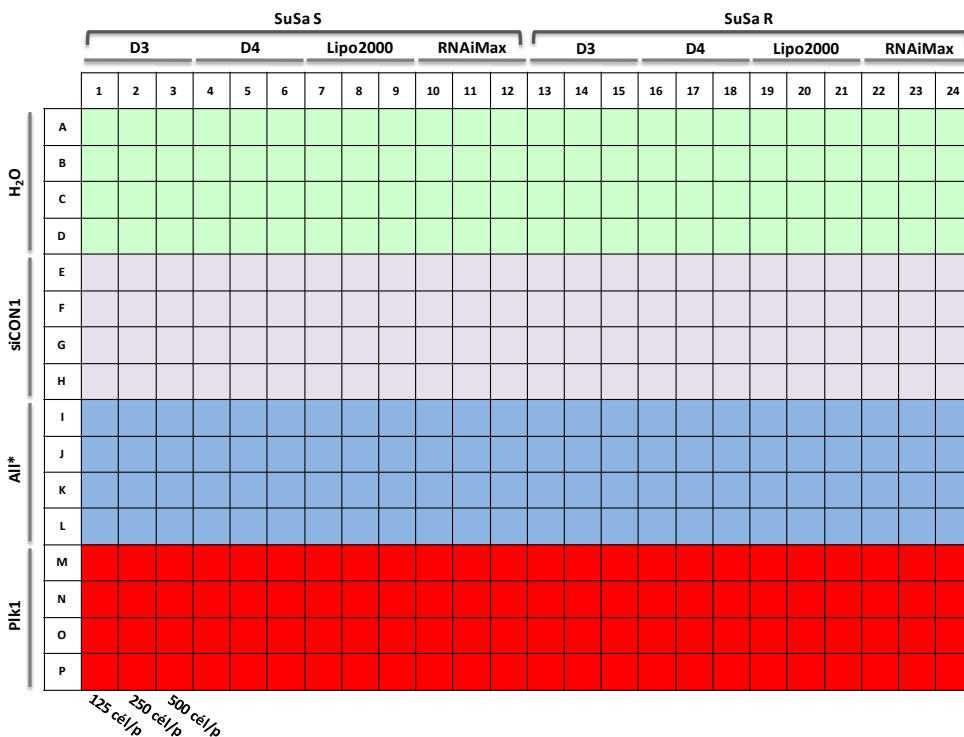
Los *small interfering RNAs* (siRNAs) son un tipo de RNA de interferencia (RNAi) altamente específico para la secuencia genética de su RNA mensajero (mRNA) diana, interfiriendo de esta manera en la expresión del gen y provocando, como consecuencia última, una reducción de su producto proteico. Esto hace del RNAi una herramienta simple y rápida para la comprensión de la función de los genes, estudiando los efectos de la infraexpresión del gen de interés en el funcionamiento celular, en la respuesta de la

célula a un compuesto determinado, etc. El RNAi es introducido en las células (inyectado, procedente de virus, por electroporación, etc.) en forma de RNA de doble cadena (dsRNA) largo. Una vez en el interior de estas, es reconocido como material genético extraño, lo cual activa la enzima ribonucleasa (RNasa) *Dicer*, que se encarga de cortar el dsRNA en fragmentos cortos (los siRNAs). La hebra *antisense* se incorpora entonces al complejo RISC, activándolo. Así, se identifica el mRNA homólogo al siRNA, cortándolo en dos mitades que son después degradadas por la maquinaria celular, eliminando (o disminuyendo) de esta forma la expresión de la proteína correspondiente.

De los resultados obtenidos en el experimento de NGS con células SuSa S y R, se seleccionaron aquellas mutaciones presentes solamente en una de las líneas celulares (sensible o resistente) y se generó una librería customizada de siRNAs para interferir cada uno de los genes de interés. Además, en el *screen* se utilizó también una librería que contenía siRNAs para silenciar los genes relacionados con reparación de daño en el DNA y otra para los principales genes supresores de tumores.

#### 4.1. Optimización

Para empezar, se estudiaron las condiciones de transfección óptimas para las líneas celulares que se iban a utilizar en el *screen* (SuSa S y R), probando diferentes reactivos de transfección (Lipofectamina 2000 y RNAiMax, Invitrogen; Dharmafect 3 y 4, Dharmacon Thermo Scientific) y varios números de células por pocillo (125, 250 y 500 células/pocillo) en placas de 384 pocillos, tal y como se muestra en la **figura 14**. Las células fueron transfectadas de manera reversa según el protocolo que se detalla a continuación. Los siRNAs utilizados en este caso son dos controles negativos de transfección (siCON1 y siAll\*) y un control positivo (siPLK1). En el caso de los controles negativos, se trata de siRNAs sin homología por ningún gen conocido en genomas de mamíferos. El control positivo siPLK1 inhibe la expresión del gen con el mismo nombre, cuya función está relacionada con la transición G2/M y cuya pérdida de expresión induce vías pro-apoptóticas inhibiendo así el crecimiento celular.



**Figura 14.-** Esquema de la distribución del número de células por pocillo, siRNAs y reactivos de transfección utilizados durante la optimización del proceso para la posterior realización del *screen*. D3: Dharmafect 3; D4: Dharmafect 4; Lipo2000: Lipofectamina 2000.

- Preparación de los siRNAs:

1. Resuspender los siRNAs (stock 2 nmol, Dharmacon) en 100 µl de agua tratada con DEPC (dietilpircarbonato) para obtener una concentración de 20 µM.
2. Añadir los siRNAs (20 µM) en la localización correspondiente de las placas de 96 pocillos y hacer una dilución 1:100 con agua DEPC para obtener la concentración final requerida (200 nM).
3. Transferir 5 µl de cada siRNA a las placas de 384 pocillos (para obtener la distribución que muestra la **figura 14**) y sellar con tapas de aluminio.
4. Centrifugar las placas 15 segundos a 1.000 rpm y guardar a -20 °C hasta proceder a la transfección.

- Transfección (*reverse*):

1. Descongelar las placas de 384 pocillos durante 20-30 minutos a TA.
2. Centrifugar a 900 rpm durante 5 minutos.

3. Quitar los precintos de aluminio y tapar las placas con tapas de plástico para evitar la evaporación de los siRNAs.
  4. Prediluir los reactivos de transfección en OptiMEM (*optimized minimal essential medium*, Gibco) (0,05  $\mu$ l de lípido + 4,95  $\mu$ l de OptiMEM por pocillo) e incubar 10 minutos a TA.
  5. Añadir 5  $\mu$ l/pocillo de OptiMEM a la mezcla de transfección realizada en el paso anterior y dispensar 5  $\mu$ l del producto resultante en cada pocillo. Centrifugar 15 segundos a 900 rpm.
  6. Incubar durante 30 minutos.
  7. Mientras tanto, tripsinizar las células, contarlas y diluirlas en medio sin antibióticos para obtener la densidad deseada.
  8. Añadir 35  $\mu$ l de células en cada pocillo de las placas y dejarlas en el incubador a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 7 días.
- CTG:
1. Preparar el reactivo CTG diluido 1:4 en tampón fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*, PBS).
  2. Eliminar el medio de cultivo por inversión de las placas, añadir 20  $\mu$ l de CTG en cada pocillo e incubar durante 10 minutos en agitación a oscuras.
  3. Cuantificar la luminiscencia emitida en el lector de placas.

A partir de los resultados obtenidos en la optimización, se decidió utilizar Dharmafect 3 como reactivo de transfección y 150 células/pocillo en el caso de las SuSa S y 100 en el caso de las R.

En el *screen* se utilizaron 3 concentraciones de CDDP correspondientes a las fracciones supervivientes (FS) 25, 50 y 75 para cada línea celular. Para determinar las concentraciones de droga necesarias para obtener estos valores de supervivencia, las células fueron transfectadas de la misma manera y con los mismos siRNAs control que los que se acaban de describir para la optimización de los reactivos y, dos días después, fueron tratadas con CDDP en un rango de concentraciones entre 10  $\mu$ M y 0,1 nM. Cinco

días más tarde, la viabilidad celular fue cuantificada mediante CTG como se describe en el protocolo de la optimización.

**Tabla 7.-** Concentraciones de CDDP necesarias para lograr las FS requeridas para el *screen*.

	FS	LogFS	Concentración CDDP ( $\mu\text{M}$ )
<b>SuSa S</b>	25	-6,514	0,31
	50	-6,898	0,13
	75	-7,264	0,05
<b>SuSa R</b>	25	-5,879	1,32
	50	-6,179	0,66
	75	-6,438	0,37

#### 4.2. Screen

Este experimento se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo detallado en la optimización. Los genes de las tres librerías fueron distribuidos en placas de 384 pocillos (**tabla 8**), añadiendo como controles negativos siAll\*, siCON1 y siCON2; y como controles positivos siPLK1, ocupando un total de 3 placas. Cada gen de las librerías fue testado con 3 concentraciones de CDDP (FS 25, 50 y 75), más un control con DMSO. Además, cada placa y condición se realizó por triplicado para obtener tres réplicas para cada gen y condición. Este patrón se repitió para ambas líneas celulares en estudio (SuSa S y R), con lo que el número total de placas ascendió a 72.

Tabla 8.- Localización de los siRNAs utilizados en el screen en las placas de 384 pocillos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
<b>A</b>		siCom1	FANCF	PMS1	FANCG	XPC	FBXW7	RAD23B	FH	CETN2	RAD23A	SMAD4	XPA	MAP2K4	RPA1	MEN1	RPA2	MLH1	RPA3	MSH2	ERCC3				
<b>B</b>		siCom1	TREX2	EXO1	APT-X	TDP2				SPO11					UBE2A										
<b>C</b>		siCom2	MSH6	ERCC2	MUTHY	GFTH2	NF1	GFTH2	NF2	GFTH2	FLJ21816	GFTH2	PHOX2B	CDK7	PIK3R1	CCNH	PMS1	MINAT1	FANCA						
<b>D</b>		siCom2	UBE2N	H2AFX		SETMAR	CHAF1A			BLM		WRN	RECQL4	RECQL4											
<b>E</b>		siCom2	PITCH	ERCC1	PTEN	ERCC4	RB1	LLG1	RECQL4	ERCC8	SBOS	ERCC6	SDHB	XAB2	SDHC	DOB1	SDHO	DOB2	SHARCB1	MMS19	FANCS	RAD51			
<b>F</b>		siCom2	FANCB		FANCC	FANCD2	FANCD3	TCE1	RAOS1L3	FAS	DMC1	TP53	XRCC2	XRCC3	TSC2	RAD52	VHL	RAD54L	WT1	RAD54B					
<b>G</b>		siCom1	PA1B2	C19orf40		DCLRE1A	DCLRE1B	RECOL	BP44	RECOL	RECOL	RECOL	RECOL	RECOL	RECOL5	HEL308									
<b>H</b>		siCom1	FLJ39827	BRCA2	XPA	SHFM1	XPC	RAD50	PRKAB1A	MRE11A	ATRIP	NBN	TOPBP1	RBBP8	MUS81	PEB1	CDK5	EME2							
<b>I</b>		siCom1	ATR		MDC1	RAD1		RAD9A		HUS1					CHEK1										
<b>J</b>		siCom1	TP53BP1												CHEK2										
<b>K</b>		siCom1	TP53																						
<b>L</b>		siCom1	TP53																						
<b>M</b>		siCom1	TP53																						
<b>N</b>		siCom1	TP53																						
<b>O</b>		siCom1	TP53																						
<b>P</b>		siCom1	TP53																						
<b>A</b>		siCom1	TP53																						
<b>B</b>		siCom1	TP53																						
<b>C</b>		siCom1	TP53																						
<b>D</b>		siCom1	TP53																						
<b>E</b>		siCom1	TP53																						
<b>F</b>		siCom1	TP53																						
<b>G</b>		siCom1	TP53																						
<b>H</b>		siCom1	TP53																						
<b>I</b>		siCom1	TP53																						
<b>J</b>		siCom1	TP53																						
<b>K</b>		siCom1	TP53																						
<b>L</b>		siCom1	TP53																						
<b>M</b>		siCom1	TP53																						
<b>N</b>		siCom1	TP53																						
<b>O</b>		siCom1	TP53																						
<b>P</b>		siCom1	TP53																						

### 4.3. Análisis estadístico

Una vez obtenidos los valores de viabilidad celular (número de células/pocillo), se calculó el efecto de la droga (ED) para cada muestra, para eliminar el sesgo producido por el efecto intrínseco del siRNA sobre la viabilidad celular. Para ello, se restó el logaritmo en base 10 de la media de las tres réplicas para cada gen tratadas con droga al logaritmo en base 10 de la media de las tres réplicas no tratadas (control DMSO).

$$ED = \log_{10} \text{media}_i(X_i) - \log_{10} \text{media}_i(Y_i)$$

Donde  $X_i$  son las muestras tratadas con droga y  $Y_i$  son las muestras sin droga.

Con estos datos, se calculó la DAM (Desviación Absoluta Media) para cada concentración de fármaco en cada línea celular. La DAM es una medida de dispersión estadística. Es un estadístico robusto, siendo más resiliente a valores muy desviados del promedio en un conjunto de datos que la desviación estándar. Se calculó mediante la fórmula:

$$DAM = \text{mediana}_i (|X_i - \text{mediana}_j (X_j)|)$$

Donde DAM es la mediana de los valores absolutos de los residuales (desviaciones) respecto a la mediana de los datos.

Para utilizar DAM como un estimador consistente para la estimación de la desviación estándar ( $\sigma$ ), hay que multiplicar DAM por una constante  $K$ , siendo

$$\sigma = K \cdot DAM$$

Donde  $K$  es un factor constante que depende de la distribución.

Para distribuciones normales,  $K$  es  $1/\phi^{-1}(3/4) \approx 1.4826$ , donde  $\phi^{-1}$  es la inversa de la función de distribución acumulativa para la distribución normal estándar. Esto es porque DAM viene dado por:

$$\frac{1}{2} = P(|X - \mu| \leq \text{DAM}) = P\left(\left|\frac{X - \mu}{\sigma}\right| \leq \frac{\text{DAM}}{\sigma}\right) = P\left(|Z| \leq \frac{\text{DAM}}{\sigma}\right)$$

Por lo tanto,  $\Phi(\text{DAM}/\sigma) - \Phi(-\text{DAM}/\sigma) = 1/2$ . Como  $\Phi(-\text{DAM}/\sigma) = 1 - \Phi(\text{DAM}/\sigma)$ , sabemos que  $\text{DAM}/\sigma = \Phi^{-1}(3/4)$  de donde se obtiene el factor  $K = 1/\Phi^{-1}(3/4)$ . Luego,

$$\sigma = 1.4826 \text{ DAM}$$

En otras palabras, la expectativa de 1.4826 veces la DAM para muestras grandes de  $X_i$  con distribución normal es aproximadamente igual a la desviación estándar de la población.

Con este valor se pudo calcular, a continuación, el *z-score* o valor estándar para cada muestra, mediante la estandarización de esta. Este valor indica por cuántas desviaciones estándar una observación o dato está por encima o por debajo del promedio. El valor estándar de un dato  $x$  es:

$$Z = \frac{x - \mu}{\sigma}$$

Donde  $\mu$  es el promedio de la población y  $\sigma$  es la desviación estándar de la población.

Para elegir los genes de potencial interés (*hits*) como sensibilizadores o causantes de resistencia, se seleccionaron aquellos cuyo *z-score* fuera, al menos en dos de las tres concentraciones de droga estudiadas, menor que -1,7 pero mayor que -5 en el caso de genes sensibilizadores y por encima de 2 para aquellos genes cuya inhibición produjera resistencia al fármaco. Además, esos *z-score* significativos tenían que estar presentes tan solo en una de las líneas celulares, pero no en su pareada, donde el KD (*knock-down*) del gen no tenía que producir ningún efecto.



## 5. VALIDACIÓN *HITS* POTENCIALES

### 5.1. Curvas de viabilidad con siRNAs *pool*

Para aquellos RNAi que produjeron un efecto de interés, se repitió la transfección con siRNAs *pool* bajo las mismas condiciones y siguiendo el mismo protocolo descrito en el punto anterior, para asegurar la veracidad del resultado obtenido en el *screen*.

### 5.2. Curvas de viabilidad con oligos individuales

En los casos de aquellos siRNAs que fueron revalidados de manera positiva, se repitió la transfección esta vez utilizando los 4 oligos por separado que formaban el *pool* usado en el *screen*, siguiendo el mismo protocolo y condiciones utilizados en los experimentos anteriores. Para considerar que un siRNA estaba causando un efecto *on-target*, al menos 2 de los 4 oligos que formaban el *pool* tenían que reproducir el efecto deseado sobre el gen en cuestión.

## 6. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE PARP6

De los resultados obtenidos en un experimento de *arrays* de hibridación genómica comparada (aCGH) realizado previamente por nuestro grupo, en el que se comparaban muestras sensibles y resistentes a CDDP para identificar regiones cromosómicas amplificadas o delecionadas de manera diferencial, se seleccionó una región amplificada del cromosoma 15 donde se encuentra el gen de la familia de las poli (ADP ribosa) polimerasas (PARPs) *PARP6*, del que se ha hecho una caracterización funcional en el presente estudio. Esta amplificación estaba presente únicamente en tumores resistentes en 2 de las 4 muestras (50%) de tumores pareados estudiados.

## 6.1. Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas (293, 293T, HeLa, GCT27 y SuSa) se cultivaron en medio DMEM o RPMI suplementado con 10-20% de FBS y un 0,2% de Primocin, y fueron incubadas en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

## 6.2. Curvas de viabilidad celular

Para estudiar el efecto de la sobreexpresión del gen *PARP6* en la viabilidad celular, se utilizaron células 293 que contenían un plásmido estable de expresión de la proteína al ser inducido con doxiciclina. Como control de transfección, se usaron de manera paralela células portadoras de un plásmido con las mismas características, pero que expresaba la proteína GFP (*green fluorescent protein*).

Se sembraron 1.000 células/pocillo (293 con el plásmido de expresión para *GFP* o *PARP6*) en placas de 96 pocillos (5 placas) para hacer un *time course* de viabilidad celular. La primera placa se leyó, mediante CTG, el día de inicio del estudio sin ser inducida (control basal). El resto de placas fueron inducidas al principio del experimento y cada una fue leída con un día de diferencia a la misma hora.

## 6.3. Transfección con siRNAs

Con el objetivo de investigar el efecto de una bajada en los niveles de expresión de esta proteína en la viabilidad celular, se transfectaron células HeLa y las líneas de cáncer testicular GCT27 y SuSa S y R con diferentes siRNAs (Dharmacon y Qiagen) para bloquear la expresión de *PARP6*.

Día 0. Sembrar 1500 células/pocillo en 100 µl de medio DMEM o RPMI sin antibióticos en una placa de 96 pocillos.

Día 1. Transfección (*forward*):

1. Para cada pocillo utilizado, mezclar 0,25  $\mu\text{l}$  de lipofectamina 2000 o Dharmafect3, según la línea celular, con 15  $\mu\text{l}$  de OptiMEM e incubar durante 5 minutos.
2. Añadir 5  $\mu\text{l}$  de siRNA (2  $\mu\text{M}$ ), vortear contundentemente e incubar durante 25 minutos.
3. Adicionar 80  $\mu\text{l}$  de medio DMEM sin antibióticos y cambiar el medio de las células por esta mezcla de transfección.
4. Aproximadamente 6 horas después, cambiar la mezcla por medio fresco (ya que los reactivos para la transfección suelen ser tóxicos para las células).

Día 4. Leer los resultados según el método descrito anteriormente de CTG.

#### **6.4. Time lapse**

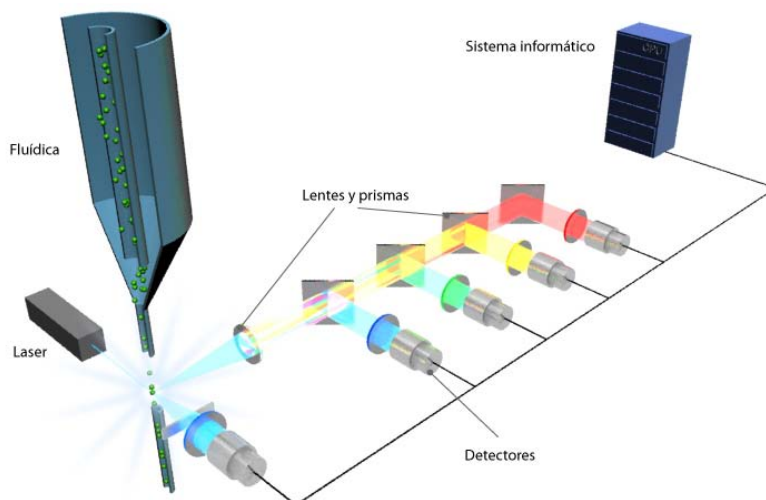
Grabación de células HeLa transfectadas con siRNA de *PARP6* durante 48 horas para estudiar la evolución morfológica y la viabilidad de las células con déficit de la proteína a tiempo real. El protocolo que se siguió fue el descrito a continuación.

1. Transfectar las células con siRNA según el método descrito en el punto anterior, pero en placas de 6 pocillos, con lo que el número inicial de células sembradas asciende, en este caso, a 90.000 cél/pocillo y las nuevas cantidades de reactivos son: 5  $\mu\text{l}$  de lipofectamina, 250  $\mu\text{l}$  de OptiMEM y 2,5  $\mu\text{l}$  de siRNA (20  $\mu\text{M}$ ), más 1,5 ml de medio sin antibióticos.
2. Después de 6 horas, añadir medio fresco DMEM sin fenol (Gibco).
3. 24 horas después, añadir medio nuevo y 1  $\mu\text{l/ml}$  de PI (ioduro de propidio, un agente intercalante en el DNA que marca células muertas, ya que no es capaz de traspasar la membrana celular en células viables).
4. Introducir las células en la cámara de incubación acoplada a un microscopio equipado con un aparato de grabación (Orca-R2, Olympus).

5. Durante las 48 horas siguientes, la cámara hizo una foto de cada pocillo de la placa cada 10 minutos. Posteriormente, las fotos se juntaron y reprodujeron de manera acelerada, adquiriendo la apariencia de un video dinámico.

### 6.5. Citometría de flujo

Esta técnica se emplea, entre otros, para el contaje celular, su separación en diferentes grupos, detección de biomarcadores, etc. Esto se consigue mediante la suspensión de las células en una corriente de líquido y el paso de este por un aparato de detección eléctrica. Permite un análisis simultáneo multiparamétrico de las características físicas y/o químicas de miles de partículas por segundo. El principio es la dirección de un haz de luz (normalmente láser) de una longitud de onda concreta hacia la corriente de líquido hidrodinámicamente focalizado. Diferentes detectores son dirigidos al punto por el cual la corriente de líquido pasa por el haz de luz: uno alineado con el haz (*Forward Scatter* o FSC), que da una idea del volumen de la célula; varios perpendiculares (*Side Scatter* o SSC), que informan sobre la complejidad interna de la partícula (por ejemplo, forma del núcleo, el número y tipo de gránulos citoplasmáticos o la aspereza de la membrana), y uno o varios detectores de fluorescencia. Esta combinación de luz dispersada y fluorescencia es recogida por los detectores y, mediante el análisis de fluctuaciones en el brillo en cada detector (uno por cada pico de emisión), es posible obtener diferentes tipos de información sobre las propiedades físicas y químicas de cada partícula analizada.



**Figura 15.-** Esquema del funcionamiento de un citómetro de flujo, donde se puede observar el paso de las células de forma individual por el punto en el que se encuentra el láser, cuya luz se difracta en varios haces con propiedades diferentes según el tipo de célula y la presencia de marcajes en esta. Estos rayos de luz son recogidos por varios detectores que envían la información al aparato que se encarga de procesarla.

En el presente estudio, la citometría de flujo permitió distinguir células en las diferentes fases del ciclo celular mediante la tinción de su DNA con un marcador fluorescente (PI), correlacionando así la intensidad de la fluorescencia emitida por las células en una longitud de onda concreta con la cantidad de DNA que contenían.

Para comprobar si existía algún efecto sobre el ciclo celular al sobreexpresar la proteína en estudio, células 293T fueron transfectadas con el plásmido de expresión transitoria de *GFP* (control) o *PARP6* y, posteriormente, fueron sincronizadas con nocodazol (Metil (5-[2-tienilcarbonil]-1H-bencimidazol-2-il)), un compuesto que detiene el ciclo en fase G2/M mediante su intervención en la polimerización de los microtúbulos. Una vez eliminada esta droga del medio de cultivo, se estudió la habilidad de progresar de manera normal a lo largo del ciclo celular fijando las células a diferentes puntos ( $t = 0, 4, 8, 18$  y  $24$  horas). El protocolo seguido se detalla a continuación:

- Transfección *forward* y sincronización:

1. Sembrar 100.000 células 293T/pocillo en placas de 6 pocillos (están listas para transfectar cuando alcanzan un 70-90% de confluencia).

2. Para cada placa, mezclar 40µl de reactivo de transfección (Lipofectamina 2000) con 1,5 ml de medio OptiMEM, vortear e incubar durante 5 minutos.
  3. Mientras tanto, preparar los falcon pertinentes con una mezcla de 24 µg de DNA plasmídico con 1,5 ml de OptiMEM. En este caso, uno de los falcon contenía el vector vacío (control negativo), otro un plásmido de expresión de *GFP* (control positivo de transfección) y un último falcon con el plásmido que contenía *PARP6*. Vortear de manera contundente para favorecer la formación de los complejos de transfección y dejar incubar durante 20 minutos a TA.
  4. Añadir 7 ml de medio sin antibióticos a la mezcla de transfección.
  5. Cambiar el medio en el que crecían las células por este nuevo medio de transfección.
  6. Cambiar por medio fresco aproximadamente 6 horas después.
  7. A las 48 horas, las células ya expresan niveles abundantes de la proteína exógena (lo cual se comprobó detectando los niveles de proteína GFP bajo un microscopio de fluorescencia), por lo cual se procede a tratar las células con nocodazol e incubar con la droga O/N (aprox. 16 horas).
  8. Cambiar el medio y dejar en el incubador hasta el momento de su fijación.
- Fijación de las células:
1. Recoger el medio en un falcon para cada condición del experimento, lavar las células con PBS, tripsinizar y añadirlas al falcon correspondiente.
  2. Centrifugar 5 minutos a 800 rpm a 4°C, eliminar sobrenadante (dejando unos 100 µl) y resuspender las células.
  3. Lavar con 7 ml de PBS frío.
  4. Repetir paso 2.
  5. Mientras se vortea el tubo, añadir 5 ml de etanol 70% frío (preparado en PBS) gota a gota. Guardar a -20°C.
- Tinción con PI:
1. Centrifugar las células a 800 rpm durante 5 minutos a 4°C y eliminar sobrenadante para deshacerse del etanol.

2. Lavar con PBS, centrifugar a 800 rpm durante 5 minutos a 4°C y eliminar sobrenadante, dejando 200 µl para resuspender las células (x2).
3. Añadir 500 µl de PI/RNasa A (Sigma) (480 µl de PBS, 20 µl de PI y 0,5 µl de RNasa A) por muestra e incubar a 37°C durante 30 minutos envuelto en papel de aluminio.
4. Lectura y análisis de las muestras en la máquina de citometría de flujo (LSR II, BD).

El experimento se realizó también transfectando células HeLa con siRNA de *PARP6* (siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.4.) y sincronizándolas posteriormente con nocodazol o afidicolina ((3*R*,4*R*,4*aR*,6*aS*,8*R*,9*R*,11*aS*,11*bS*)-4,9-bis(hidroximetil)-4,11b-dimetiltetradecahidro-8,11a-metanociclohepta[ $\sigma$ ]naphthalen-3,9-diol), que produce la parada del ciclo en el inicio de fase S por inhibición de las polimerasas  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ . El uso del segundo compuesto sincronizador fue para asegurarse que los resultados obtenidos no eran a causa del nocodazol, sino por un efecto de la infraexpresión del gen estudiado.

## 6.6. Extracción proteica

Las células se transfectaron con siRNAs según el protocolo habitual y, 72h después, se realizó la extracción proteica siguiendo el procedimiento descrito a continuación:

1. Tripsinizar las células y recuperarlas en falcon.
2. Centrifugar 5 minutos a 1.000 rpm a 4°C.
3. Lavar con PBS (x2).
4. Añadir 400 µl de tampón de lisis, vortear de manera contundente y dejar 15 minutos en rotación a 4°C.
5. Centrifugar a 4°C durante 10 minutos a 15.000 rpm y recuperar la fracción soluble.

- Tampón de lisis (350 mM):
  - 50 mM Tris pH 8.0
  - 5 mM EDTA pH 8.0
  - 350 mM NaCl
  - 0,5% IGEPAL CA-630 100x
  - 10% Glicerol
  - H<sub>2</sub>O destilada
  
- Justo antes de usar, añadir:
  - Cóctel inhibidores de proteasas (Complete Mini, Roche)
  - Pastilla inhibidores de fosfatasas (PhoSTOP, Roche)
  - 1 mM DTT
  - 1 mM PMSF

La cuantificación de proteínas se realizó con el kit colorimétrico *Bio-Rad Protein Assay* (BioRad), basado en el método de *Bradford*, siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de proteína se extrapoló a partir de los valores de una recta patrón obtenida utilizando concentraciones conocidas de la proteína albúmina de suero bovino (BSA).

### 6.7. Western Blot

La electroforesis de las proteínas se realizó en geles de poliacrilamida con SDS (dodecil sulfato sódico). Esta técnica nos permite separar las proteínas desnaturalizadas según su peso molecular y su posterior detección usando anticuerpos específicos.

Los geles constaban de una parte superior llamada gel concentrador o *stacking* con un porcentaje de acrilamida del 3,6 % (composición: 3,6 % acrilamida, tampón *upper* 1x (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 0'1% SDS), 0'25% TEMED (N, N, N', N',-tetra-metiletilen-diamina), 0'13% APS (persulfato amónico)); y una parte inferior llamada gel separador o *resolving* con un porcentaje entre 8-15% (8-15% acrilamida, tampón *lower* 1x (375mM



Tris Base pH 8.8, 0'1% SDS), 0'14% TEMED, 0'065% APS). El gel concentrador permite la alineación de las proteínas y, a continuación, el gel separador permite la separación de las mismas en función de su peso molecular. Una vez preparados los geles, el procedimiento realizado era el siguiente:

- Preparación de las muestras:

1. Diluir 30 µg de muestra en tampón de carga para proteínas 1x (2% SDS, 0'5 mg/ml DTT, 10% glicerol, 0'1 mg/ml de azul de bromofenol).
2. Desnaturalizar las muestras 5 minutos a 95°C.

- Electroforesis:

3. Montar el gel en la cubeta, añadir el tampón de electroforesis para Western Blot (WB) (25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM glicina, 0'1% SDS) y cargar las muestras.
4. Realizar la electroforesis a 120 V durante 1-2 horas.

- Transferencia:

5. Activar las membranas *Immobilon-P* (Millipore) con metanol durante 1 minuto y lavar con agua destilada.
6. Montar la transferencia en la cubeta y añadir el tampón de transferencia (25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM Glicina, 0'02% SDS y 20% Metanol).
7. Transferir a 130 V durante 1 hora a 4°C.

- Inmunodetección:

8. Incubar 1 hora a TA y en agitación con la solución de bloqueo TBS 1x (20 mM Tris-HCl y 150 mM NaCl pH 7.4) con un 5 % de leche o 3% de BSA.
9. Incubar O/N a 4°C con los anticuerpos primarios diluidos en TBS-T 1x (TBS 1x suplementado con 0,1 % de tritón) con un 1% de leche o BSA. Los anticuerpos usados fueron:
  - Anti-pRB (anticuerpo policlonal de conejo, dil. 1/500, Abcam).
  - Anti-CiclinaD1 (ratón policlonal, 1/500, Cell Signalling).
  - Anti-p53 (ratón monoclonal, 1/1.000, Santa Cruz Biotechnology).
  - Anti-p21 (conejo policlonal, 1/1.000, Cell Signalling).

- Anti-actina (cabra policlonal, 1/5.000, Santa Cruz Biotech). Este anticuerpo estaba conjugado con HRP (*horseradish peroxidase-linked*), por lo cual no fue necesaria la incubación con anticuerpo secundario.
10. Hacer 3 lavados de 10 minutos con TBS-T 1x.
  11. Incubar con el anticuerpo secundario correspondiente diluido 1/5.000 en TBS-T con un 1% de leche o BSA:
    - Anti-ratón producido en cabra conjugado con HRP (Amersham Biosciences).
    - Anti-conejo producido en cabra conjugado con HRP (Amersham Biosciences).
  12. Realizar 3 lavados de 10 minutos con TBS-T 1x.
  13. Revelar con el sistema de detección por quimioluminiscencia *ECL western blotting detection reagents and analysis system* (Amersham Bioscience) y con películas fotográficas *Hyperfilm* (Amersham Biosciences).

### 6.8. Inmunofluorescencia para $\gamma$ -H2AX

Con el fin de evaluar la capacidad de reparación de las células (HeLa) con KD de *PARP6*, estas fueron sembradas encima de pequeños cubreobjetos circulares dentro de placas de 6 pocillos con una densidad de 100.000 células/pocillo, transfectadas según el protocolo descrito, irradiadas con 5 Gray (Gy) de rayos X (radiación ionizante que produce roturas en las cadenas del DNA), devueltas al incubador y fijadas a diferentes tiempos (t= 1, 6, 18, 24 y 48 horas). Posteriormente se realizó inmunofluorescencia (IF), técnica de inmunomarcación que hace uso de anticuerpos unidos químicamente a una sustancia fluorescente para demostrar la presencia de una determinada molécula, utilizando un anticuerpo anti- $\gamma$ -H2AX para evaluar la evolución de los focos de daño y reparación de estos en el DNA. Como control positivo, se transfectaron células con siRNA para *BRCA2*, ya que las células deficientes en esta proteína tienen problemas para reparar las roturas de doble cadena en el DNA producidas por la radiación ionizante.

- Fijación:

1. Lavar las células con PBS.
2. Fijación con paraformaldehído (PFA) en PBS al 4% durante 1 hora a TA.

- Inmunodetección:

1. Lavar las células con PBS (x3).
2. Permeabilización con Tritón x100 al 0,2% en PBS entre 20 y 30 minutos a TA.
3. Repetir paso 1 (x3).
4. Bloquear con IFF (1% de BSA y 2% de FBS en PBS) durante 30 minutos a TA.
5. Cubrir con 100  $\mu$ l de anticuerpo primario anti- $\gamma$ -H2AX (conejo monoclonal, 1/1.000 diluido en IFF, Cell Signalling) y anti- $\beta$ -tubulina (ratón monoclonal, dil. 1/5.000, Sigma) e incubar O/N a 4°C en una cámara húmeda.
6. Repetir paso 1 (x3).
7. Incubar las células en 50  $\mu$ l de anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con el fluorocromo Alexa 488 (verde) y anti-ratón conjugado con el fluorocromo Alexa 555 (rojo) (Invitrogen) diluidos 1/1.000 en IFF, durante 40 minutos a TA y a oscuras.
8. Lavar con PBS (x2) y dejar 10 minutos con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) diluido 1/10.000 en PBS a oscuras.
9. Montar los cubres sobre un portaobjetos con 4  $\mu$ l de *Vectashield* (Vector Laboratories).
10. Evaluar las preparaciones mediante un microscopio confocal (Leica TCS SP2).

Para el análisis, se tomaron fotos con una cámara (Leica) acoplada a un microscopio (Leica) y se contabilizó el número de células positivas para focos de daño o reparación en el DNA en 150 núcleos por condición.

## **ESTUDIO DE LA ADQUISICIÓN DE RESISTENCIA *IN VIVO***

### **1. GENERACIÓN *IN VIVO* DE TUMORES RESISTENTES AL CDDP**

#### **1.1. Recogida y procesado de muestras**

Muestras en fresco de TCGTs humanos fueron obtenidas después de practicar orquiectomía radical en el Hospital Universitario de Bellvitge y la Fundación Puigvert de Barcelona entre 2001 y 2011. Todos los pacientes fueron informados y dieron su consentimiento por escrito autorizando el uso de su material biológico en el estudio. Todas las muestras procedían de tumores sin exposición previa a la quimioterapia (QT) en el momento de su obtención, menos en el caso de los 3 tumores refractarios endógenos.

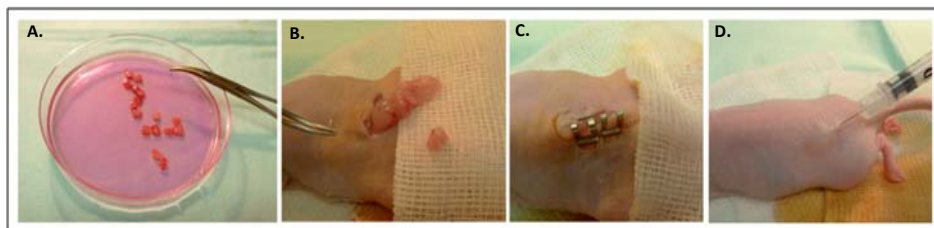
Las muestras fueron recogidas en medio DMEM enriquecido con 10% de FBS y con un 2% de Penicilina/Estreptomicina (Gibco).

A la vez, un fragmento representativo de la pieza tumoral fue fijado en formaldehído e incluido en parafina para su posterior análisis histológico, y otro fue criopreservado a -80°C para posteriores estudios moleculares.

#### **1.2. Implantación ortotópica**

Ratones machos *Swiss nu/nu* (Charles River) de 4-6 semanas (18-22 g) mantenidos en un entorno estéril (SPF, del inglés *specific pathogen free*) fueron utilizados para la implantación tumoral. Tras anestesiar los ratones mediante inhalación de isofluorano, se les practicaba una laparotomía media para exteriorizar los testículos y una pieza de tumor primario de 4x4 mm aproximadamente era implantada de manera ortotópica en ambos testículos. Los fragmentos tumorales eran adheridos a la superficie testicular con suturas de prolene 7.0. A continuación, los testículos se reintroducían en la cavidad peritoneal, se ponían 5 gotas de suero fisiológico en la cavidad para facilitar la

rehidratación del animal durante el postoperatorio y las paredes de esta eran unidas de nuevo con grapas de 9 mm (Becton-Dickinson), que se retiraban a los 10-15 días. Una vez finalizada la operación, el animal se dejaba reposar sobre una gasa estéril y se colocaba una lámpara cerca de la jaula para darle calor hasta que se despertaba. Además, se administraban 5 mg/kg del analgésico meloxicam mediante inyección subcutánea. Esta operación se volvía a repetir los dos días siguientes a la intervención para minimizar las molestias del animal. Tras la implantación, los animales eran revisados dos veces por semana y sacrificados a los 6-8 meses si no se objetivaba crecimiento tumoral. Durante todo el proceso, se les controlaba el peso y estado general siguiendo las recomendaciones del Comité Ético de Experimentación Animal del IDIBELL (Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge). Una vez se palpaba masa abdominal o crecimiento en el escroto se procedía al sacrificio del ratón y reimplantación en 3 a 5 animales nuevos (en función de la velocidad de crecimiento y tasa de éxito de implantación del tumor) siguiendo el mismo protocolo. Todos los experimentos se realizaron siguiendo el procedimiento número 3880 de Alberto Villanueva, aprobado por la Generalitat de Catalunya.



**Figura 16.-** Imágenes ilustrativas del proceso de implantación ortotópica de los tumores primarios en los ratones. A) Fragmentos uniformes del tumor primario en medio DMEM con 10% FBS y P/E, B) realización de una incisión laparotómica en el animal anestesiado y externalización de los testículos del ratón, donde se suturaba un fragmento de tumor, C) una vez implantados los dos fragmentos se cerraba la incisión con dos o tres grapas de 9mm, D) administración subcutánea de meloxicam 5 mg/kg al finalizar la operación.

Los especímenes perpetuados representan y reproducen la histología del tumor primario, así como sus características genéticas y epigenéticas a la vez que se mantienen estables a lo largo de los pases estudiados. La caracterización anatomopatológica, genética y epigenética, así como los patrones de diseminación fueron el foco de la tesis

doctoral de August Vidal, trabajador del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Bellvitge.

El material tumoral obtenido después del sacrificio de los animales se procesaba inmediatamente: un fragmento era incluido en parafina, previa fijación en formaldehído y se enviaba al servicio de Anatomía Patológica donde el patólogo confirmaba el tipo histológico; otra parte era troceada y criopreservada en nitrógeno líquido con FBS y un 10% de DMSO, lo cual permitía volverlo a implantar en cualquier momento en nuevos ratones atímicos. El resto del tumor se congelaba de manera convencional a -80°C para posteriores estudios moleculares.

### **1.3. Tratamiento con dosis crecientes de fármaco**

Después de comprobar en un experimento previo realizado por nuestro grupo que los tumores implantados eran sensibles a la QT, estos fueron reimplantados en nuevos ratones con el fin de generar tumores resistentes *in vivo* mediante exposiciones repetidas a CDDP, pasando el tumor a un nuevo ratón una vez que este había recrecido tras tres exposiciones secuenciales a la droga, y aumentado la dosis de fármaco entre pases. Así, los tumores iban adquiriendo resistencia al fármaco de manera progresiva. Las características de las muestras utilizadas en este experimento están listadas en la **tabla 9**. Estos tumores nunca habían sido expuestos a CDDP en el paciente de origen (menos en los casos de los 3 tumores refractarios endógenos, cuyas muestras procedían de masas tumorales recrecidas en los pacientes después del tratamiento inicial), y demostraron ser sensibles tanto en este como en los animales.

**Tabla 9.-** Lista de los tumores perpetuados de los que se han generado derivados resistentes. En el caso de TGT17, TGT44 y TGT49, los pacientes no respondieron a la QT, con lo que se los consideró tumores con resistencia *de novo*.

Localización tumor primario	Tumor	Histología primario	Histología xenoinjerto	Presentación clínica*	Exposición previa a CDDP
Testículo	TGT1	TSE	TSE	Estadio 1	No
	TGT12	CE	CE	Buen pronóstico	No
	TGT17	Chr	Chr	Refractario	Sí
	TGT21B	TSE, CE, Ter, Chr, SE	TSE, CE, Ter, Chr	Estadio 1	No
	TGT34	Ter, CE	CE	Mal pronóstico	No
	TGT38	Chr	Chr	Mal pronóstico	No
	TGT44	TSE, Ter	TSE, Ter	Refractario	Sí
	TGT47	TSE, Ter	TSE	Mal pronóstico	No
	TGT49	Chr	Chr	Refractario	Sí

\* Clasificación pronóstica de la IGCCCG.

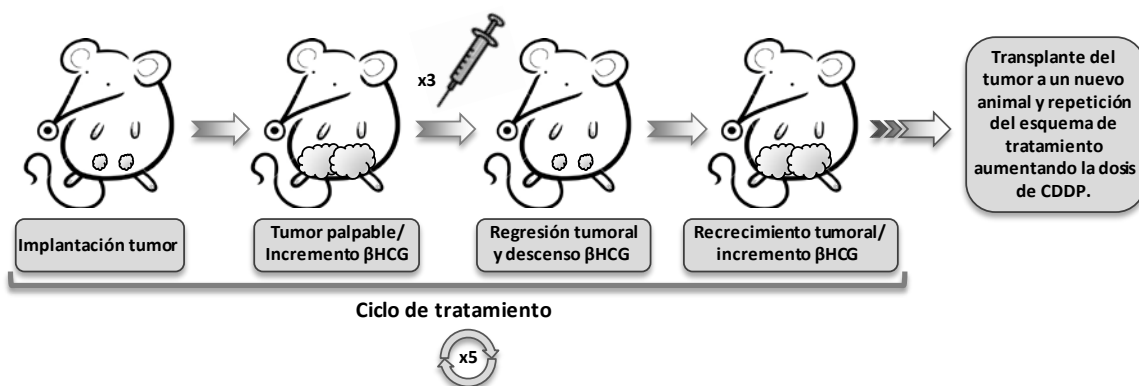
TSE: Tumor del Seno Endodérmico; CE: Carcinoma Embrionario; Ter: Teratoma; Chr: Coriocarcinoma; SE: Seminoma.

Los tumores fueron implantados en ambos testículos de la misma forma descrita en el apartado 1.2. de este bloque. En el momento en que se palpaba una masa abdominal, el animal recibía una dosis de 2mg/Kg de CDDP intraperitoneal (i.p.) por triplicado (cuya separación temporal venía determinada por la velocidad de recrecimiento del tumor). Si no existía recrecimiento después de la primera dosis, se volvía a empezar el experimento con nuevos animales y una dosis inicial inferior (1 mg/kg). Una vez recrecida la masa después de la tercera dosis de tratamiento, el tumor era trasplantado a un nuevo grupo de animales y se repetía el proceso incrementando la dosis administrada. El esquema de los ciclos de tratamiento y del incremento de dosis es el descrito en la **tabla 10** y la **figura 17**. A partir de la dosis de 3,5 mg/kg, los animales empezaron a mostrar signos de toxicidad, por lo que se empezaron a administrar inyecciones subcutáneas de 500 µl de suero glucosado 5% los cuatro días posteriores a la administración de la droga. Para monitorizar el crecimiento tumoral, además de controlar el peso de los animales dos veces por semana, se les extrajo sangre una vez por semana para determinar los

marcadores séricos  $\beta$ -gonadotropina coriónica humana ( $\beta$ -HCG) y  $\alpha$ -fetoproteína (AFP) como se detalla en el apartado siguiente.

**Tabla 10.-** Dosis de fármaco utilizadas en los ciclos secuenciales de tratamiento.

Ciclo de tratamiento	1	2	3	4	5
Dosis CDDP (x3)	2 mg/kg	3 mg/kg	3.5 mg/kg	4 mg/kg	5 mg/kg



**Figura 17.-** Esquema del tratamiento de los animales para conseguir tumores resistentes a CDDP.

### 1.4. Determinación sérica de $\beta$ -HCG y AFP

Para evaluar la progresión de los tumores implantados, los animales fueron pesados dos veces por semana. Sin embargo, el peso no siempre está directamente relacionado con el crecimiento de los tumores, ya que en ocasiones, sobretodo en estadios avanzados, los animales pierden peso debido a la agresividad de los tumores implantados. Por este motivo, se monitorizaron las concentraciones séricas de AFP y  $\beta$ -HCG. Para ello, se extrajo sangre de la cola de los animales una vez por semana. La sangre se recogía en tubos sin heparina para que se produjese la coagulación, y se centrifugaba durante 10 minutos a 13.200 rpm para separar el suero, que se guardaba en eppendorfs normales a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesado. Para determinar las concentraciones de estos



marcadores se utilizaron *kits* comerciales quimioluminimétricos y el analizador *Immulite 2000* (Siemens). Para detectar AFP se hizo uso de un microgranulado cubierto por anticuerpos monoclonales murinos anti-AFP humana, y fosfatasa alcalina conjugada con un anticuerpo policlonal anti-AFP de conejo. En la determinación de  $\beta$ -HCG se utilizó un microgranulado recubierto de anticuerpo monoclonal murino anti- $\beta$ -HCG, y fosfatasa alcalina conjugada con un anticuerpo policlonal ovino anti- $\beta$ -HCG. La sensibilidad de la técnica es de 0,2 KU/l y 0,4 KU/l para AFP y  $\beta$ -HCG respectivamente. Los valores de referencia para normalidad son de <10 mIU/L para AFP y <5 IU/L para  $\beta$ -HCG en sujetos varones sanos. El suero de ratones atímicos mostró niveles indetectables para ambos marcadores en situación de ausencia de implante tumoral.

## 2. NGS DE TUMORES SENSIBLES/RESISTENTES A CDDP

Este estudio se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo experimental y análisis informático que el detallado en el apartado 3 del primer bloque de materiales y métodos, en la unidad de NGS del ICR, en Londres. Sin embargo, en este caso, en vez de comparar el DNA genómico de una línea celular pareada, se utilizaron muestras de tumor primario y tejido obtenido de los xenoinjertos generados a partir de este, en los que dichos tumores fueron tratados con CDDP hasta obtener derivados resistentes (protocolo descrito en el apartado “Generación in vivo de tumores resistentes”). Para cada tumor, se comparó tejido normal del paciente (si estaba disponible), con el tumor primario y sus derivados xenoinjertados. En total, se trataba de 9 casos, de los cuales 6 eran pacientes sensibles a QT, con lo que la generación de los derivados resistentes se realizó en ratones, y los 3 restantes presentaban resistencia endógena o *de novo* en el momento de tratar a los enfermos. Las características de las muestras se detallan en la **tabla 11**.

**Tabla 11.-** Relación de los casos y sus respectivas muestras utilizadas en el estudio mutacional por NGS.

Caso	Muestra	Descripción	Resistencia a CDDP
<b>1</b>	TGT21 N	Tejido normal	No
	TGT21 Tp	Tumor primario	No
	TGT21 AX*	Xeno A	No
	TGT21 BX	Xeno B	No
	TGT21 BX-QT#5	Xeno B ciclo 5 QT	Si
<b>2</b>	TGT12 N	Tejido normal	No
	TGT12 Tp	Tumor primario	No
	TGT12 X	Xeno	No
	TGT12 X-QT#4	Xeno ciclo 4 QT	Si
<b>3</b>	TGT1 N	Tejido normal	No
	TGT1 Tp	Tumor primario	No
	TGT1 X	Xeno	No
	TGT1 X-QT#4	Xeno ciclo 4 QT	Si
<b>4</b>	TGT17 Tp	Tumor primario	Paciente resistente endógeno
	TGT17 X	Xeno	Si
<b>5</b>	TGT44 Tp	Tumor primario	Paciente resistente endógeno
	TGT44 X	Xeno	Si
	TGT 44 X-QT#3	Xeno ciclo 3 QT	Si
<b>6</b>	TGT47 N	Tejido normal	No
	TGT47 Tp	Tumor primario	No
	TGT47 X	Xeno	No
	TGT47 X-QT#4	Xeno ciclo 4 QT	Si
<b>7</b>	TGT49 X	Xeno	Paciente resistente endógeno
<b>8</b>	TGT38 X	Xeno	No
	TGT38 X-QT#5	Xeno ciclo 5 QT	Si
<b>9</b>	TGT34 N	Tejido normal	No
	TGT34 Tp	Tumor primario	No
	TGT34 X	Xeno	No
	TGT34 X-QT#4	Xeno ciclo 4 QT	Si

\* En el caso 1, a partir del tumor primario se generaron 2 modelos tumorales independientes (TGT21AX y TGT21BX). El tumor A se diferenció a teratoma maduro al tratarlo con CDDP, por lo que no recreó en ratones y no se pudo generar modelo resistente. N: tejido normal, Tp: tumor primario, X: xenoinjerto, QT#: ciclos de QT recibidos.

A la hora de analizar los resultados, el patrón seguido en cuanto a programas y pasos es el mismo que el detallado en la NGS de las células SuSa (apartado 3.4 del primer bloque), pero en este caso, había más factores a tener en cuenta para seleccionar las mutaciones candidatas. Primeramente, para que una mutación fuera considerada de potencial interés en el proceso de adquisición de resistencia, tenía que estar presente en alguno de los tumores que no respondían a la QT y ausente en el tumor sensible a CDDP de ese mismo paciente, o ser mutaciones presentes en el tumor primario sensible y revertidas en la muestra resistente pareada. Sin embargo, en el caso de que la mutación se encontrara en el tumor sensible y resistente, también se consideró como potencialmente representativa siempre y cuando la diferencia mínima en la frecuencia de presencia de la mutación entre ambos tumores fuera, al menos, de 5 veces. Cualquier mutación presente en tejido normal se definió como mutación germinal y fue excluida del análisis. Además, la frecuencia de presencia del alelo alternativo tenía que ser superior al 15% en el DNA del tumor.

# EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LA TERAPIA COMBINADA CDDP+PARPi

## 1. ESTUDIOS *IN VITRO*

Para la realización de este apartado, se utilizaron las líneas celulares pareadas SuSa y GCT27 S y R.

### 1.1. Ensayos de viabilidad celular

La evaluación del efecto del tratamiento combinado *in vitro* se realizó mediante experimentos de corta (1 semana) y larga duración (2 semanas, también conocido como ensayo de formación de colonias). Primeramente, se estudió el efecto del inhibidor de PARPs (PARPi) olaparib (LC Laboratories) en monoterapia en un rango de concentraciones entre 10  $\mu$ M y 0,1 nM en las líneas celulares GCT27 y SuSa S y R a CDDP. A continuación, se eligió una concentración del fármaco que tuviera un efecto moderado sobre la viabilidad celular (100 nM) para el estudio en combinación con CDDP en un rango de 10 $\mu$ M a 0,1 nM. En el caso del tratamiento combinado, las células fueron pretratadas durante 24 horas con olaparib antes de añadir las concentraciones pertinentes de CDDP al medio con el fármaco.

Para la preparación del olaparib, tal y como se ha descrito para el CDDP, el polvo comercial fue disuelto en DMSO puro para obtener un *stock* con una concentración de 10 mM y, a partir de este, las concentraciones deseadas se realizaron diluyendo la droga en el medio de cultivo.

#### 1.1.1. Ensayos de corta duración

El protocolo que se utilizó es el mismo que el descrito para estudiar el efecto del CDDP en la viabilidad de estas líneas celulares (apartado 2 del primer bloque de materiales y métodos). En este caso, sin embargo, el día 0 las células se sembraban por la

mañana y, a última hora de la tarde, se les añadía el olaparib. El resto del procedimiento era exactamente igual.

### 1.1.2. Ensayos de formación de colonias

1. Sembrar 3.000 cél./pocillo en placas de 6 pocillos.
2. 8 horas después, añadir el olaparib (100 nM) al medio de cultivo.
3. 16 horas después, tratar con las concentraciones pertinentes de CDDP (rango comprendido entre 10  $\mu$ M y 0,1 nM).
4. Repetir el tratamiento dos veces por semana.
5. A los 14 días del inicio del tratamiento, fijar y teñir las colonias de células mediante el método de SRB (*sulforhodamine-B assay*).

- SRB:

1. Fijar las células mediante la adición de 1 ml de TCA (ácido tricloroacético) frío al 10% en cada pocillo e incubar 1 hora a 4°C.
2. Lavar las placas con agua del grifo (x4) y dejar secar.
3. Teñir las células con 1 ml de SRB 0,057% durante 10 minutos a TA.
4. Lavar las placas en ácido acético al 1% (x4) y dejar secar.
5. Solubilizar el marcaje añadiendo 2 ml de solución TRIS-base 10 mM (pH 10.5) en cada pocillo, agitar manualmente y dejar 5 minutos a TA.
6. Transferir 200  $\mu$ l de cada pocillo a una placa de 96 (por cuadruplicado) y medir la densidad óptica a 490 nm.

## 1.2. Inmunofluorescencia para $\gamma$ -H2AX y RAD51

Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos a una densidad de 250.000 cél/pocillo en el caso de las SuSa S y 150.000 cél/pocillo en el caso de las R. Ocho horas después, se añadió olaparib (10  $\mu$ M) al medio y las células fueron incubadas con la droga durante 24 horas, o con la combinación de CDDP (10  $\mu$ M) y olaparib (10  $\mu$ M), en cuyo caso se añadía olaparib al medio de cultivo de las células y, 22 horas después, se les

añadía el CDDP y se las dejaba 2 horas más con ambas drogas en el medio. A continuación, se cambiaba el medio y se procedía a la fijación de las células a los tiempos correspondientes y a la IF, siguiendo el mismo protocolo que el apartado 6.8 de la caracterización de *PARP6*.

### **1.3. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo**

Se sembraron células sensibles y resistentes en placas de 10 cm (600.000 células/placa para SuSa S y 400.000 células/placa para las R) y, 24 horas después, se les añadió CDDP (1  $\mu$ M). En el caso del tratamiento combinado, 8 horas después de sembrar las células, se les añadió olaparib (1  $\mu$ M), y el CDDP (1  $\mu$ M) se añadió 16 horas después de la adición del primer fármaco. A partir de aquí, se inició un *time-course* en el que las células fueron fijadas a tiempos: 24, 48, 72 y 96 horas a partir del momento de adición del CDDP.

El proceso de fijación, tinción de las células con PI y lectura de las muestras fue el mismo que el descrito en el apartado 6.5 de la caracterización de *PARP6*.

## **2. TERAPIA COMBINADA *IN VIVO***

### **2.1. Fármacos**

CDDP (Ferrer-Farma): en el caso de los experimentos con ratones, la droga utilizada era la misma que la que se administra a los pacientes. La concentración del preparado comercial era 1 mg/ml y la dilución necesaria para pinchar a los animales se preparaba justo antes de su inyección. Para obtener la concentración requerida, se utilizaba suero salino como diluyente.

Olaparib (LC Laboratories): el polvo comercial fue disuelto en DMSO puro a una concentración de 50 mg/ml y guardado en alícuotas de un solo uso (evitando así un

descenso en la actividad del principio activo debido a los ciclos de congelación/descongelación del fármaco). Cada día, justo antes de su utilización, el preparado stock se diluía con PBS + 10% de ciclodextrina (oligosacárido cíclico formado por 6 moléculas de glucosa, que ayuda a solubilizar y hacer más estable la droga) a una concentración final de 50 mg/kg.

## 2.2. Esquema de tratamiento de los animales

Para el estudio de la eficacia de la combinación de fármacos, animales con tumores resistentes al CDDP implantados ortotópicamente fueron tratados con CDDP, Olaparib o la combinación de ambas drogas.

Primeramente, se implantaron los tumores en los testículos de los ratones tal y como se ha descrito en el apartado 1.2 del bloque de estudio de la adquisición de resistencia *in vivo*. Para este experimento se utilizaron 3 tumores refractarios a CDDP: TGT1 (tumor del seno endodérmico puro, resistencia adquirida en el laboratorio), TGT44 (tumor mixto con componente teratoma y tumor del seno endodérmico, resistencia *de novo*) y TGT49 (coriocarcinoma puro, resistencia *de novo*). Una vez se objetivaron masas palpables, los animales se randomizaron en los siguientes grupos: CDDP, olaparib, CDDP + olaparib y control (n= 6-9 animales por grupo). El tratamiento, con una duración de 28 días, consistía en la inyección de las drogas por vía i.p. En el caso del CDDP, los ratones eran tratados una vez por semana con una dosis de 3 mg/kg. El grupo de olaparib recibía una dosis diaria de fármaco de 50 mg/kg. Los animales con tratamiento combinado eran pinchados cada día con olaparib y, un día a la semana, con CDDP (una hora después de la inyección del PARPi). Además, a los animales que recibían olaparib se les dejaba 2 días de descanso cada 5 días de administración para reducir posibles toxicidades derivadas del tratamiento. Los animales control recibieron inyecciones i.p. de suero salino.

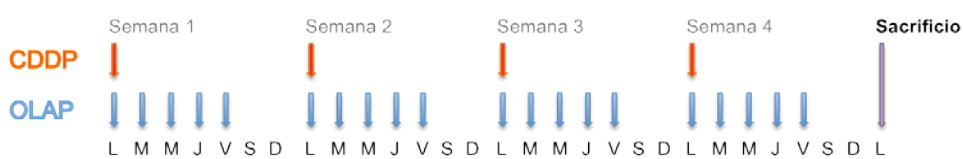


Figura 18.- Esquema de tratamiento de los animales. Olap: olaparib

Los animales fueron monitorizados cada día para comprobar su estado general. Además, eran pesados 3 veces por semana y se les extraía sangre de la cola 1 vez por semana para estudiar la evolución de los marcadores séricos AFP y  $\beta$ -HCG. Una vez terminado el tratamiento, los animales fueron sacrificados y se recogió sangre y muestra del tumor. Parte de la muestra fue criopreservada en nitrógeno líquido, otra fijada con formaldehído e incluida en parafina y una última congelada a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior estudio a nivel molecular.

### 2.3. Tinción hematoxilina-eosina

Con el uso de esta metodología se estudió la apariencia histológica así como la presencia de tejido necrótico en las masas residuales de tumor presentes al terminar el tratamiento.

Estos análisis se realizaron con muestras tumorales obtenidas tras la cirugía de los ratones, fijadas con formol, e incluidas en parafina. Los tejidos parafinados fueron cortados en secciones de  $3\ \mu\text{m}$  y dispuestos sobre portaobjetos DAKO y se dejaron secar a  $37^{\circ}\text{C}$  O/N. Una vez secas las laminillas, fueron completamente recubiertas con parafina para proteger los antígenos del tejido y, preservarlos hasta el momento del análisis.

El protocolo seguido para la hematoxilina-eosina (H&E) fue el siguiente:

1. Incubación durante 30-45 minutos a  $80^{\circ}\text{C}$  para eliminar la mayor cantidad posible de parafina (este paso es necesario por el doble parafinado de las laminillas).
2. Desparafinado usando una batería de 4 xiloles, dejando 10 minutos en cada xilol.
3. Hidratación usando una batería de etanoles y  $\text{H}_2\text{O}$ d:
  - 3 x 5 minutos en etanol absoluto
  - 3 x 5 minutos en etanol  $96^{\circ}$
  - 5 minutos en etanol  $70^{\circ}$
  - 5 minutos en etanol  $50^{\circ}$
  - 5 minutos en agua destilada



4. Tinción de 10 minutos con una solución de hematoxilina de Harris (Merck) previamente filtrada.
5. Lavado con agua del grifo y doble viraje con HCl al 1% y agua amoniacal. Entre los dos virajes realizar un breve lavado con agua de grifo.
6. Tinción de 30 segundos con una solución de eosina (Merck) al 25% en etanol 80°.
7. Deshidratación con una batería rápida de:
  - 1 minuto en etanol 70°
  - 3 x 1 minuto en etanol 96°
  - 3 x 1 minuto en etanoles absolutos
  - 4 x 3 minutos
  - en xilol
8. Montaje con DPX (resina acrílica con base de xileno) y observación en un microscopio óptico.

## **2.4. Inmunohistoquímica Ki67**

Una vez asegurada la presencia de tejido tumoral se llevó a cabo la inmunohistoquímica (IHQ) para Ki67. Los cortes se desparafinaron e hidrataron siguiendo el mismo protocolo utilizado para la tinción con H&E. A continuación, los pasos que se siguieron fueron:

1. Recuperación del antígeno de los tejidos con tampón citrato sódico 1x pH 6 en la olla a presión durante 5 minutos. Dejar enfriar las muestras a TA 20 minutos.
2. Realizar 1 lavado de 5 minutos con PBS.
3. Inhibición de la actividad peroxidasa endógena con una solución de agua oxigenada al 3% en agua destilada durante 5 minutos.
4. Realizar 1 lavado de 5 minutos con agua destilada y 2 lavados de 5 minutos con el tampón 1x PBS-100x Triton (PBS-T).
5. Bloqueo de las uniones inespecíficas incubando con suero de cabra en una dilución 1:10 en PBS-T 1x (solución de bloqueo) durante 2 horas a TA en una cámara húmeda.

6. Incubación con el anticuerpo primario anti-Ki67 (clon MIB-1, DAKO) con una dilución 1:50 en solución de bloqueo en cámara húmeda a 4°C O/N.
7. Realizar 3 lavados de 5 minutos con PBS-T 1x.
8. Incubación con el anticuerpo secundario *EnVison anti-mouse* (DAKO) durante 30 minutos a TA en cámara húmeda.
9. Realizar 3 lavados de 5 minutos con PBS-T 1x.
10. Revelado con el cromógeno DAB (3-3'Diaminobenzidina, DAKO).
11. Realizar 1 lavado de 5 minutos con agua destilada, seguido de un lavado breve con agua del grifo.
12. Contraintinción con hematoxilina diluida y filtrada durante 5-10 segundos y lavado con abundante agua del grifo.
13. Deshidratación y montaje de las preparaciones (ver puntos 7 y 8 del protocolo H&E).

Cada experimento incluía dos controles positivos, consistentes en un corte de un tejido en el cual se hubiera demostrado anteriormente la alta expresión de la proteína estudiada (en este caso amígdala), así como una muestra de tumor testicular realizada en un experimento anterior para asegurarse de que cada experimento se había realizado de la misma forma y se obtenían niveles comparables de marcaje; y un control negativo, que consistía en una laminilla a la que no se le había añadido anticuerpo primario.

Los resultados fueron analizados por el patólogo, que evaluó el número de células positivas para Ki67 en las zonas del tumor con mayor actividad, a 400x en el microscopio óptico.

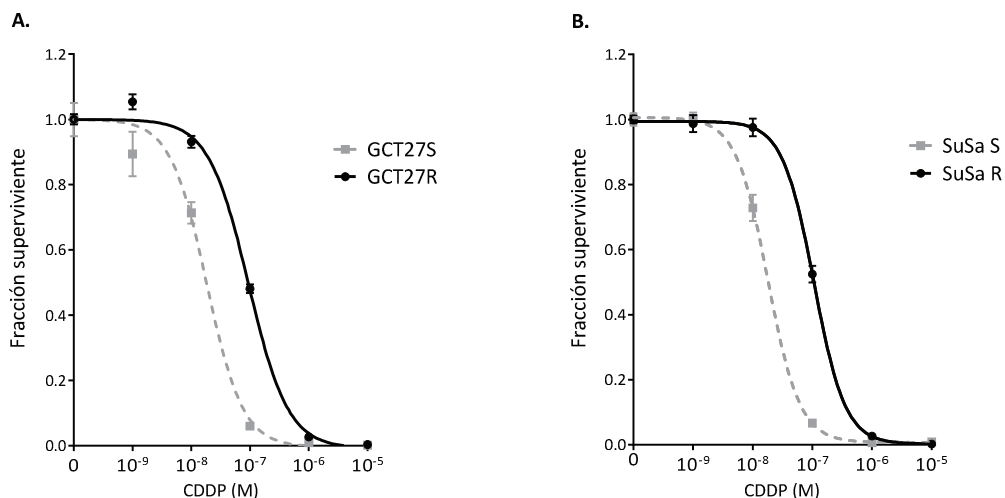
## **RESULTADOS**

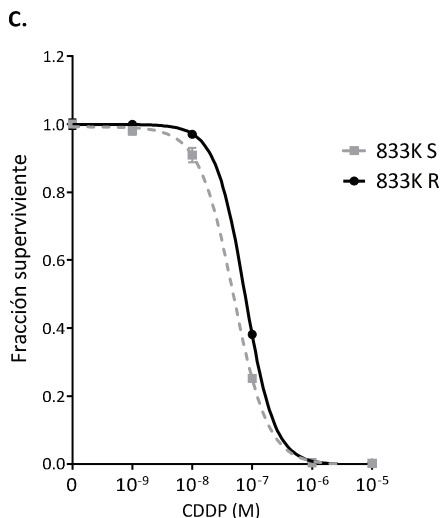


## OBJETIVO 1. Caracterización de los mecanismos de resistencia al cisplatino en TCGTs *in vitro*.

### 1. CARACTERIZACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DIFERENCIAL AL CISPLATINO EN LÍNEAS CELULARES PAREADAS DE CÁNCER TESTICULAR

La evaluación de la viabilidad celular, después de tratar con un rango de concentraciones de cisplatino (CDDP) de 10  $\mu\text{M}$  a 0,1 nM tres líneas de TCGT pareadas sensible (S)/resistente (R) a CDDP, permitió ratificar que en el caso de las líneas GCT27 y SuSa, las células S y R mostraban una capacidad de proliferación diferente en presencia del fármaco que era estadísticamente significativa ( $p=0,0002$  en ambos casos según el test de Mann-Whitney). Tal y como se muestra en la **tabla 12**, existen diferencias notables en el valor de la  $\text{IC}_{50}$  al comparar las células sensibles respecto a sus pareadas resistentes (19 nM vs 90 nM en el caso de las GCT27 y 18 nM vs 107 nM para las SuSa), con un factor de resistencia alrededor de 5 veces superior en ambos derivados R. Sin embargo, en el caso de la línea 833K, aunque la diferencia en las  $\text{IC}_{50}$  entre la línea parental y su derivada resistente era estadísticamente significativa ( $p=0,0006$ ), por tener solamente un incremento de 1,55 veces la resistencia en las células refractarias, estas células fueron descartadas para experimentos posteriores.





**Figura 19.-** Efecto del CDDP sobre la proliferación de las líneas pareadas de TCGT sensibles y resistentes al fármaco A) GCT27, B) SuSa y C) 833K. Las células fueron tratadas con un rango de concentraciones de droga entre 10  $\mu$ M y 0,1 nM. Las fracciones supervivientes se calcularon como porcentaje respecto a las células control. Cada punto corresponde a la media  $\pm$  error estándar de las réplicas.

Línea celular		IC <sub>50</sub> (nM)	Factor de resistencia (IC <sub>50</sub> R/IC <sub>50</sub> S)
GCT27	S	19 $\pm$ 0,2	4,74
	R	90 $\pm$ 0,4	
SuSa	S	18 $\pm$ 0,3	5,94
	R	107 $\pm$ 0,6	
833K	S	49 $\pm$ 0,3	1,55
	R	76 $\pm$ 0,2	

**Tabla 12.-** Valores de la mitad de la concentración inhibitoria máxima (IC<sub>50</sub>) y su error estándar correspondiente, para cada una de las líneas celulares en estudio. Se muestra también el factor de resistencia como medida del incremento en resistencia al CDDP de las células resistentes respecto a sus pareadas sensibles.

## 2. ESTUDIO DE MUTACIONES ASOCIADAS AL FENOTIPO SENSIBLE/RESISTENTE EN UNA LÍNEA CELULAR DE TCGT

Una vez comprobada la sensibilidad diferencial de las líneas celulares pareadas, se eligió la línea SuSa para hacer un estudio mutacional comparativo entre las células S y R.

La elección fue motivada por el hecho de ser la línea que presentaba una mayor diferencia en IC<sub>50</sub> entre células S y R. Se secuenció el exoma de ambos tipos celulares mediante la tecnología de secuenciación de última generación (NGS, del inglés *Next Generation Sequencing*). Esto permitió la obtención de una lista exhaustiva de todas aquellas mutaciones que afectan a las regiones codificantes del genoma de estas células, mostrando la presencia de diferentes tipos de mutaciones en ambas líneas (**tabla 13**).

**Tabla 13.-** Listado de las mutaciones encontradas mediante NGS en la línea celular pareada SuSa. Se presentan el número de mutaciones totales descritas en el experimento y también aquellas exclusivas para células S o R, clasificándolas por tipo de cambio.

	Mutaciones encontradas	Sólo en SuSa S	Sólo en SuSa R
Stop ganado/perdido	55	4	28
Cambio pauta de lectura	250	2	31
Tránsito <i>NMD</i>	994	18	71
No sinónima codificante	2207	45	316
Sinónima codificante	967	14	115
Sitio de <i>splicing</i> esencial	78	0	23
<i>UTRs</i>	196	6	30
<i>Up/Down stream</i>	817	10	27
Intrónica	1227	39	179
Gen no-codificante	2921	0	5

*NMD: nonsense-mediated mRNA decay, UTR: untranslated region.*

Tal y como se puede apreciar en la **tabla 13**, los cambios predominantes encontrados en estas células fueron la presencia de mutaciones en genes no-codificantes, así como mutaciones no sinónimas codificantes. Estas últimas son alteraciones en la secuencia de nucleótidos que producen una sustitución de aminoácidos en las proteínas resultantes, lo cual puede alterar el funcionamiento de la proteína.

Además, la presencia de mutaciones exclusivas era significativamente más elevada en las células R respecto a la línea parenteral, tal y como cabría esperar puesto que las células R derivaban de las S y la hipótesis de trabajo era que las células R habrían adquirido mutaciones que les permitirían sobrevivir al insulto citotóxico causado por el CDDP. El tipo de cambio más frecuente en estas células R fueron las mutaciones no sinónimas codificantes seguido de las intrónicas. Comparando el número de mutaciones entre ambos tipos de células, los cambios en la pauta de lectura (FSh) y las mutaciones presentes en sitios de *splicing* esencial parecían ser los que presentaban mayor porcentaje en células R respecto a las S. Las mutaciones FSh son aquellas en que se ha producido una inserción o deleción de bases en la cadena, por lo que, a menos que el cambio sea múltiplo de 3, a partir de ese punto toda la información queda alterada. Por su lado, aquellas mutaciones que afectan los puntos de *splicing* producen un procesado incorrecto del mRNA, afectando por ende a la proteína resultante.

Los resultados fueron posteriormente seleccionados y divididos en las siguientes categorías: I) mutaciones presentes solamente en SuSa R, y II) mutaciones presentes en SuSa S y revertidas en las células R. El resto de cambios que no cumplieran ninguno de estos criterios fueron descartados, ya que consideramos que se trataba de mutaciones pasajeras no relacionadas con el proceso de adquisición de resistencia. El listado completo de las mutaciones seleccionadas como relevantes y potencialmente asociadas con la adquisición de resistencia a CDDP se encuentra en el **anexo 1**.

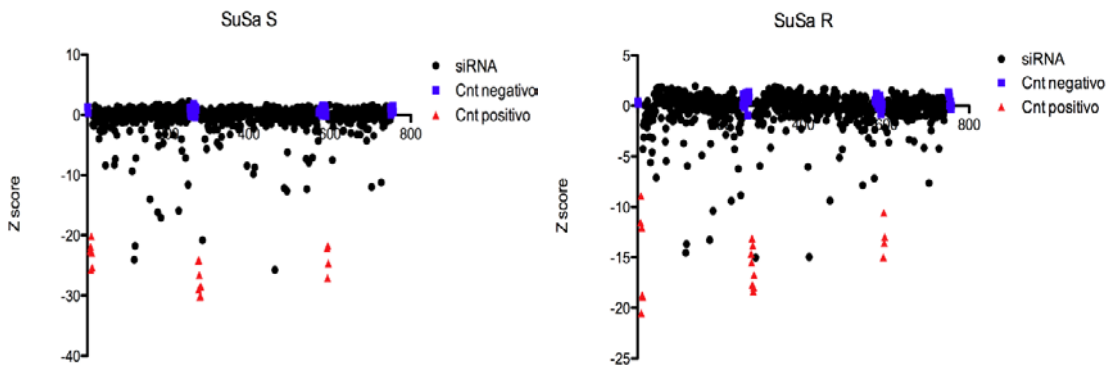
### **3. EFECTO DE LAS MUTACIONES SELECCIONADAS SOBRE LA SUPERVIVENCIA CELULAR Y BÚSQUEDA DE OTROS GENES RELACIONADOS CON LA ADQUISICIÓN DE RESISTENCIA A CDDP**

Una vez seleccionadas las mutaciones potencialmente relevantes en el proceso de adquisición de resistencia a CDDP en estas células, el siguiente paso fue la realización de un *screen* en el que cada uno de los genes portadores de esas mutaciones fue



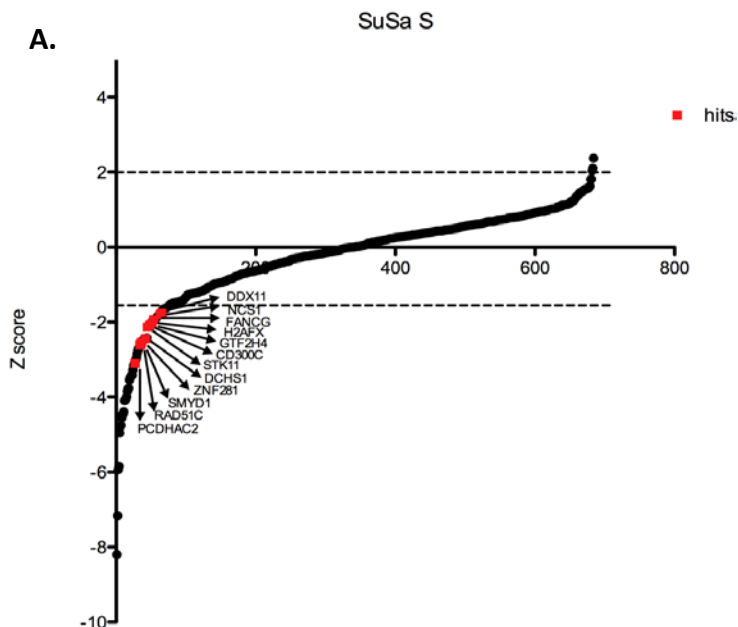
infraexpresado en la misma línea celular pareada utilizada para la NGS (SuSa S y R) mediante el uso de siRNAs. Además, teniendo en cuenta que otros genes, aún no presentando mutaciones en su región codificante, podrían participar en la adquisición de resistencia al fármaco a causa de cambios en su expresión debido a mecanismos de desregulación epigenética, o por amplificación y/o delección génica, etc., en el *screen* se añadieron otras dos librerías de RNAi: una que contenía siRNAs para los principales genes supresores de tumores y otra para aquellos genes relacionados con reparación de lesiones en el DNA. El listado completo de los genes infraexpresados en el *screen* se encuentra en la **tabla 8** de la sección de materiales y métodos. Una vez inhibida la expresión de los genes de interés, las células fueron tratadas con tres concentraciones de CDDP equivalentes a la fracción superviviente (FS) 25, 50 y 75 para cada tipo celular. Cinco días después, se analizó la supervivencia celular para el *knock-down* (KD) de cada gen mediante la técnica de *CellTiter-Glo* (CTG).

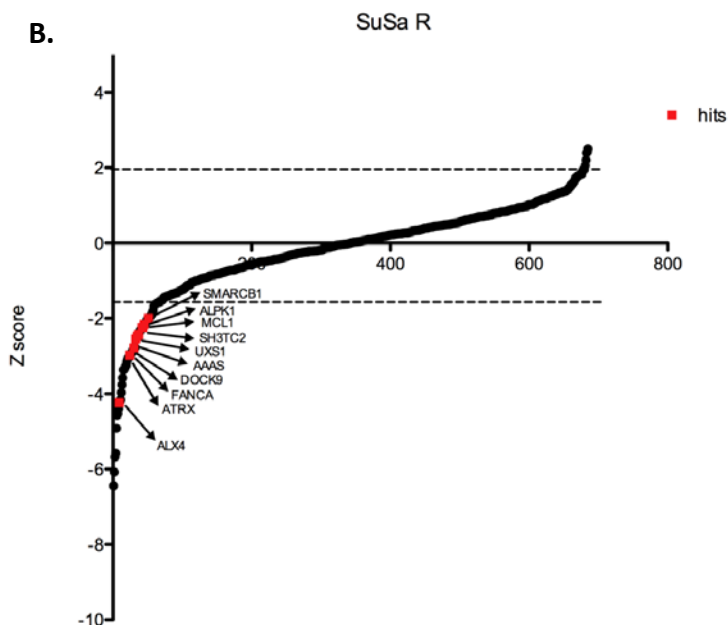
Una vez obtenidos los datos, se comprobó que las transfecciones hubieran funcionado correctamente para asegurarse de que los resultados no estuvieran sesgados debido a problemas técnicos durante la realización del experimento. De manera paralela, se analizó cual era el efecto de cada siRNA sobre la viabilidad celular en ausencia de droga, para eliminar todos aquellos RNAi con un marcado efecto intrínseco sobre la viabilidad de las células independiente del fármaco. Como se puede observar en la **figura 20**, donde se representan gráficamente los resultados del *screen* en las placas no tratadas con CDDP (placas control con DMSO), tanto en las células S como en las R los controles negativos (All\*, siCon1 y siCon2) no tenían ningún efecto sobre la viabilidad de las células, mientras que el control positivo (siPlk1) mostraba en todas las réplicas un *z-score* marcadamente negativo, indicando el alto grado de muerte celular que producía. Esto indicaba, consecuentemente, una buena eficiencia de transfección. Esta figura también muestra de manera clara todos aquellos siRNAs que redujeron la viabilidad celular *per se*.



**Figura 20.-** Representación de la capacidad de inhibir o potenciar la proliferación celular del KD de cada uno de los genes estudiados en el *screen* en ausencia de droga (placas control tratadas con DMSO). Se muestra también el efecto de los controles sobre la viabilidad celular (siPlk1 como control positivo en rojo; y All\*, siCon1 y siCon2 como controles negativos en azul). Cnt: control.

A continuación, se seleccionaron aquellos genes cuya infraexpresión fuera capaz de alterar la respuesta a CDDP en una de las líneas, pero sin causar ningún efecto en la viabilidad de su pareada. Además, para que un gen fuera considerado candidato estadísticamente significativo, el *z-score* del efecto de la droga obtenido para el KD del gen en cuestión tenía que ser, al menos en dos de las tres concentraciones de droga estudiadas, menor que -1,7 pero mayor que -5 en el caso de genes sensibilizadores a CDDP o encontrarse por encima de 2 para aquellos genes cuya inhibición produjera resistencia al fármaco.





**Figura 21.-** Representación de todos los genes incluidos en el *screen* ordenados por *z-score* creciente en células S (A) y R (B). Los puntos rojos marcan la posición de los genes seleccionados como candidatos potenciales (*hits*). En ambos casos, todos los *hits* caían en la región de sensibilización de las células, entre -1,7 y -5 en, al menos, dos de las tres concentraciones de droga testadas.

Los resultados mostraron que, al hacer KD de su expresión, algunos de los genes con mutaciones encontradas mediante NGS eran capaces de revertir el fenotipo resistente de las células, haciendo que estas volvieran a comportarse como sus homólogas sensibles. Además, la inhibición de la expresión de algunos genes supresores de tumores, así como otros relacionados con la reparación del DNA, también mostró la habilidad de sensibilizar las células resistentes. También se encontraron genes cuya inhibición era capaz de hacer la línea parental (SuSa S) aún más sensible al fármaco. Sin embargo, no se encontró ningún gen que por sí solo fuera capaz de hacer resistentes a las células sensibles. La mayoría de *hits* potenciales obtenidos en el *screen* pertenecían a la librería que contenía siRNAs para los candidatos seleccionados en el experimento de NGS (7/12 en células S y 8/10 en las R). De entre los genes estudiados que no presentaban mutaciones en estas células, los relacionados con reparación del DNA eran los segundos más presentes entre los candidatos encontrados, lo cual era de esperar si tenemos en cuenta que el CDDP es un agente cuyo mecanismo de acción es dañar el material genético de la célula.

**Tabla 14.-** Relación de los genes cuya inhibición con siRNAs sensibilizó a A) las células S o B) células R.**A.**

Gen	Anotación	Z score ED SuSa S	Z score ED SuSa R	Genotipo SuSa S	Genotipo SuSa R
CD300C	ENSG00000167850	-2.084722246	0.957782107	wt	No sin
DCHS1	ENSG00000166341	-2.440031705	-0.386470229	No sin	wt
DDX11	ENSG00000013573	-1.762510537	-0.355319887	wt	No sin
<b>FANCG</b>	<b>ENSG00000221829</b>	<b>-1.800904628</b>	<b>-0.48008679</b>	<b>wt</b>	<b>wt</b>
<b>GTF2H4</b>	<b>ENSG00000213780</b>	<b>-2.047528093</b>	<b>-1.093010734</b>	<b>wt</b>	<b>wt</b>
<b>H2AFX</b>	<b>ENSG00000188486</b>	<b>-1.930035577</b>	<b>-0.44159308</b>	<b>wt</b>	<b>wt</b>
NCS1	ENSG00000107130	-1.762632698	1.219352371	wt	No sin
PCDHAC2	ENSG00000243232	-3.1036672	0.670387054	wt	No sin
<b>RAD51C</b>	<b>ENSG00000108384</b>	<b>-2.610480539</b>	<b>-1.278893835</b>	<b>wt</b>	<b>wt</b>
SMYD1	ENSG00000115593	-2.602980038	-1.193762072	wt	No sin
<b>STK11</b>	<b>ENSG00000118046</b>	<b>-2.132324045</b>	<b>0.841232777</b>	<b>wt</b>	<b>wt</b>
ZNF281	ENSG00000162702	-2.540064202	-0.421878531	wt	Truncado

**B.**

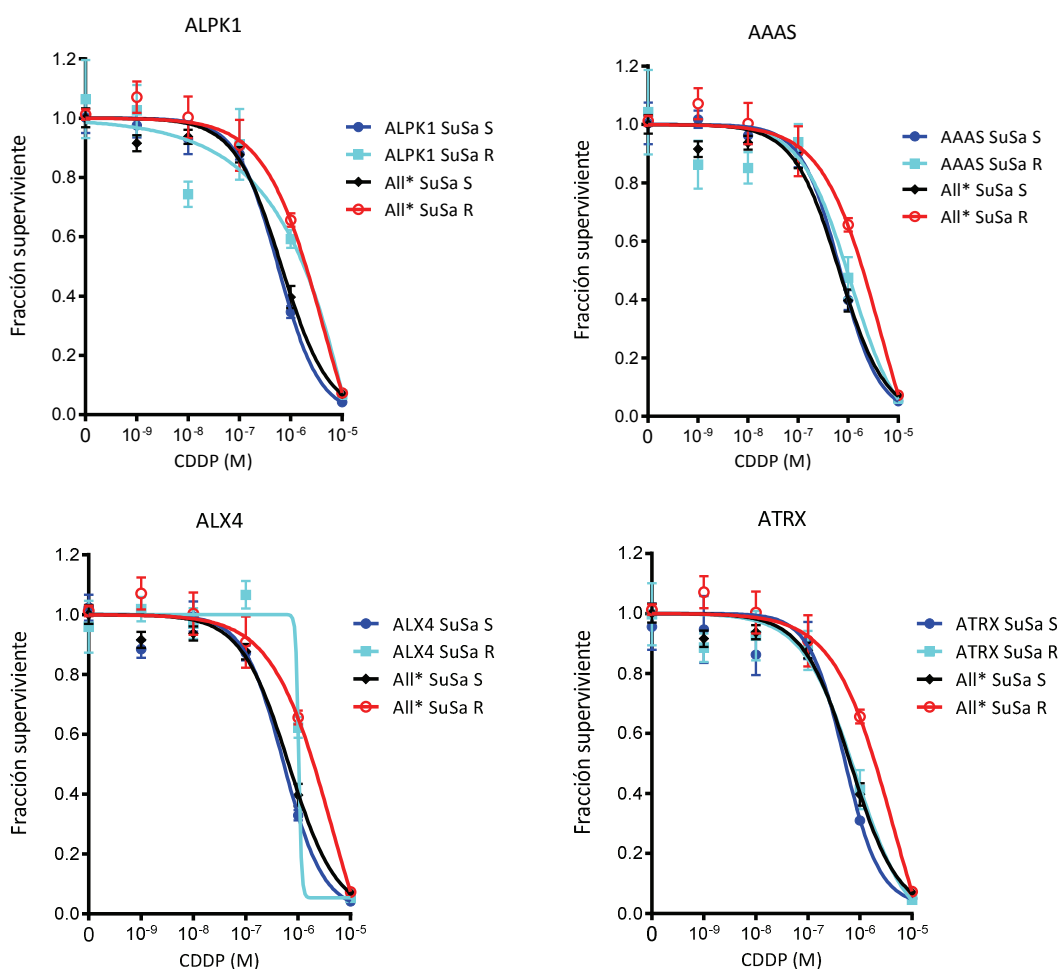
Gen	Anotación	Z score ED SuSa S	Z score ED SuSa R	Genotipo SuSa S	Genotipo SuSa R
AAAS	ENSG00000094914	-1.342250857	-2.466861612	wt	FSh
ALPK1	ENSG00000073331	-1.598998132	-2.165056581	wt	NMD
ALX4	ENSG00000052850	-0.99653246	-4.237107993	wt	No sin
ATRX	ENSG00000085224	-0.607762229	-2.97628499	wt	No sin
DOCK9	ENSG00000088387	-1.638973677	-2.542833497	wt	No sin
<b>FANCA</b>	<b>ENSG00000187741</b>	<b>-0.426444512</b>	<b>-2.785870997</b>	<b>wt</b>	<b>wt</b>
MCL1	ENSG00000143384	-1.622307966	-2.236154629	wt	No sin
SH3TC2	ENSG00000169247	-1.212315451	-2.237218741	wt	NMD (en sitio de splicing)
<b>SMARCB1</b>	<b>ENSG00000099956</b>	<b>-0.282504582</b>	<b>-2.002438862</b>	<b>wt</b>	<b>wt</b>
UXS1	ENSG00000115652	-0.364850946	-2.431560886	wt	Truncado

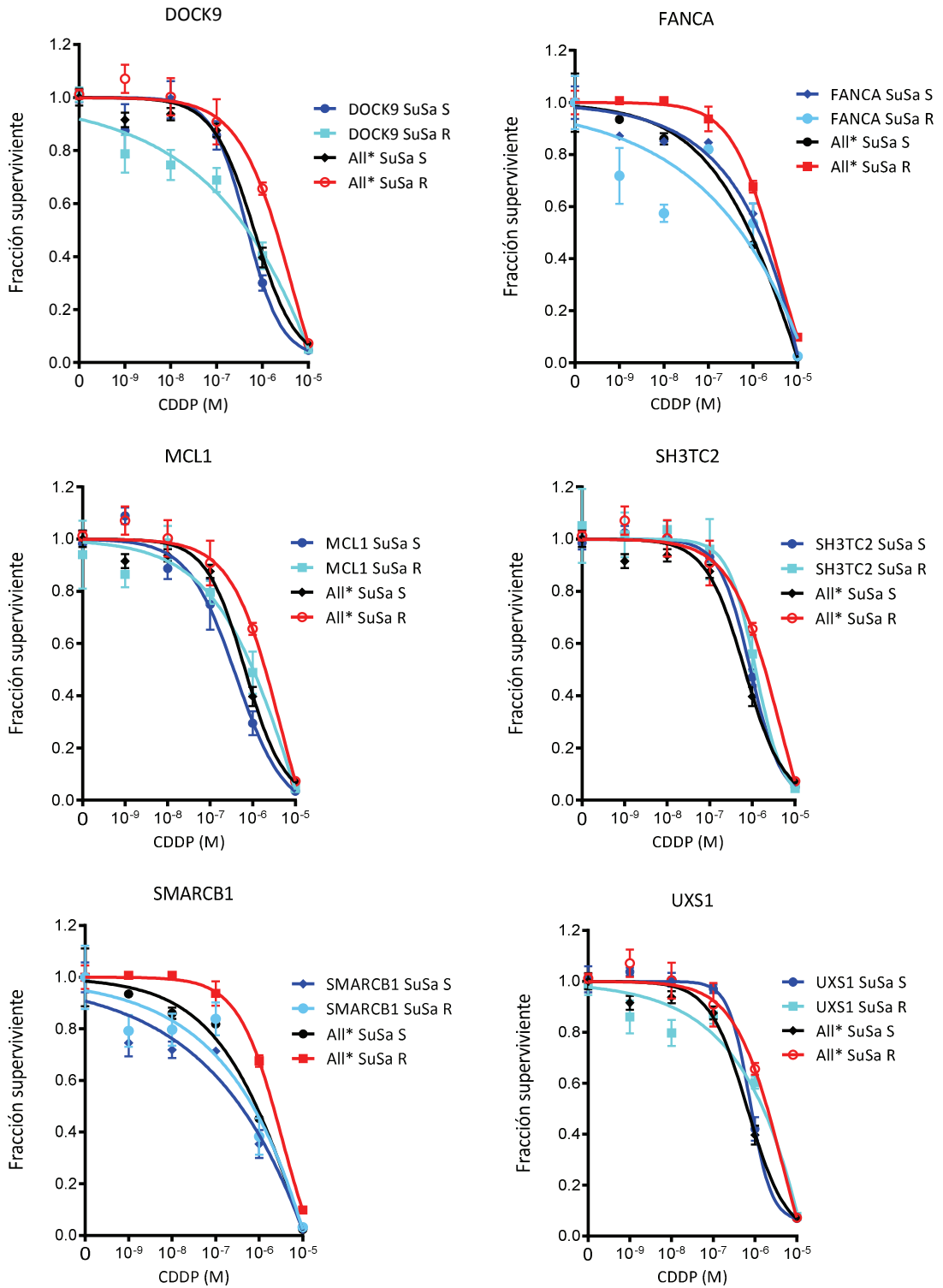
En color negro se detallan los genes con mutaciones descritas en el experimento de NGS, en rojo aquellos que pertenecen a la categoría de supresores tumorales y en verde los de la librería de reparación del DNA. ED: efecto de la droga, wt: *wild type*, No sin: no sinónima, FSh: *frame shift*, NDM: *nonsense-mediated mRNA decay*.

#### 4. VALIDACIÓN DE LOS *HITS* POTENCIALMENTE IMPLICADOS EN EL PROCESO DE ADQUISICIÓN DE RESISTENCIA

Para la validación de los *hits* nos centramos en aquellos genes cuya infraexpresión era capaz de sensibilizar a las células R, puesto que este era el principal objetivo del estudio llevado a cabo. Debido a la aparición relativamente frecuente de falsos positivos en este tipo de *screens* a gran escala, se repitieron las transfecciones con siRNAs para cada uno de los genes seleccionados con el objetivo de asegurar la veracidad de los resultados obtenidos.

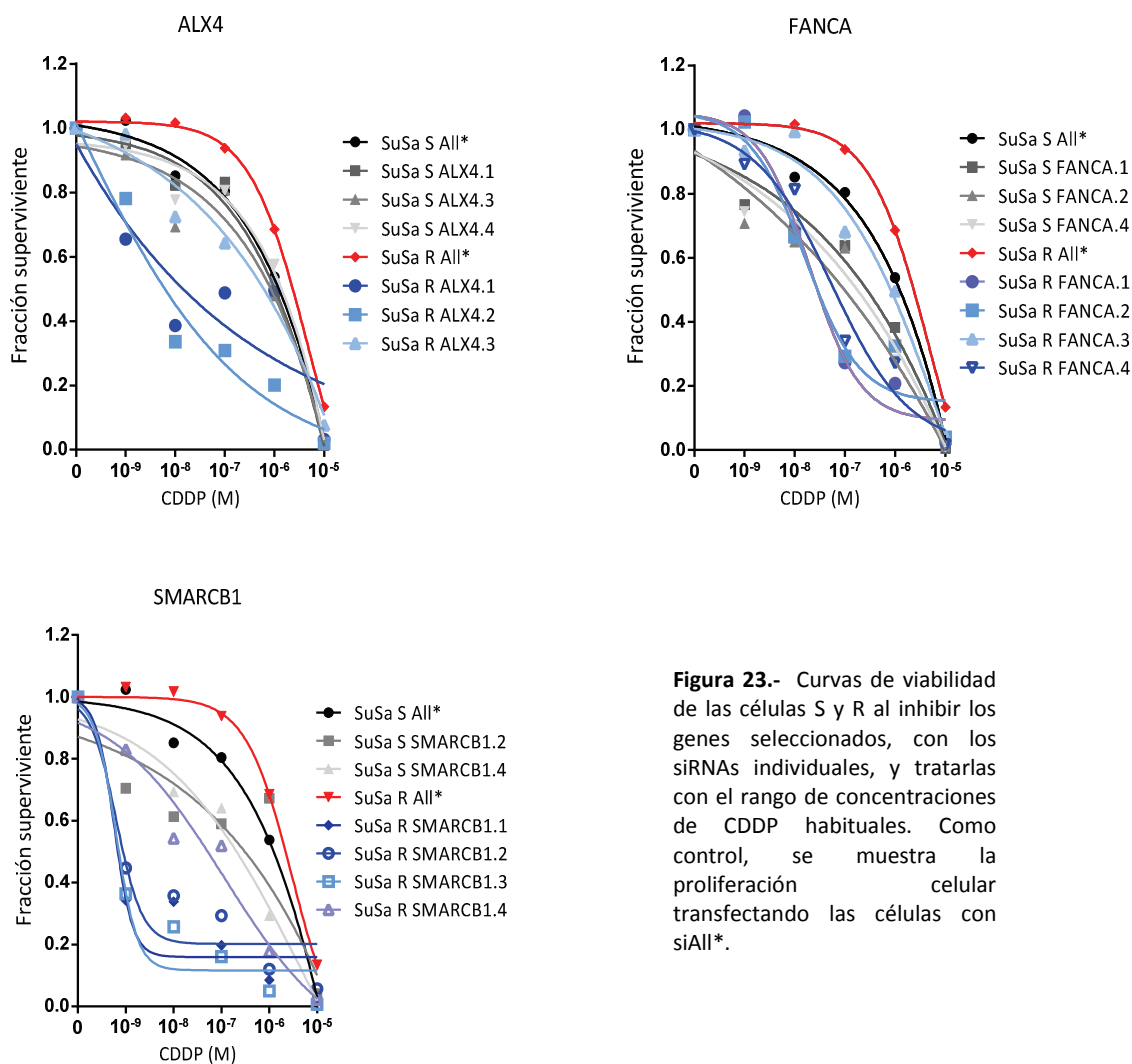
Primeramente las transfecciones se realizaron con el mismo *pool* de siRNAs (formado por 4 siRNAs individuales) que se había utilizado en el *screen*.





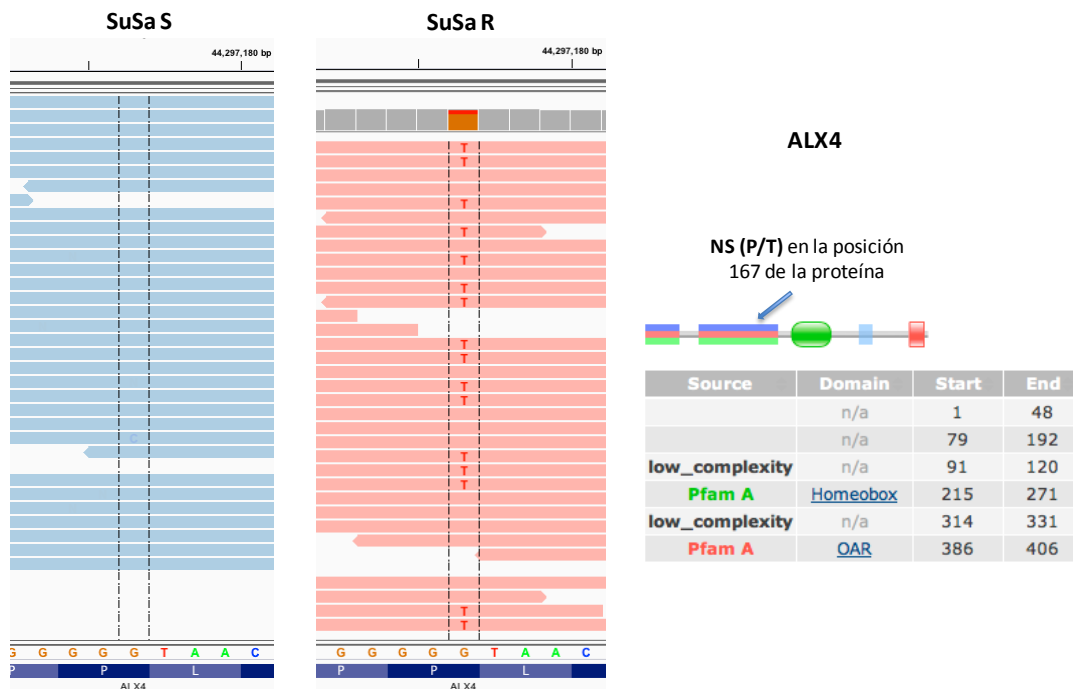
**Figura22.**-Efecto de inhibición sobre la proliferación celular en SuSa S y R para cada uno de los siRNAs seleccionados sensibilizadores de células R. Control negativo: proliferación celular transfectando las células con siAll\*.

Una vez comprobado de manera individualizada que los siRNAs ejercían un efecto diferencial en ambos tipos de células, el siguiente paso fue la repetición de la transfección esta vez utilizando los 4 oligos que formaban el *pool* usado en el *screen* por separado. De esta manera, nos asegurábamos que no se trataba de un *off-target effect*, es decir, que el siRNA estuviera produciendo la degradación de algún otro mRNA que no fuese el gen que supuestamente debería inhibir. Al mismo tiempo, este experimento nos sirvió para reconfirmar, una vez más, la presencia del efecto estudiado. Así, se descartaron una parte de los genes y nos quedamos con los 3 (*ALX4*, *FANCA* y *SMARCB1*) cuya inhibición ejercía el efecto deseado sobre las células en estudio en, al menos, 2 de los 4 siRNA individuales.



**Figura 23.-** Curvas de viabilidad de las células S y R al inhibir los genes seleccionados, con los siRNAs individuales, y tratarlas con el rango de concentraciones de CDDP habituales. Como control, se muestra la proliferación celular transfectando las células con siAll\*.

De los 3 genes seleccionados, *ALX homeobox 4 (ALX4)* contiene una mutación en las células R, tal y como se muestra en la **figura 24**. Se trata de una mutación no sinónima que produce un cambio de una prolina por una treonina en la posición 167 de la proteína, en un dominio cuya función no ha sido caracterizada según la base de datos proteica *Pfam*. En el caso de *Fanconi Anemia complementation group A (FANCA)* y *SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1 (SMARCB1)*, aunque no presentaban mutaciones en su secuencia, la desregulación de estos por otros mecanismos genéticos o epigenéticos podría relacionarlos con la adquisición de resistencia en estos tumores. De hecho, existen estudios en los que se describen cambios cromosómicos o a nivel de la expresión génica en las regiones que contienen ambos genes en TCGTs (16q y 22q respectivamente) (Bergthorsson et al., 2006; Wilson et al., 2005). Más concretamente, el trabajo de *Wilson y cols.* relaciona la sobreexpresión de genes presentes en 16q con la adquisición de resistencia en 3 líneas celulares de TCGT. En la discusión de este trabajo se analiza de una manera más detallada la función de estos genes y su posible papel en la adquisición de resistencia a CDDP.



**Figura 24.-** Posición de la mutación en el gen *ALX4* y consecuencia en su proteína correspondiente, según el programa IGV para análisis de datos de NGS (izquierda) y la base de datos Pfam (derecha).

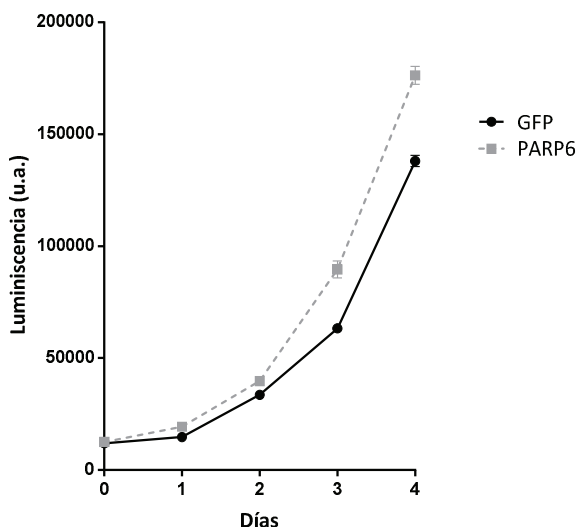


## OBJETIVO 2. Caracterización funcional del gen *PARP6* y valoración de su relevancia en mecanismos relacionados con resistencia al CDDP.

### 1. EFECTO DE LOS CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE *PARP6* SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

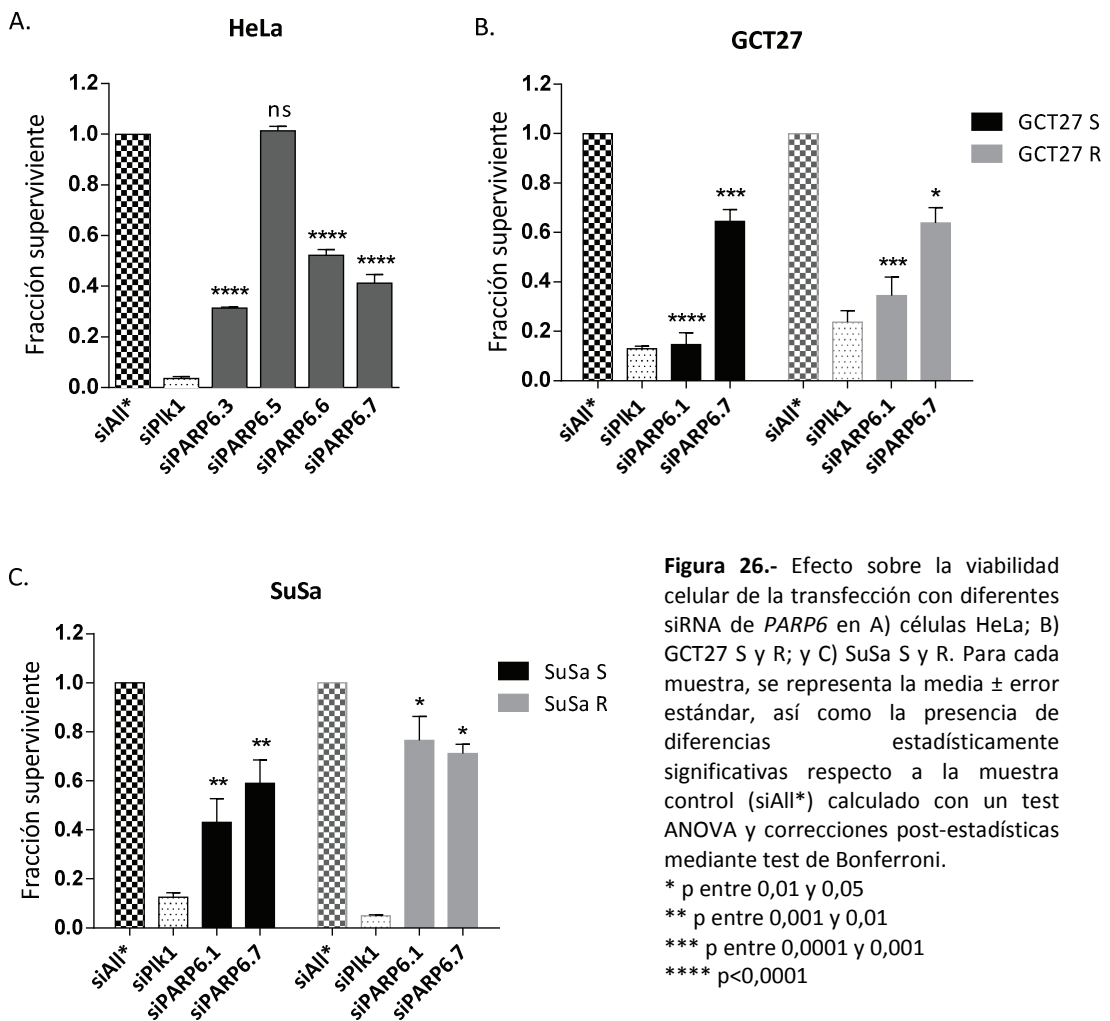
Para estudiar la correlación entre la amplificación presente en tumores testiculares resistentes a CDDP descrita por nuestro grupo, en la región cromosómica de *PARP6*, y su posible papel en la adquisición de resistencia y/o la aparición de un fenotipo más agresivo en estos tumores, se analizó el efecto de infraexpresar o sobreexpresar el producto proteico de este gen en diferentes líneas celulares.

Tal y como se puede observar en la **figura 25**, la sobreexpresión de *PARP6* en células 293 transfectadas de manera estable con un plásmido inducible de expresión del gen en cuestión, producía un incremento significativo ( $p < 0,0001$ ) en la capacidad proliferativa de estas células en comparación con células control transfectadas con el mismo plásmido inducible pero que, en este caso, expresaba GFP.



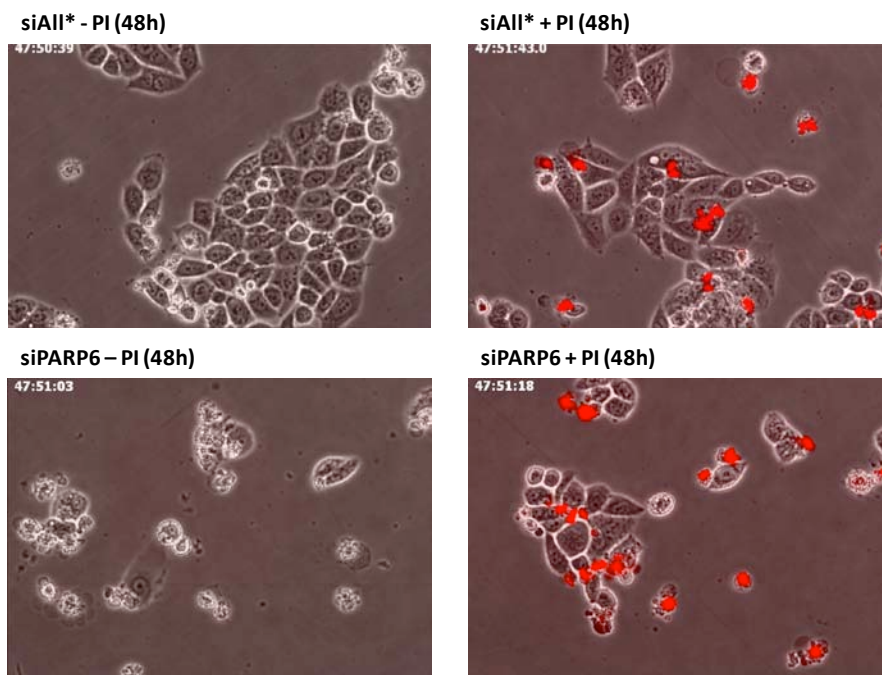
**Figura 25.-** Efecto de la sobreexpresión del gen *PARP6* sobre la proliferación celular. Las células control contienen el mismo plásmido estable pero con el gen *GFP*. La expresión fue inducida con doxiciclina y la viabilidad celular analizada mediante CTG durante 5 días consecutivos. La lectura del día 0 pertenece al estado basal (células no inducidas). u.a.: unidades arbitrarias. Los datos representados corresponden a la media de las réplicas  $\pm$  SEM. \*\*\*\* $p < 0,0001$  respecto control GFP mediante U-test Mann-Whitney a día 4.

A continuación, se investigó el efecto sobre la viabilidad celular del fenómeno opuesto, es decir, la infraexpresión del gen. Los resultados de efectuar el KD del gen mediante el uso de diferentes siRNAs mostraron una marcada disminución en la capacidad proliferativa en células HeLa, así como en las líneas de cáncer testicular GCT27 y SuSa. Además, el uso de diferentes siRNAs individuales nos permitió descartar un efecto fuera de la diana y asegurarnos de que realmente estábamos inhibiendo el gen de interés. Así, siPARP6.5 fue descartado por la incapacidad de producir ningún efecto sobre la proliferación celular, mientras el resto de siRNAs mostraron unas diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control (células transfectadas con el control negativo siAll\*).



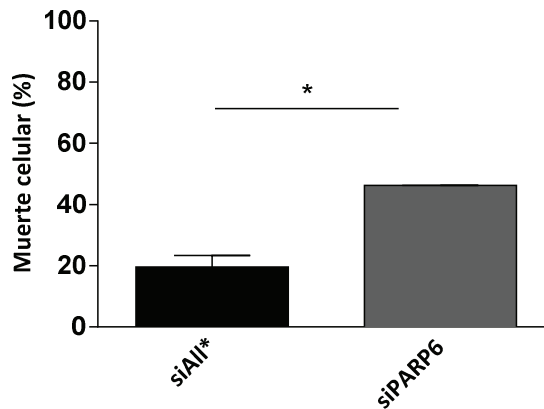
Después de observar que los cambios en la expresión de *PARP6* parecían estar asociados con la capacidad de las células para proliferar, se quiso comprobar este efecto sobre la división y la muerte celular de una manera más dinámica e informativa, así como estudiar los posibles efectos en la morfología celular asociados a la infraexpresión del gen en cuestión. Con este propósito, células transfectadas con siRNA para *PARP6* fueron monitorizadas en cultivo durante 48h mediante la toma regular de fotografías en presencia del agente intercalante ioduro de propidio (PI), que identifica las células no viables debido a la incapacidad del compuesto de penetrar en aquellas células con la membrana celular intacta.

Los resultados del experimento mostraron diferencias tanto en el tamaño de las colonias como en el número de células viables. La **figura 27** permite observar estas diferencias en ambos aspectos, habiendo menor número de células en las placas transfectadas con siPARP6, a la vez que más células positivas para PI. Estas observaciones daban peso a la idea del posible papel de la proteína PARP6 en la viabilidad celular.



**Figura 27.-** Imágenes de las células control y transfectadas con siPARP6 48h después del inicio de la grabación. Izquierda: placas en que las células crecieron sin PI; derecha: placas a las que se les adicionó PI al inicio del experimento para ver con más claridad células muertas.

Además, la cuantificación de la muerte celular mediante citometría de flujo mostró la presencia de diferencias significativas en el número de células muertas al hacer KD de PARP6, respecto a las células transfectadas con All\* (**figura 28**).

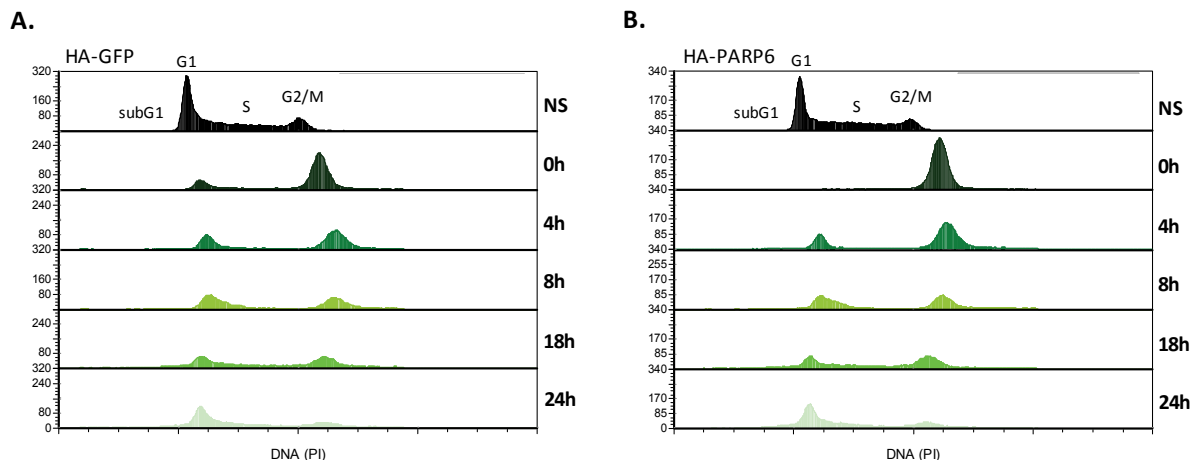


**Figura 28.-** Cuantificación del porcentaje de muerte celular, en células transfectadas con siAll\* o con siPARP6, 72h después de realizar la transfección.  $p=0,01$  mediante t-test.

## 2. PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA PARP6 EN LA REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR

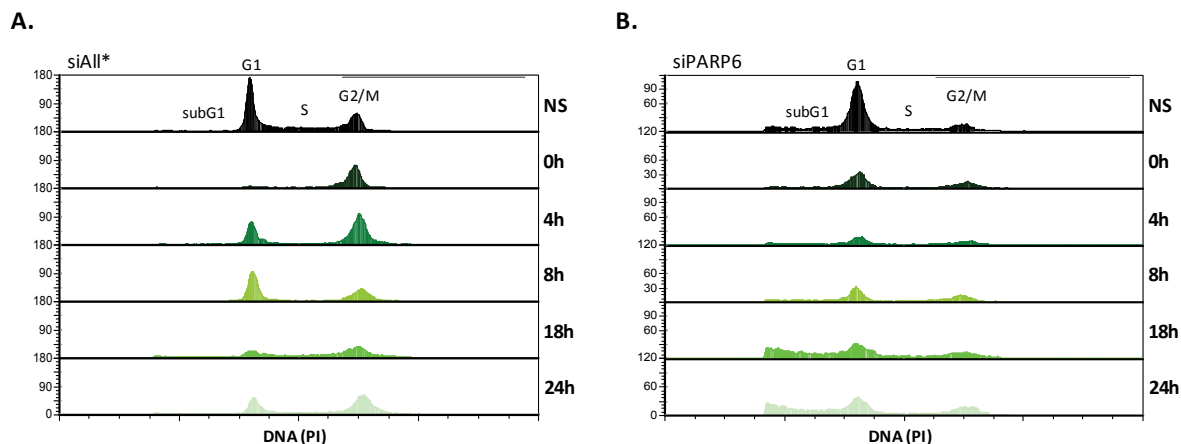
A partir de los resultados obtenidos en los experimentos de viabilidad celular, se quiso estudiar si la proteína PARP6 ejercía algún tipo de papel regulador en el ciclo celular, lo cual podría ayudar a explicar el efecto de los cambios en su expresión sobre la proliferación de las células. Mediante citometría de flujo, se estudió el perfil del ciclo celular en células con la proteína sobre o infraexpresada.

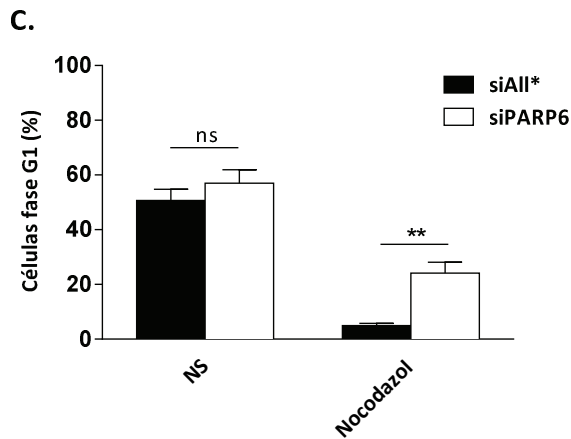
En el experimento de sobreexpresión de la proteína no se objetivaron diferencias remarcables en ninguna de las fases del ciclo celular respecto a las células control, tal y como se puede observar en la **figura 29**.



**Figura 29.-** Representación del ciclo celular durante las 24h siguientes a la sincronización de las células con nocodazol mediante marcaje del contenido de DNA de estas con PI. Células transfectadas con un plásmido de expresión de GFP o con PARP6. NS: no sincronizadas.

Sin embargo, en aquellas células en las que se había infraexpresado la proteína, estas perdían la habilidad de progresar normalmente a lo largo del ciclo, quedando un porcentaje significativo atascadas durante unas horas en fase G1 después de la sincronización con nocodazol o afidicolina. Además, en las células con siPARP6, se pudo observar un aumento importante del número de células muertas a lo largo de las 24h de duración del estudio (fracción subG1), lo cual indicaría que aquellas células incapaces de progresar de manera correcta a lo largo del ciclo acabarían muriendo gradualmente, lo que explicaría el descenso en la viabilidad celular observada en los experimentos de proliferación celular descritos en el punto anterior.

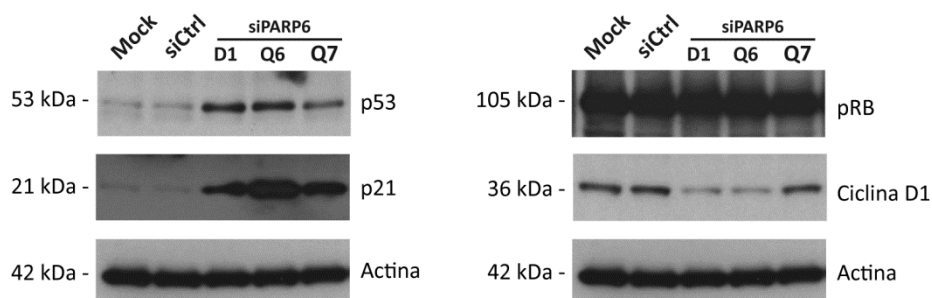




**Figura 30.-** Perfil del ciclo celular las 24h siguientes a la sincronización con nocodazol en A) células control y B) KD de *PARP6*. C) Porcentaje de células en fase G1 antes de tratar con la droga y justo después de eliminarla del medio. NS: no sincronizadas.

Para intentar dilucidar si el KD de PARP6 producía cambios en la expresión de alguna proteína con un papel relevante en el control del ciclo celular en la fase G1, células transfectadas con diferentes siPARP6 fueron analizadas a nivel proteico mediante Western Blot para las proteínas p21, Ciclina D1, pRB y p53.

Los resultados obtenidos fueron muy interesantes: se objetivó que, al infraexpresar PARP6, se producía un aumento en la expresión de p53 i p21, lo cual podría explicar la parada del ciclo celular en fase G1, observada mediante citometría de flujo. Además, estos cambios iban relacionados con un descenso de ciclina D1, otra proteína específica de G1/S cuya actividad es necesaria para la transición de fase G1 a S. La disminución en los niveles de esta proteína también estaría vinculada con esa parada del ciclo observada al hacer KD de PARP6.



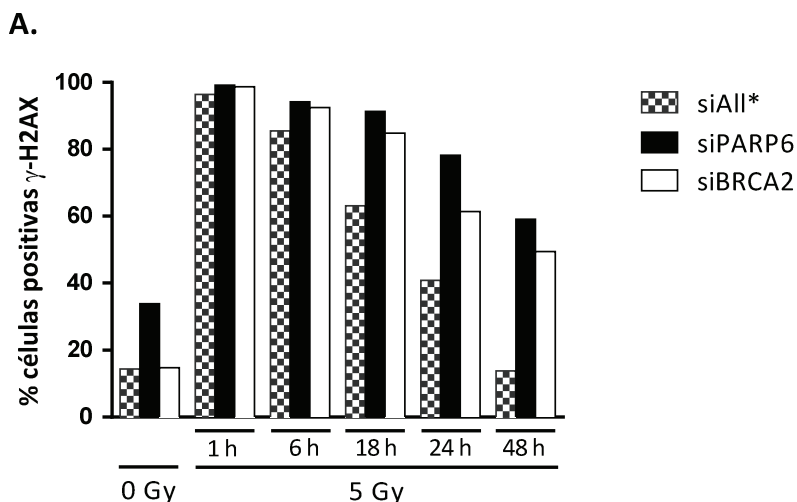
**Figura 31.-** Niveles de expresión de algunas de las principales proteínas implicadas en la regulación de la fase G1 del ciclo celular 72h después de transfectar las células con diferentes siRNAs para *PARP6*.

### 3. PAPEL DE PARP6 EN REPARACIÓN DE LESIONES INDUCIDAS EN EL DNA

A raíz de los resultados obtenidos de viabilidad y cambios en el perfil del ciclo celular, y teniendo en cuenta que otras proteínas de la familia de PARP6 como PARP1 y 2 tienen un papel relevante en mecanismos de señalización de daño y reparación de lesiones en el material genético de la célula, el siguiente paso fue estudiar el efecto de la infraexpresión de *PARP6* en la capacidad de señalización y reparación de lesiones producidas mediante radiación ionizante en células HeLa. Con esta finalidad, después de irradiar células con KD de *PARP6*, estas fueron fijadas en diferentes puntos durante las 48h siguientes y, posteriormente, marcadas para  $\gamma$ -H2AX mediante IF. La formación de focos de  $\gamma$ -H2AX se utiliza como marcador de la fosforilación de la histona H2AX en los sitios de roturas de doble cadena en el DNA y de horquillas de replicación atascadas, indicando la presencia de lesiones en el material genético de la célula. Además, como control se utilizaron células con KD de *BRCA2*, puesto que se sabe que células con mutaciones inactivantes en esta proteína son deficientes reparando las roturas de doble cadena (DSB, del inglés *double strand breaks*) generadas por la radiación.

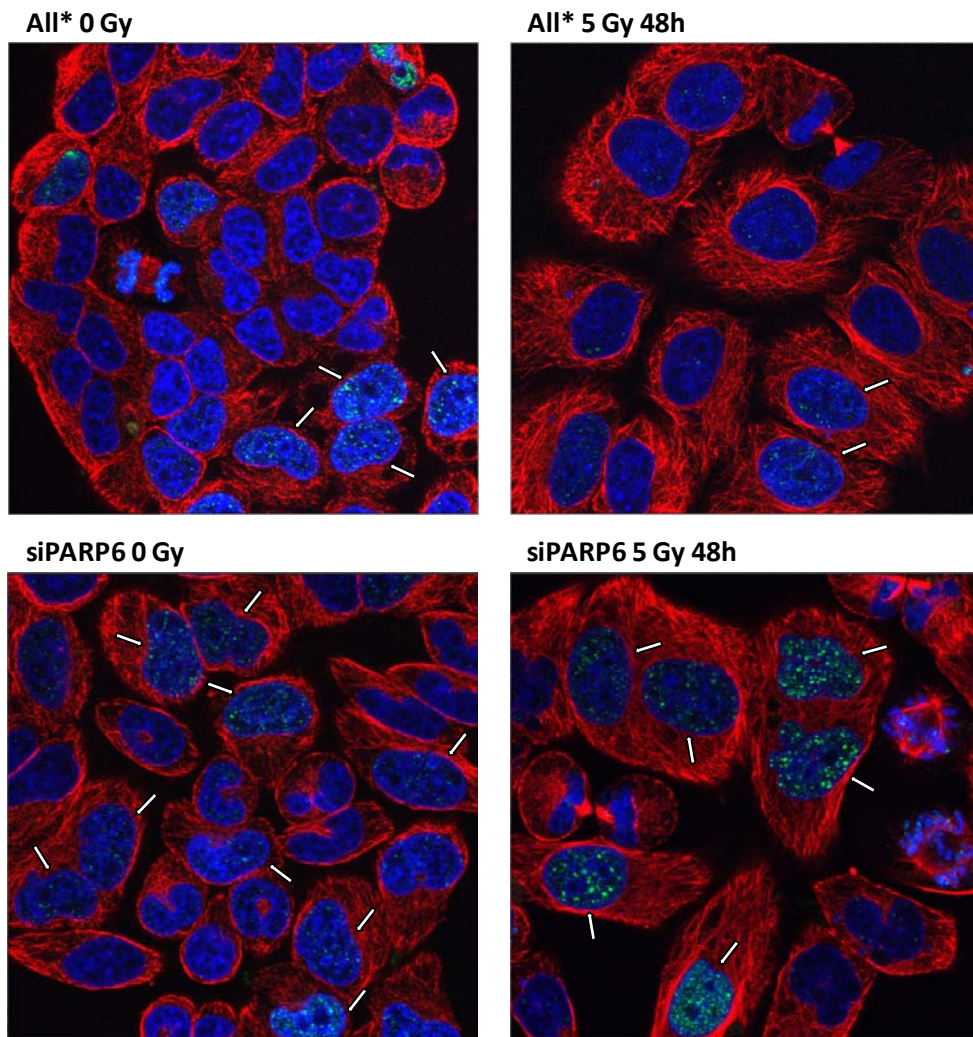
Una vez analizados los datos obtenidos, se pudo observar un retraso en la velocidad de reparación de las lesiones, siendo incluso más acusado que el observado en células con siBRCA2. 48h después de irradiar las células, aquellas transfectadas con siAll\*

(control) habían reparado las lesiones producidas y volvían a encontrarse en su estado basal. Sin embargo, la población de células transfectadas con siPARP6 aún tenía alrededor del doble de células positivas para  $\gamma$ -H2AX que antes de dañar su DNA (59% respecto un 33% en estado basal), y aproximadamente 4 veces más que las células control (59% respecto 14%). Además, se pudo observar que, incluso antes de irradiar las células, el porcentaje de células positivas con focos de daño era superior respecto a los otros dos grupos de células, lo cual sugeriría que la ausencia de esta proteína induce la aparición de lesiones en el DNA, incluso en ausencia de un efector externo de daño, posiblemente debido a la incapacidad de reparar los daños producidos durante los procesos fisiológicos normales de la célula. Estos resultados parecían indicar que la infraexpresión de esta proteína estaría produciendo fallos en la reparación del DNA, lo cual podría explicar los resultados obtenidos de efectos sobre la viabilidad y cambios en el ciclo celular al hacer KD de *PARP6*. De manera paralela, los datos obtenidos reforzarían la hipótesis del posible papel de esta proteína en la adquisición de resistencia a CDDP, puesto que un aumento en su expresión podría sobreactivar los mecanismos de reparación de lesiones en el DNA, lo cual haría las células más resistentes al efecto del fármaco.





B.



**Figura 32.-** IF con  $\gamma$ -H2AX en células transfectadas con siPARP6 para detectar focos de daño en el DNA. A) Porcentaje de células positivas para  $\gamma$ -H2AX (con 4 o más focos de daño/célula) antes y después de irradiar con 5 Gy de rayos X células control (All\*), siPARP6 y siBRCA2; B) Imágenes de células marcadas para  $\gamma$ -H2AX antes de irradiar y 48h después de hacerlo. Rojo: tubulina, verde:  $\gamma$ -H2AX, azul: DNA.

### **OBJETIVO 3. Estudio de la adquisición de resistencia al cisplatino *in vivo* en un modelo de tumores testiculares xenoinplantados ortotópicamente en ratones.**

#### **1. DESARROLLO DE UN MODELO DE RESISTENCIA ADQUIRIDA *IN VIVO* AL CDDP**

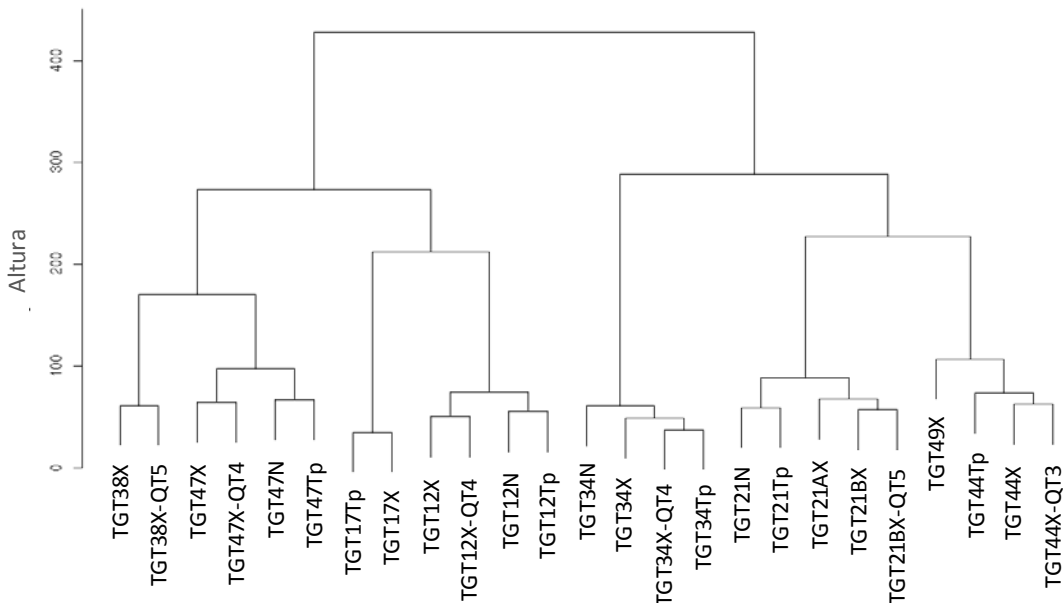
A partir del modelo, generado por nuestro grupo, de tumores testiculares primarios implantados de manera ortotópica en ratones atímicos (orthoxenografts), y con el objetivo de estudiar el fenómeno de la resistencia a CDDP en un contexto lo más parecido posible a la clínica, se trataron con CDDP varios tumores xenoinjertados que no habían sido tratados previamente con el fármaco en el paciente de origen y que mostraron ser sensibles a este en el proceso de caracterización (experimentos anteriores realizados por el grupo). Los tumores TGT1, TGT12, TGT21B, TGT34, TGT38, TGT44, TGT47 (caracterizados en la **tabla 9** de materiales y métodos) fueron sometidos a una exposición progresiva al fármaco con dosis crecientes de este, como se detalla en la **figura 17** (materiales y métodos). A medida que se realizaban los pases, aun habiendo un aumento en la dosis de fármaco, se objetivó un acortamiento progresivo del tiempo de recrecimiento tumoral, llegando a una estabilización a partir del pase número 5.

La caracterización de estos tumores resistentes forma parte de la tesis doctoral de Josep Maria Piulats. Así, se observó en un experimento en el que se trataron los tumores sensibles de origen y sus derivados resistentes (después de 3-5 ciclos de tratamiento según el tumor), que estos últimos eran refractarios incluso a las dosis más altas de CDDP toleradas por el ratón (5 mg/kg) en comparación con sus tumores de origen. Además, se comprobó que existía una buena correlación entre el tumor original y el tumor con resistencia inducida a CDDP, tanto en la hematoxilina & eosina (H&E) como en el panel de inmunohistoquímica básica utilizado para el diagnóstico de esta enfermedad y que incluye p53, PLAP, EMA, Vimentina,  $\beta$ HCG, CD30, EGFR, CD117, AFP, Ki67 y Cam5.2.

## 2. ESTUDIO DE LAS MUTACIONES ASOCIADAS CON LA APARICIÓN DEL FENOTIPO RESISTENTE EN MUESTRAS DE TUMORES

Una vez obtenido el modelo preclínico de adquisición de resistencia a CDDP *in vivo*, el siguiente paso fue la realización de un estudio de la evolución del estado mutacional de los tumores desde las muestras originales reseccionadas de los pacientes hasta sus derivados resistentes obtenidos en ratones, con el fin de identificar aquellos genes que pudieran tener un papel importante en el fenómeno de adquisición de resistencia a CDDP. Además, en el caso de TGT17, TGT44 y TGT49, tumores refractarios endógenos (pacientes que no respondieron a la QT y acabaron muriendo a causa de la enfermedad), se quiso estudiar si existían paralelismos entre las mutaciones adquiridas en los tumores resistentes generados en el laboratorio y aquellos que ya lo eran en los pacientes de origen. Sin embargo, es importante tener en cuenta que los tumores hechos resistentes en los ratones son un sistema mucho más controlado, ya que estos ratones solamente fueron tratados con CDDP. Por el contrario, los tumores refractarios endógenos son recidivas después de varias dosis de QT que, además de CDDP, incluía otros fármacos como bleomicina, etc..., por lo que caracterizar el perfil mutacional es más complejo.

Primeramente, este estudio sirvió para volver a confirmar que el modelo de orthoxenografts generado era representativo de la enfermedad y que mantenía las características de las muestras de origen, incluso después de unos cuantos pases, puesto que al hacer la clasificación no supervisada de las muestras utilizando SNPs (del inglés *single nucleotide polymorphism*) los xenos, tanto sensibles como sus derivados resistentes, clasificaban junto con sus tumores primarios según paciente de origen (**figura 33**).



**Figura 33.-** Dendrograma de relación entre las diferentes muestras analizadas en la NGS mediante análisis de SNPs con una frecuencia alélica superior al 5% en cualquier población de HapMap.

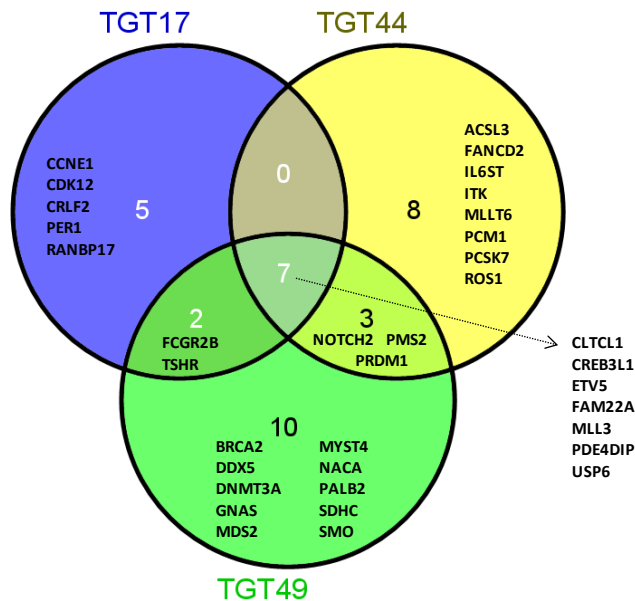
Los resultados obtenidos para cada muestra fueron cribados según los criterios descritos en el **apartado 2** del bloque “Estudio de la adquisición de resistencia *in vivo*” de materiales y métodos. Además, se estudió si los genes seleccionados en cada caso habían sido reportados con anterioridad en el *Cancer Gene Census* (CGC). La lista completa de las mutaciones que cumplían los criterios de selección para cada caso se encuentra en el **anexo 2** de este trabajo.

De los casos analizados, TGT38 es el que presentaba un número mayor de mutaciones asociadas al fenotipo resistente (n= 87 mutaciones), mientras TGT12 es el que tenía un menor número (n= 10), lo que indicaría que algunos tumores tienen una mayor inestabilidad génica que otros y que, en algunos casos, un bajo número de mutaciones es suficiente para desarrollar la resistencia al fármaco. En general, se puede afirmar que no existía un patrón de mutaciones relacionadas con la adquisición de resistencia similar entre las muestras estudiadas. De hecho, la mayoría de tumores resistentes parecían haber adquirido este fenotipo mediante mecanismos que implican mutaciones en genes diferentes, puesto que casi no se objetivaron cambios génicos

compartidos por diferentes casos, tal y como se muestra en la **tabla 15**. Sólo en el caso de los 3 tumores refractarios endógenos estudiados, había una presencia más alta de genes con mutaciones compartidas: 7 genes con mutaciones coincidentes entre TGT17, TGT44 y TGT49, 9 en el caso de TGT17 y TGT49, y 10 genes alterados presentes en TGT44 y TGT49 (**figura 34**). Sin embargo, en el caso de estos tres tumores, al no disponer de tejido normal del paciente para el estudio, era algo más difícil discernir las mutaciones potencialmente implicadas en la falta de respuesta de estos tumores a la QT. Por eso, el criterio de selección de mutaciones “importantes” en estos 3 casos, fue tener en cuenta solamente aquellos cambios génicos que ya hubieran sido descritos anteriormente en el *Cancer Gene Census* (CGC). Se trata de una aplicación virtual diseñada por los creadores de la página web COSMIC (*catalogue of somatic mutations in cancer*), en la que se actualizan de manera continua todos aquellos genes que poseen mutaciones que han sido implicadas causalmente con el cáncer. Así, intentamos cribar mutaciones potencialmente implicadas en el proceso de resistencia y descartar todas aquellas que se hubieran producido de manera aleatoria.

**Tabla 15.-** Número de mutaciones exclusivas de los tumores resistentes descritas mediante NGS en los 9 casos estudiados, y mutaciones coincidentes entre los diferentes tumores resistentes.

	TGT21	TGT12	TGT1	TGT17	TGT44	TGT47	TGT49	TGT38	TGT34
TGT21	26	--	--	--	--	--	--	--	--
TGT12		10	--	--	--	--	--	--	--
TGT1			76	--	--	<b>1</b>	--	--	--
TGT17				26	<b>7</b>	--	<b>9</b>	--	--
TGT44					33	--	<b>10</b>	--	--
TGT47						35	--	--	--
TGT49							33	<b>1</b>	--
TGT38								87	--
TGT34									51

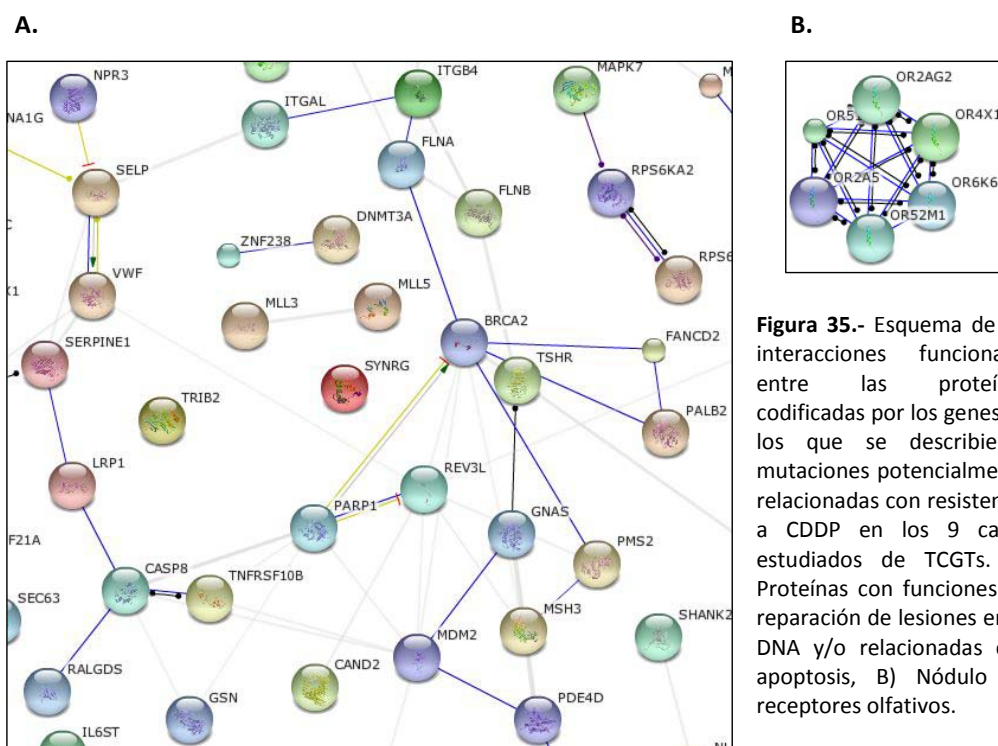


**Figura 34.-** Genes con mutaciones convergentes en los 3 casos de tumores refractarios endógenos. Coincidencias analizadas y representadas mediante el uso de la herramienta bioinformática Venny (Oliveros, 2007).

Además de los genes con mutaciones compartidas entre las muestras refractarias endógenas, ilustrados en la **figura 34**, sólo se encontraron dos genes con mutaciones presentes en muestras resistentes de dos casos diferentes: en el gen *GNAS* presente en TGT38 y TGT49, y en el gen *PTPRB* en TGT1 y TGT47.

Por otro lado, se estudió la presencia de mutaciones en genes que pertenecieran a la misma vía o relacionados con una función celular concreta en el global de casos estudiados. Sorprendentemente, más de la mitad de los tumores resistentes (TGT21, TGT1, TGT47, TGT38 y TGT34) presentaban mutaciones exclusivas (no presentes en muestras sensibles) en diferentes genes de la familia de receptores olfativos, incluso en algún caso más de un miembro de la familia estaba mutado en la misma muestra. Varios trabajos han descrito la expresión ectópica de estos receptores en testículo, espermatozoides y células germinales primordiales (CGP), tal y como se comenta en la revisión escrita por Kang y Koo (Kang and Koo, 2012). Sin embargo, también hay que

tener en cuenta que estos receptores tienen tendencia a aparecer como falsos positivos en este tipo de análisis mutacional a gran escala, como se ha reportado recientemente (Lawrence et al., 2013). Por otro lado, encontramos otra serie de genes relacionados y frecuentemente mutados en las muestras resistentes, cuyo papel en la adquisición de resistencia es bastante más razonable: se trata de genes con un rol directo o indirecto en la reparación de lesiones producidas en el DNA, así como genes relacionados con apoptosis. En el apartado de discusión del presente trabajo se describe de forma más detallada la posible relación entre los genes comentados y el proceso de adquisición de resistencia al CDDP.



**Figura 35.-** Esquema de las interacciones funcionales entre las proteínas codificadas por los genes en los que se describieron mutaciones potencialmente relacionadas con resistencia a CDDP en los 9 casos estudiados de TCGTs. A) Proteínas con funciones de reparación de lesiones en el DNA y/o relacionadas con apoptosis, B) Nódulo de receptores olfativos.

## 2.1. Perfil mutacional del caso 1 (TGT21, tumor mixto SE y NSE)

Se trata de un tumor mixto con histologías SE y NSE, aunque la primera no creció en los orthoxenografts. Además, dentro de la segunda histología, encontramos representados todos los subtipos: carcinoma embrionario (CE), coriocarcinoma (Chr),

tumor del seno endodérmico (TSE) y teratoma (Ter). De las mutaciones seleccionadas destacaba, por su prevalencia en la muestra resistente, la que afectaba al gen supresor de tumores *PDCD4* (53% en tumor resistente respecto 0% en tumor primario), cuya infraexpresión ya había sido relacionada con quimioresistencia a CDDP en estudios realizados por otros grupos (Liu et al., 2013; Zhang et al., 2010a). También cabe destacar el gen *ABCC4* (prevalencia del 42% en la muestra resistente frente a un 0% en las muestras sensibles) cuya proteína funciona como bomba de membrana y tiene un papel importante en detoxificación celular, por lo que algunos estudios han relacionado cambios en su expresión con resistencia a CDDP (Moyer et al., 2010; Zhang et al., 2010c). Finalmente, existían dos genes que presentaban mutaciones en las muestras sensibles y que habían revertido al fenotipo *wt* en el tumor resistente: *MBD5* y *LRP1*. Sin embargo, de los candidatos seleccionados, ninguno había sido descrito anteriormente en CGC.

### **2.2. Perfil mutacional del caso 2 (TGT12, CE)**

La mutación más prevalente en el tumor resistente en este caso se encontraba en el gen *CYBB* (35%), seguido de cerca por *SYTL2* (33%), aunque ninguno de estos genes había sido relacionado anteriormente con resistencia a CDDP. Sin embargo, aunque con un porcentaje más bajo de presencia en la muestra resistente (19%), la proteína codificada por el gen *MSH3* sí ha sido relacionada con resistencia a CDDP, por su papel en la vía de *mismatch repair* (MMR) (Francia et al., 2005). No se describieron genes revertidos en la muestra quimioresistente, ni tampoco genes descritos en CGC.

### **2.3. Perfil mutacional del caso 3 (TGT1, TSE)**

A diferencia del caso 2, en el que muy pocas mutaciones pasaron los criterios de selección y ninguna era demasiado prevalente, en este caso se describió un número bastante elevado de cambios genéticos potencialmente relacionados con la falta de respuesta al fármaco. Además, algunos de estos exhibían una alta frecuencia en la muestra resistente, como el gen *PGRMC1*, cuya mutación estaba presente en el 100% de



la población celular, mientras que tenía un 0% de frecuencia en las muestras sensibles de este tumor. De manera parecida, *BTK* presenta un 94% de frecuencia vs un 0%.

Por otro lado, dos de los genes mutados habían sido reportados anteriormente en CGC: *RAP1GDS1* (43%), que había sido descrito en leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL) por presentar una translocación con el gen *NUP98*, y *HOXA9* (14%) del que se habían caracterizado translocaciones con el gen *NUP98* y *MSI2* en leucemia mieloide aguda (AML), aunque ninguno de ellos se había asociado con cambios en la respuesta a CDDP. En este caso tampoco se describieron reversiones en la muestra resistente.

También es importante mencionar que existían dos genes mutados en la muestra resistente, con funciones relacionadas y que interactuaban entre ellos: *TNFRSF10B* (69% en muestra resistente vs 0% en sensible) y *CASP8* (27% vs 0%). Los dos han sido relacionados con respuesta a CDDP por su papel en la activación de vías apoptóticas (Koch et al., 2013; Ouyang et al., 2013; Paul et al., 2012).

Finalmente, se encontró una mutación en el gen *SERPINE1* (o *PAI-1*) que, aunque poco frecuente (11%), nos pareció interesante puesto que se había postulado que variaciones en la expresión de este gen podrían estar relacionadas con supervivencia y respuesta a tratamiento en tumores testiculares, así como otros tipos de cáncer (de Haas et al., 2010).

#### **2.4. Perfil mutacional del caso 4 (TGT17, Chr)**

Se trataba de un tumor que presentaba resistencia *de novo*, es decir, que era resistente endógeno, en el paciente de origen. Destacaba la presencia de mutaciones en los genes *CLTCL1*, *CREB3L1* y *CRLF2* con una frecuencia del 100% en los tres casos. *CLTCL1* fue descrito en linfoma anaplásico de células grandes (ALCL) por estar translocado. Por su parte, *CREB3L1* se encontraba translocado con el gen *FUS* en mixofibrosarcoma. Finalmente, *CRLF2* presentaba una mutación *missense* en leucemia linfoblástica aguda de células B (B-ALL) y también se había descrito una translocación con *P2RY8* en ALL asociada

a síndrome de Down. Sin embargo, ninguno de estos genes había sido asociado anteriormente con cambios en la respuesta al CDDP.

Por otro lado, cabe destacar la mutación presente en el gen *CCNE1*, cuya desregulación proteica ya se ha asociado en otros estudios con quimioresistencia a CDDP (Etemadmoghadam et al., 2010) y que interacciona con otro gen que también presenta mutaciones en este tumor: *CDK12*. Mutaciones en ambos genes habían sido descritas previamente en tumores serosos de ovario, aunque en el caso del primer gen se trataba de una amplificación y en el segundo gen se habían reportado mutaciones *missense*, *nonsense* y cambios en la pauta de lectura.

## **2.5. Perfil mutacional del caso 5 (TGT44, TSE y Ter)**

En este caso, se trataba también de un tumor refractario endógeno. Presentaba cuatro genes con una frecuencia en las mutaciones cercana al 100% consistente en el tumor primario y el xenoinjerto crecido en ratones: *CREB3L1* (también presente en una frecuencia igual de alta en el TGT17, otro de los casos refractarios endógenos), *IL6ST* (mutaciones descritas en carcinoma hepatocelular), *ITK* (se habían descrito translocaciones con el gen *SYK* en linfoma periférico de células T) y *MLLT6* (translocado con el gen *MLL* en leucemia aguda).

Por otro lado, destacaban los genes *PMS2* (~70% de presencia), también presente en TGT49, y *FANCD2* (~20%) por haber sido relacionados anteriormente con modulación de la resistencia a CDDP (Marinovic-Terzic et al., 2008; Tomida et al., 2013; Zhang et al., 2010b).

## **2.6. Perfil mutacional del caso 6 (TGT47, TSE)**

En este tumor, ninguno de los genes reportados en nuestro estudio había sido relacionado anteriormente con resistencia a CDDP. Sin embargo, el gen *LCP1*, presente en CGC, había sido descrito en linfoma no-Hodgkin por presentar translocación con *BCL6*,

además de haberse postulado como marcador sérico en cáncer renal y haberse asociado también con cáncer de vejiga. Por otro lado, los resultados de la NGS mostraron la reversión del gen *ASMTL* en la muestra resistente.

### 2.7. Perfil mutacional del caso 7 (TGT49, Chr)

Este era el tercer caso de tumor con resistencia *de novo* en el paciente de origen. De entre los genes cuyas mutaciones eran más prevalentes, destacaba *CREB3L1* (95%) por estar mutado en muy alta frecuencia en las tres muestras refractarias endógenas. Algo similar ocurre con *CLTCL1* (mutaciones reportadas en TGT17 y TGT49).

Es importante destacar la presencia de mutaciones en tres genes que interaccionan entre ellos: *PALB2*, cuya mutación está presente en el 100% de la muestra, *PMS2*, también presente en TGT44, y *BRCA2* por su papel en vías de reparación del DNA, y por haberse descrito mutaciones en todos ellos en varios cánceres distintos, como tumor de Wilms, cáncer de mama y meduloblastoma en el caso de *PALB2* o la importancia de *BRCA2* en tumores de mama y ovario.

De manera similar, hay que mencionar la presencia de mutaciones en otros dos genes que también interactúan en su papel celular: *GNAS* (mutaciones en este gen se han relacionado con adenoma pituitario) y *TSHR* (relacionado con adenoma tiroideo tóxico, así como con el hipertiroidismo hereditario no autoinmune). Además, un polimorfismo del gen *GNAS* ha sido asociado con resistencia a CDDP en cáncer de esófago y en cáncer de pulmón de células grandes (Alakus et al., 2009; Xie et al., 2012).

### 2.8. Perfil mutacional del caso 8 (TGT38, Chr)

En este caso, los genes con mutaciones más frecuentes en el tumor resistente y exclusivas para este eran *SYVN1* (60% vs 0%), *CBLC* (52% vs 0%) y *HRCT1* (50% vs 0%). Además, para *CBLC*, CGC indicaba que existía evidencia de mutaciones en este gen relevantes en AML.

CGC también describe mutaciones en linfoma Hodgkin y linfoma primario mediastínico de células B en el gen *RALGDS*, presente en un 32% de la muestra resistente de este caso y cuyos niveles de expresión han sido relacionados con la eficacia de terapias combinadas de CDDP con anticuerpos anti-EGFR (Samakoglu et al., 2012).

Por otro lado, es interesante la presencia de un número elevado de genes con mutaciones revertidas en la muestra resistente, como era el caso de *MDM2* (relacionado con resistencia a CDDP) y *GNAS* (comentado en el caso TGT49).

## **2.9. Perfil mutacional del caso 9 (TGT34, CE)**

El gen que presentaba una mayor frecuencia en la mutación descrita mediante NGS era *PREP* (52% vs 0%), seguido de *EXOC4* (38% vs 0%), así como *FCGR3B* (100% vs 38%) y *CACNA1G* (86% vs ~40%), aunque ninguno de estos genes se había relacionado con resistencia a platino. En cambio, *REV3L* (25% vs 0%) sí podría jugar un papel en la sensibilidad de los tumores al tratamiento con componentes platinados (Doles et al., 2010; Sharma et al., 2012).

A destacar también la presencia de numerosos genes con mutaciones revertidas en la muestra resistente, como *PM20D1* (42% en muestra sensible vs 0% en resistente), *ADIPOR1* (~47% vs 0%) o *DHX9* (~45% vs 0%).

## **3. ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS MUTACIONES DESCRITAS EN CÉLULAS Y MUESTRAS DE TUMORES**

Finalmente, pensamos que sería interesante comparar el perfil mutacional descrito mediante NGS en la línea celular SuSa respecto al obtenido en los 9 casos de muestras de tumores, para observar si existían mutaciones coincidentes entre los dos modelos de estudio.

Al comparar las mutaciones revertidas en muestras de tumores resistentes con aquellas seleccionadas en SuSa S por haber sido revertidas en la línea pareada R, no se encontraron coincidencias.

Sin embargo, cuando se comparó el perfil mutacional de las células R respecto al de las muestras tumorales resistentes, se descubrieron 12 genes coincidentes, tal y como se puede apreciar en la **tabla 16**.

**Tabla 16.-** Listado de los genes descritos mediante la tecnología de NGS como portadores de mutaciones tanto en las células SuSa R como en las muestras de tumores resistentes.

Gen	Cons. SuSa R	Cons. tumor	Descripción
FER1L6	NSC	NSC (TGT1)	fer-1-like protein 6
SYNRG	SG	NSC (TGT1)	synergin, gamma
RYR2	NSC	NSC (TGT1)	ryanodine receptor 1 (skeletal)
SELP	NSC	NSC (TGT1)	selectin P (granule membrane protein 140kDa, antigen CD62)
DNAH10	NSC	NSC (TGT1)	dynein, axonemal, heavy chain 10
MLLT6	NSC	NSC (TGT44)	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 6
KLF12	NSC	NSC (TGT47)	Kruppel-like factor 12
MUC4	NSC	NSC (TGT38)	mucin 4, cell surface associated
MYO1C	NSC	NSC (TGT38) R	myosin IC
CACNA1G	NSC	NSC (TGT34)	calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1G subunit
REV3L	NMD	NSC (TGT34)	REV3-like, polymerase (DNA directed), zeta, catalytic subunit
CEP104	NSC	NSC (TGT34)	centrosomal protein 104kDa

Cons.: consecuencia; NSC: mutación no sinónima codificante; SG: stop ganado; NMD: *nonsense-mediated mRNA decay*; R: mutación revertida en el tumor resistente.

De los genes descritos, el que nos pareció más interesante y potencialmente relevante en el proceso de adquisición de resistencia fue *REV3L*, por su papel en el *bypass*

replicativo posterior al tratamiento con CDDP. Por otro lado, aunque no haya sido asociado directamente con resistencia a CDDP en la literatura, *RYR2* podría ser también interesante, puesto que parece jugar un papel en otros aspectos de la célula cancerosa, como la transición epitelio-mesénquima (Davis et al., 2013). Además, pertenece a una familia de canales de calcio que regulan la concentración citoplasmática de este catión y se cree que el CDDP regularía esta concentración evitando así la apoptosis producida por altos niveles de calcio en la célula, por lo que, en última instancia la desregulación de *RYR2* podría asociarse a cambios en la citotoxicidad del fármaco en las células. También *KLF12* podría ser un gen interesante, puesto que ha sido asociado con peor pronóstico en cáncer gástrico y parece tener propiedades oncogénicas. Finalmente, *CACNA1G*, cuya proteína forma parte de un canal de calcio dependiente de voltaje de tipo T, se ha relacionado anteriormente con la represión del crecimiento tumoral y la activación de apoptosis, y se objetivó que la inhibición de la expresión de este gen bloqueaba la apoptosis inducida por ciclofosfamida (Ohkubo and Yamazaki, 2012), por lo que su mutación también podría tener un papel en el efecto del CDDP sobre la viabilidad de las células tumorales.

## **OBJETIVO 4. Evaluación de la eficacia de la terapia combinada con cisplatino y un inhibidor de las PARPs en tumores testiculares refractarios al tratamiento convencional.**

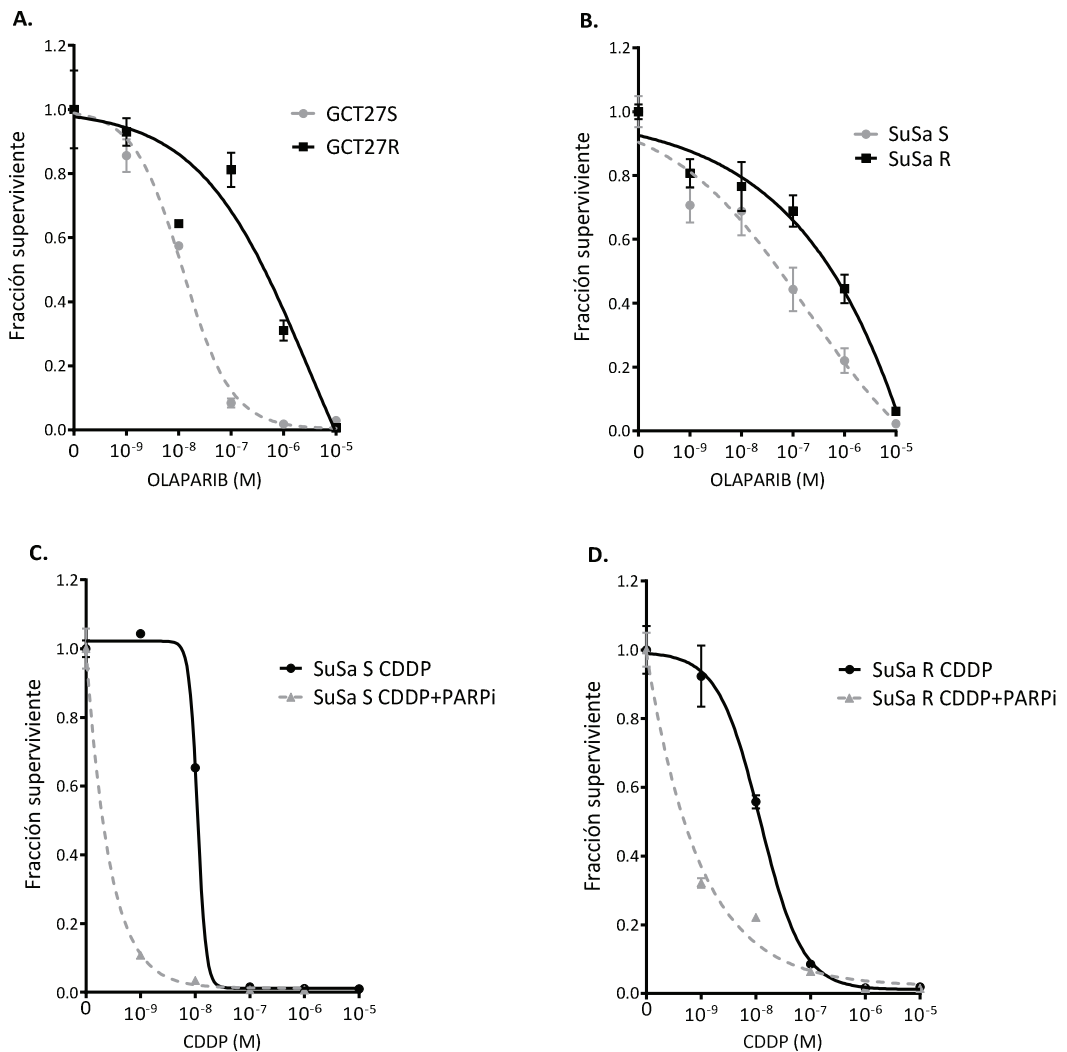
### **1. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR EN UNA LÍNEA PAREADA SENSIBLE vs RESISTENTE AL CDDP TRATADA CON LA COMBINACIÓN DE FÁRMACOS**

Debido a que, como se ha descrito ampliamente en la literatura, los tumores testiculares parecen ser defectivos en vías de reparación del DNA (principalmente en la vía de *nucleotide excision repair* o NER), y que la sobreactivación de alguno de sus componentes podría estar relacionada con la aparición de resistencia, pensamos que sería interesante testar el efecto de la combinación de CDDP (daño directo sobre el DNA) y un inhibidor de PARPs (PARPi), olaparib® (AstraZeneca), que podría tener un efecto sinérgico gracias a su función inhibidora de una vía de reparación que, en principio, parece ser funcional en TCGTs: el *base excision repair* (BER). Para testar la hipótesis del potencial terapéutico de esta combinación en tumores testiculares resistentes a QT convencional, el primer paso realizado fue probar la capacidad del olaparib de afectar la proliferación celular mediante ensayos de viabilidad de duración corta (1 semana) y larga (2 semanas) en las líneas de cáncer testicular pareadas sensibles (S) y resistentes (R) SuSa y GCT27.

El análisis de los datos obtenidos reveló que el olaparib era capaz de inhibir el crecimiento celular de una manera similar al CDDP en células S. En las células R, el patrón observado de muerte celular también era similar al producido por el CDDP.

A continuación, se quiso probar si la combinación de los dos fármacos sería capaz de sensibilizar las células R. Con esta finalidad, se repitieron los ensayos de viabilidad celular tratando las células con el rango habitual de concentraciones de CDDP pero añadiendo, 24 horas antes, olaparib en una concentración de 0,1  $\mu\text{M}$  al medio de cultivo. Este paso previo se realizó para asegurarse que las proteínas diana del olaparib ya no

serían funcionales al añadir el CDDP, para potenciar el efecto de la combinación. De esta manera, tal y como se puede observar en las gráficas C y D de la **figura 36**, éramos capaces de sensibilizar de manera significativa las células R. En el caso de las células S, el uso de la combinación producía una muerte celular tan acusada que, incluso con la concentración más baja de CDDP utilizada (0,1 nM), conseguíamos inhibir alrededor del 90% la viabilidad de estas células.



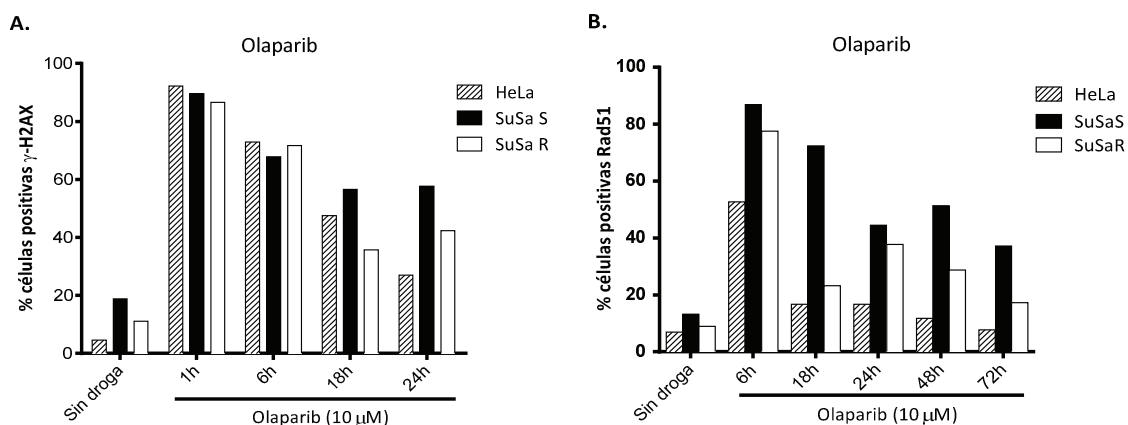
**Figura 36.-** Estudio de la viabilidad celular en un ensayo de formación de colonias en las líneas de cáncer testicular GCT27 (A) y SuSa (B) S y R tratadas con olaparib, y comparación del efecto sobre la viabilidad celular del CDDP sólo o en combinación con 0,1  $\mu$ M de olaparib en células SuSa S (C) y R (D).



## 2. EFECTO DE LA TERAPIA COMBINADA SOBRE LA CAPACIDAD CELULAR DE REPARAR LESIONES EN EL DNA

Después de observar que el tratamiento combinado con los dos fármacos disminuía la viabilidad celular tanto en células sensibles como resistentes a CDDP, nos preguntamos si la eficacia de la combinación estaría relacionada con cambios en la capacidad de las células de reparar lesiones producidas en su DNA. Una de las características del tratamiento con PARPi es la formación de focos de  $\gamma$ -H2AX, a causa de la producción de roturas de doble cadena en el DNA. Por otro lado, se sabe que la gran sensibilidad de las células con mutaciones en BRCA1 y 2 a los PARPi está causada, muy posiblemente, por un defecto en el reclutamiento de la recombinasa de DNA RAD51 en los sitios de daño del DNA. Esta proteína, que puede ser monitorizada mediante la visualización de focos nucleares por inmunofluorescencia, precede a la invasión de la hebra de DNA dañada como parte del proceso de recombinación homóloga (HR) para reparar DSB, lo cual permite evaluar la actividad de esta vía.

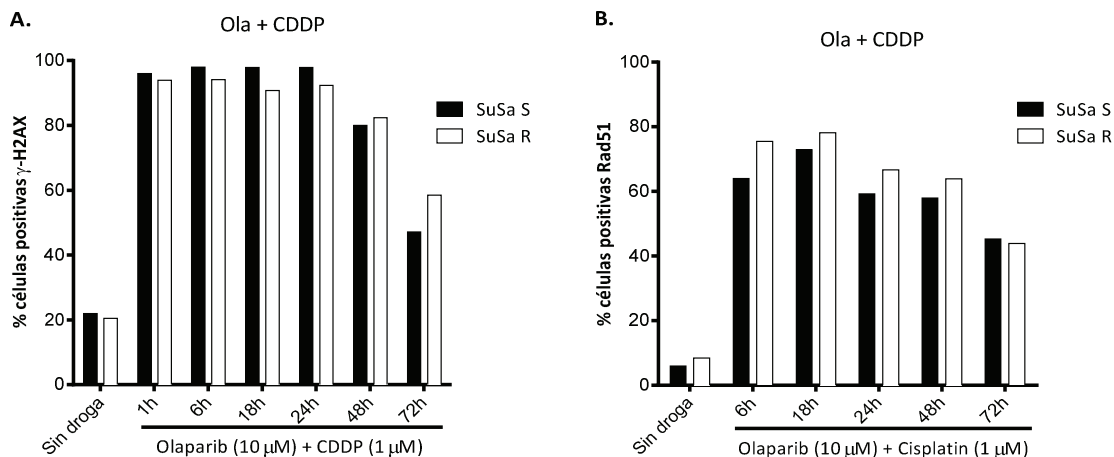
Con el objetivo de estudiar la capacidad de las células testiculares de señalar y reparar el daño, células SuSa S y R fueron tratadas con olaparib solo ( $10\mu\text{M}$ ) o en combinación con CDDP ( $10\mu\text{M}$  olaparib y  $10\mu\text{M}$  CDDP) y, a partir de ahí, se estudió la presencia de focos de señalización de daño ( $\gamma$ -H2AX) y de reparación de lesiones de doble cadena (RAD51).



**Figura 37.-** Porcentaje de células positivas respecto al total de contabilizadas por condición en células tratadas con olaparib durante 24 horas y posteriormente marcadas a diferentes tiempos para A)  $\gamma$ -H2AX; y B) RAD51.

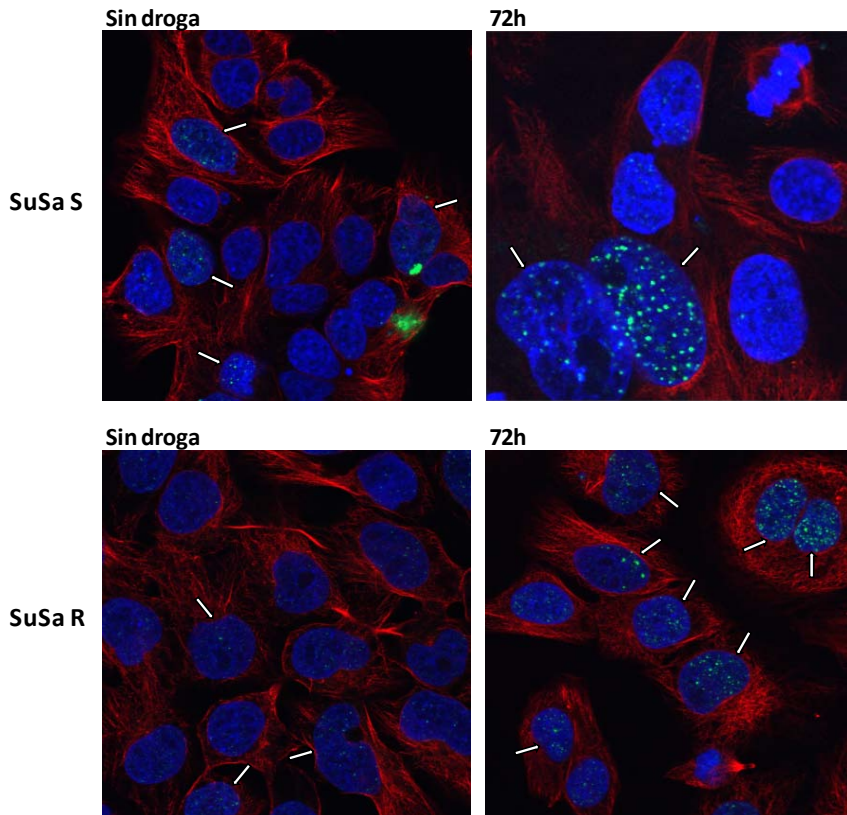
En los resultados obtenidos al tratar las células con olaparib (**figura 37**), se podía observar que la presencia de daño antes de tratar las células, según indican los focos de  $\gamma$ -H2AX, era mayor en la línea pareada de cáncer testicular respecto a las células HeLa, siendo esta diferencia más acusada en las células S, lo cual tiene sentido si tenemos en cuenta que estas células parecen tener los mecanismos de reparación del DNA defectivos (18,9% de células S positivas antes del tratamiento respecto 4,5% en HeLa). Así, incluso en condiciones normales, estas células presentarían daño en su DNA causado por la baja eficacia de sus mecanismos de reparación. Además, la presencia de focos de daño era más duradera a lo largo del experimento, principalmente en células S, demostrando que estas tardaban más en reparar las lesiones producidas en comparación con las células control HeLa.

Al estudiar mediante RAD51 la funcionalidad de la vía de la HR, observamos una marcada diferencia en el número de focos en células testiculares respecto a las control (HeLa) 6 horas después de eliminar el fármaco del medio de cultivo y a lo largo de todo el periodo de estudio. Así, 72 horas después de eliminar el fármaco del medio, las células S todavía tenían un 37,1% de la población positiva (13,2% en estado basal), respecto al 17,3% de sus pareadas resistentes y al 7,8% de las células control. Estos resultados parecían indicar que, aunque las células testiculares eran capaces de formar focos de reparación, los focos eran eliminados más lentamente, lo cual indicaría que presentaban defectos en la vía de la HR *downstream* de RAD51. Este hecho daría consistencia a la idea de probar la combinación de CDDP con olaparib en estos tumores, puesto que ya se había demostrado tanto a nivel preclínico (Rottenberg et al., 2008) como en ensayos clínicos (Tutt et al., 2010) que los tumores con defectos en esta vía eran sensibles a los PARPi.



**Figura 38.-** Porcentaje de células positivas (4 o más focos/célula) respecto al total de células contabilizadas para cada condición en células tratadas con la combinación de olaparib + CDDP un total de 24 horas y posteriormente marcadas a diferentes tiempos para A)  $\gamma$ -H2AX; y B) RAD51.

Finalmente, al estudiar el efecto del tratamiento combinado con olaparib y CDDP (**figura 38**), pudimos observar un patrón significativamente más acentuado en cuanto a  $\gamma$ -H2AX respecto al reportado con olaparib en monoterapia, ya que los focos de daño fueron más persistentes y se objetivó más cantidad de células positivas durante todo el estudio. Además, cabe remarcar que este incremento en el daño producido era especialmente marcado en células R puesto que, en este caso, el porcentaje de células dañadas se equiparaba al de sus pareadas S. En cuanto a RAD51, no vimos un incremento remarcable en la cantidad de focos de reparación en células S, lo cual indicaría que el insulto tóxico producido por olaparib ya sería capaz de llevarlas al límite de su capacidad de reparar estas lesiones. En cambio, en el caso de las células R, la combinación de drogas aumentó el número de lesiones producidas y su persistencia, hecho que podría potenciar, en última instancia, la activación de vías pro-apoptóticas en estas células y su eliminación debido a la incapacidad de reparar su DNA.



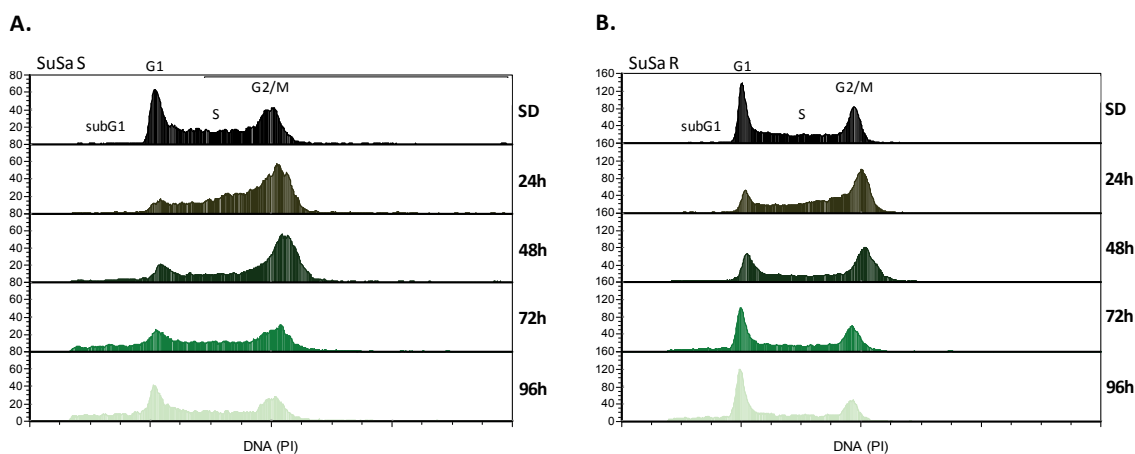
**Figura 39.-** Imágenes de focos de daño en el DNA de células SuSa S y R antes de tratarlas con la combinación de fármacos y 72 horas después de finalizar el tratamiento. Rojo: tubulina, verde:  $\gamma$ -H2AX, azul: DNA.

### 3. EVALUACIÓN DEL CICLO CELULAR EN CÉLULAS TRATADAS CON CDDP + OLAPARIB

Partiendo de estudios anteriores que habían descrito que el tratamiento con CDDP en células de cáncer testicular producía una parada en el ciclo celular primero en fase S y, horas más tarde, en G2/M, y que este fenómeno era más acusado cuanto más sensibles eran las células a la droga, quisimos estudiar las diferencias observables en células S y R (SuSa) comparando el tratamiento con CDDP + olaparib respecto al efecto con CDDP sólo. Además, la aparición de células en fase subG1 nos daría una idea preliminar de si la muerte celular se daba de manera temprana después del tratamiento

(lo cual indicaría que este produce un aumento directo de la apoptosis) o si aparecía de manera tardía (apuntando a un mecanismo de inhibición de las vías de reparación del DNA que, posteriormente, produciría señales más tardías de activación de la apoptosis). Con este objetivo, las células fueron tratadas con CDDP (1  $\mu\text{M}$ ) o la combinación de este con olaparib (1  $\mu\text{M}$  para ambas drogas), fijadas a diferentes puntos, su DNA teñido con el agente intercalante PI y estudiadas mediante citometría de flujo para observar los posibles cambios en el patrón de su ciclo celular.

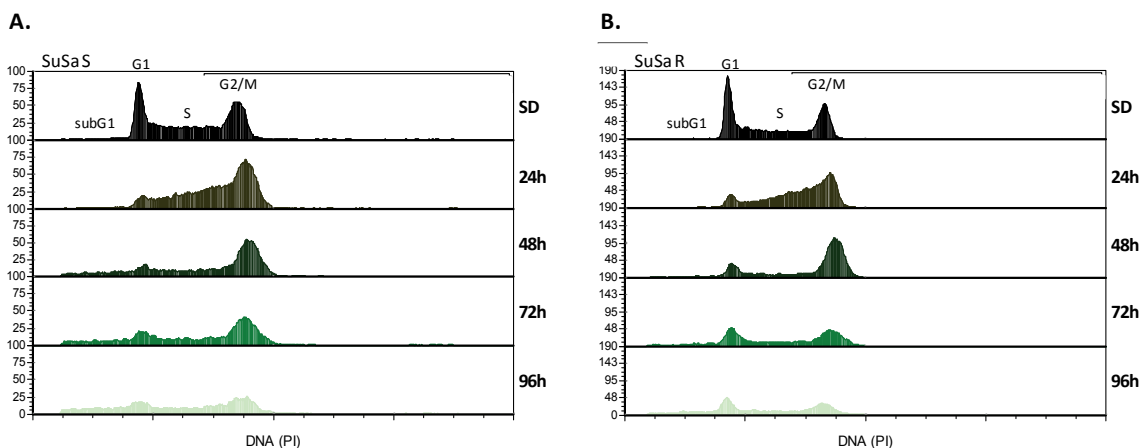
Los resultados obtenidos en el tratamiento con CDDP mostraban una marcada acumulación de las células en fase S y, posteriormente, en G2/M a partir de las 24 horas de adicionar el fármaco, siendo este fenómeno más evidente en células sensibles (**figura 40**). Además, se pudo observar que, incluso 96 horas después de iniciar el tratamiento, las células sensibles aún no habían sido capaces de recuperar un fenotipo completamente normalizado, acompañado de un porcentaje importante de células en subG1.



**Figura 40.-** Representación del ciclo celular mediante marcaje del contenido de DNA de las células con PI durante las 96 horas siguientes a la adición de CDDP al medio de cultivo de células SuSa S y R. SD: sin droga.

Al estudiar el efecto de la combinación de CDDP y olaparib, tal y como se muestra en la **figura 41**, se pudo observar un incremento sobre la parada del ciclo en fase S tardía y G2/M más drástico que el producido por el CDDP en monoterapia, sobretudo en el caso de las células R (posiblemente debido a que el CDDP ya producía un potente efecto sobre

las células S, por lo que era difícil observar un efecto mucho más marcado al utilizar la combinación). Además, a partir de las 48 horas se apreciaba una disminución progresiva en la población celular en ambos tipos celulares con un aumento concomitante de células subG1, lo cual podría apoyar la idea de que las células pararían el ciclo para intentar reparar las lesiones producidas por el CDDP y, al no ser capaces a causa del efecto del olaparib sumado a las deficiencias intrínsecas de estas células en los mecanismos de reparación, acabarían activando las vías apoptóticas.



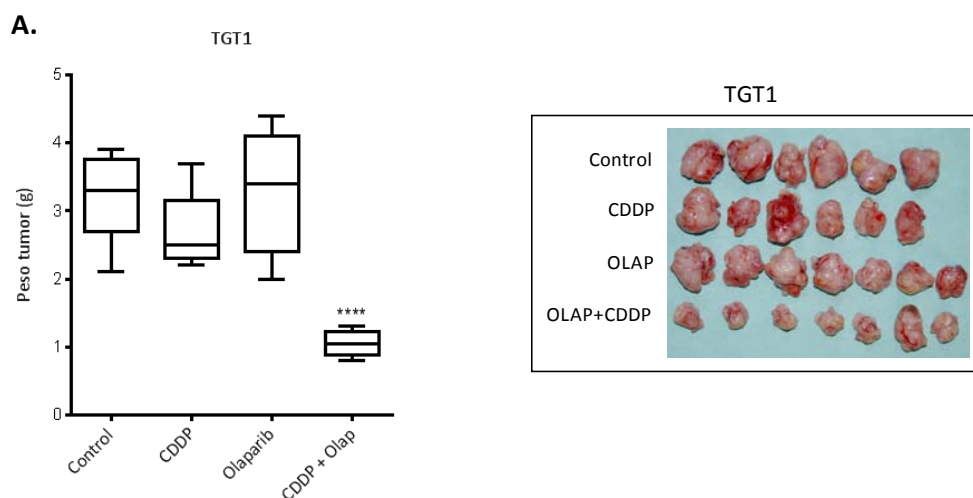
**Figura 41.-** Representación del ciclo celular mediante marcaje del contenido de DNA de las células con PI durante las 96 horas siguientes a la adición de la combinación de CDDP y olaparib a las células SuSa S y R. SD: sin droga.

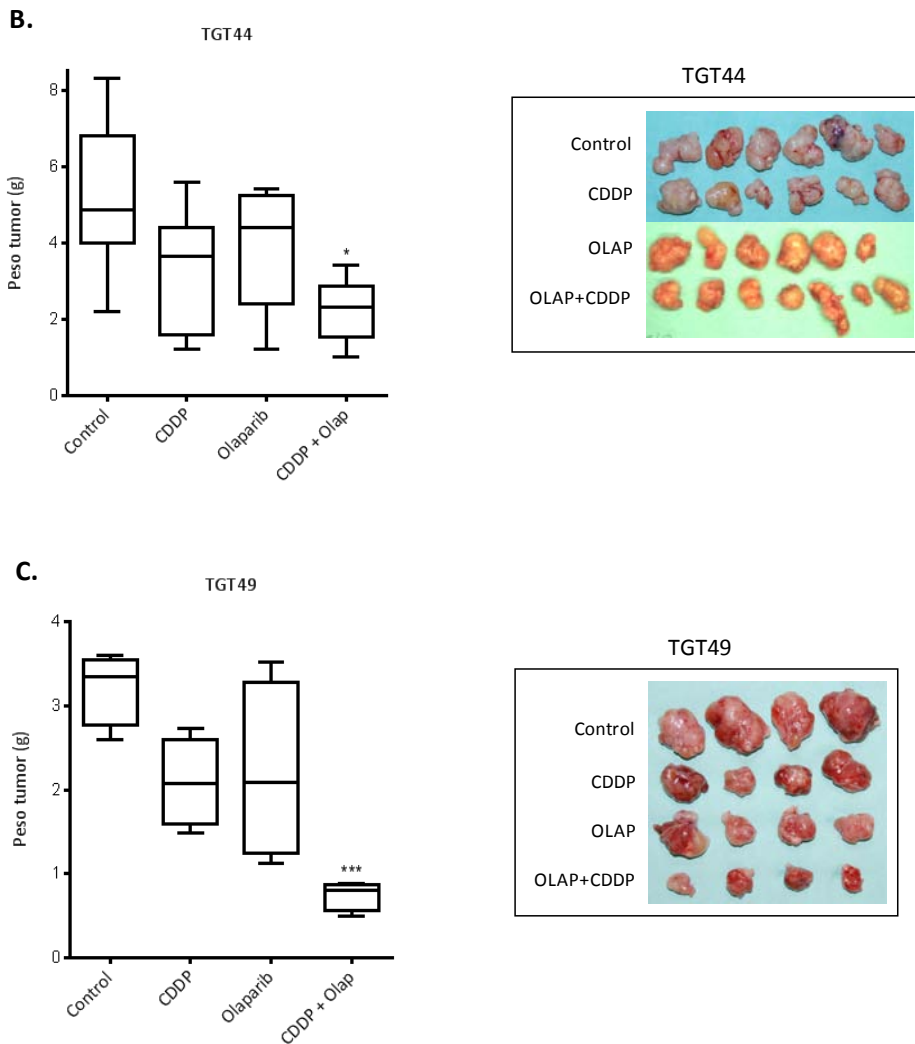
#### 4. EFICACIA DE LA COMBINACIÓN *IN VIVO* EN RATONES ATÍMICOS XENOINJERTADOS CON TUMORES REFRACTARIOS

Después de evaluar *in vitro* el efecto del tratamiento combinado en células de cáncer testicular sensibles y resistentes a CDDP, y obtener unos resultados que parecían indicar su potencial terapéutico, decidimos estudiar la eficacia del tratamiento en ratones atímicos xenoinjertados con tumores testiculares resistentes al CDDP. Con ese objetivo, 3 tumores resistentes, dos de los cuales eran refractarios endógenos en el paciente de origen y el tercero generado en el laboratorio mediante el protocolo descrito anteriormente de generación de tumores resistentes, fueron implantados en ratones

atímicos. Una vez obtenidas masas tumorales palpables, los animales fueron randomizados en los grupos pertinentes y tratados con CDDP, olaparib, CDDP + olaparib o suero salino (grupo control). Veintiocho días después del inicio del tratamiento, los animales fueron sacrificados y los tumores reseccionados, pesados y procesados para análisis posteriores (una parte fue criopreservada y otra embebida en parafina).

Los datos obtenidos mostraron una reducción significativa de los volúmenes tumorales asociada al tratamiento combinado respecto al grupo control tal y como se puede observar en la **figura 42**. El p-valor, representado mediante asteriscos en el grupo de tratamiento combinado, se obtuvo comparándolo al grupo control y corresponde al resultado de un test de ANOVA de múltiples comparaciones entre los diferentes grupos del experimento con post-estadístico Bonferroni. Por otro lado, en concordancia con lo que sugerían los resultados de los experimentos realizados *in vitro* en células resistentes, la administración de olaparib en monoterapia no producía ningún efecto terapéutico respecto al tratamiento con CDDP.



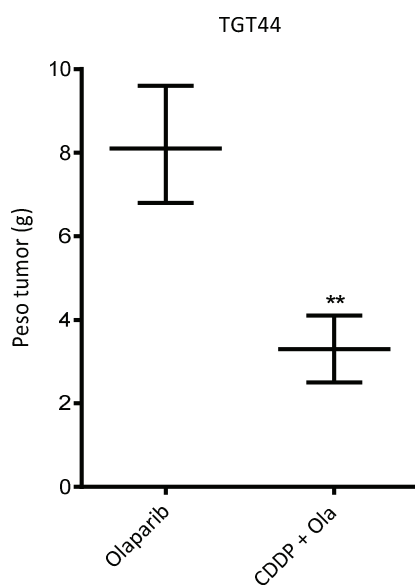


**Figura 42.-** Imágenes de los tumores reseccionados después de tratarlos durante 28 días con una de las dos drogas o con la combinación de ambas. También se muestran las gráficas con la media, el valor mínimo y el máximo de peso tumoral para cada grupo del estudio. A) tumor TGT1: tumor del seno endodérmico puro con resistencia adquirida; B) tumor TGT44: tumor mixto con componente teratoma y tumor del seno endodérmico refractario endógeno; C) tumor TGT49: coriocarcinoma puro refractario endógeno.

Por otro lado, en el caso del tumor TGT44, decidimos ampliar ligeramente la n (9 animales en vez de 6-7) de los grupos de tratamiento con olaparib y con la combinación de drogas para estudiar la velocidad de recrecimiento de los tumores una vez finalizado el tratamiento. Para ello, una vez terminados los 28 días de tratamiento convencional, la mitad de los animales de estos dos grupos no fueron sacrificados y se dejaron



estabulados hasta que tuvieron que ser sacrificados porqué el volumen tumoral de los animales que habían sido tratados con olaparib ya no permitía continuar el estudio. Como se puede apreciar en la **figura 43**, dos semanas después de finalizar el tratamiento, el volumen tumoral de los animales tratados con CDDP + olaparib había aumentado muy poco (~3 gramos respecto ~2,5 gramos en los animales que se sacrificaron al finalizar el tratamiento), mientras que los animales tratados con olaparib en monoterapia presentaban un aumento bastante significativo de la masa tumoral, habiendo duplicado su peso (de ~4 a ~8 gramos).

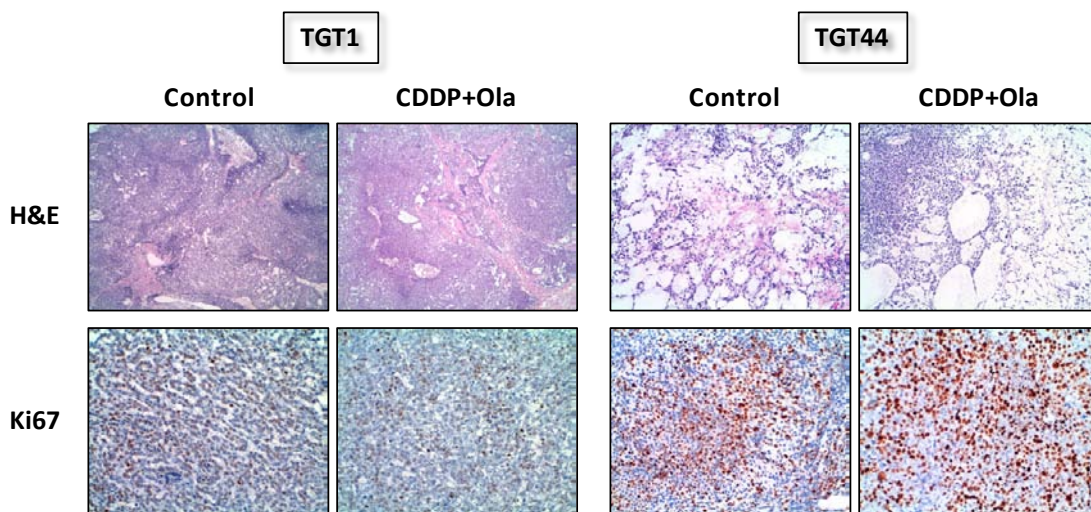


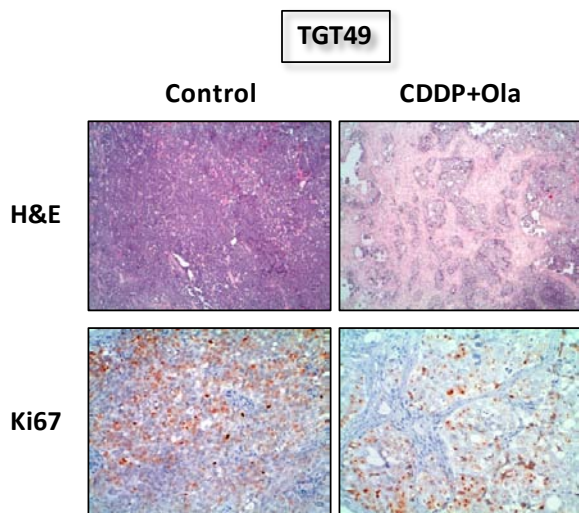
**Figura 43.-** Representación gráfica del peso de los tumores en el momento del sacrificio de los animales, dos semanas después de terminar el tratamiento con las drogas. La comparación entre ambos grupos se realizó mediante t-test, del que se obtuvo un p-valor de la diferencia entre las medias entre 0,001 y 0,01.

Después de sacrificar los animales y extraer los tumores, estos fueron procesados como se ha comentado, obteniendo portaobjetos con láminas de tumor embebido en parafina a partir de las cuales se realizó H&E e IHQ de Ki67. Estas muestras fueron valoradas por el patólogo August Vidal, del departamento de anatomía patológica del Hospital de Bellvitge.

Los resultados de la H&E indicaron que en ninguno de los 3 se observaba un cuadro de necrosis ni fibrosis total del tejido. Por otro lado, tampoco se objetivó una evolución a masas residuales de teratoma maduro, sino que los 3 casos presentaban áreas de células tumorales viables con la misma histología que el tumor inicial, principalmente alrededor de los vasos sanguíneos del tumor (**figura 44**). Sin embargo, aunque no era completa, el tumor TGT49 mostraba un cuadro de fibrosis generalizada en el grupo de tratamiento combinado, no presente en los grupos de tratamiento en monoterapia ni en el grupo control, por lo que, parecía que el tratamiento había ejercido un efecto terapéutico considerable, por lo que cabe la posibilidad que alargando el tratamiento unos días más hubiéramos conseguido eliminar completamente la masa tumoral residual.

En cuanto a Ki67, cuya expresión indica la presencia de células proliferativas, no se objetivó una reducción significativa en el número de células positivas entre las muestras control y aquellas tratadas con los fármacos en ninguno de los casos, aunque se observó un ligero descenso del marcador en las muestras tratadas con la combinación. Esto indicaría que el tratamiento con la combinación no era capaz de suprimir de manera completa la capacidad proliferativa de aquellas células que aún eran viables al finalizar el tratamiento.





**Figura 44.-** Caracterización histológica de los 3 tumores refractarios implantados en ratones y tratados con la combinación de fármacos. La fila superior de imágenes muestra H&E realizadas en un corte de tumor control (no tratado) y uno tratado con CDDP + olaparib para cada uno de los casos. El panel inferior muestra la IHQ para Ki67.



## **DISCUSIÓN**



## 1. MECANISMOS GENÉTICOS DE ADQUISICIÓN DE RESISTENCIA A CISPLATINO EN TUMORES TESTICULARES

Desde la introducción del CDDP en la clínica a finales de los años 70, las tasas de curación de muchos tumores sólidos han aumentado de manera sustancial. En concreto, en el caso de los tumores germinales testiculares, las tasas actuales de supervivencia a largo plazo de los pacientes superan el 80% (de Haas et al., 2010). Sin embargo, la aparición de resistencia a lo largo del tratamiento, o la falta de respuesta a este en TCGTs metastásicos, se asocia con un mal pronóstico. A pesar de una segunda ronda de tratamiento con dosis intensivas de quimioterapia (QT), resección quirúrgica agresiva y/o tratamiento paliativo con otros agentes, la mortalidad en este grupo de pacientes es elevada (Feldman et al., 2011). Estos pacientes refractarios o con recidiva tumoral son normalmente adultos jóvenes, por lo que su muerte se produce más de una década antes respecto a cualquier otro tipo de cáncer en adultos. Por este motivo, el estudio y la comprensión de los mecanismos mediante los cuales los tumores consiguen evadir los efectos citotóxicos del CDDP es de vital importancia para mejorar la efectividad de las terapias actuales, así como para definir nuevas estrategias de tratamiento, útiles tanto en TCGTs como otros tumores tratados con CDDP. Además, el descubrimiento de marcadores asociados a resistencia permitiría la aplicación racionalizada de terapias adecuadas para cada paciente, evitando el sobretratamiento innecesario de estos, lo que supondría grandes mejoras en la calidad de vida de los enfermos.

Los TCGTs son un modelo único para el estudio de los mecanismos moleculares relacionados con la respuesta y resistencia a CDDP debido a su extraordinaria sensibilidad a este fármaco (Duale et al., 2007; Noel et al., 2008). Estos mecanismos han sido estudiados extensamente, permitiendo la caracterización de esta sensibilidad como un evento multifactorial donde parece jugar un papel importante la gran susceptibilidad a entrar en apoptosis al presentar niveles intrínsecos elevados de p53 *wild type* y una ratio alta de proteínas proapoptóticas respecto a las antiapoptóticas de la familia Bcl2. A esto, hay que sumar la existencia de deficiencias en mecanismos de reparación de lesiones

producidas en el DNA de estas células. En general, parece que esta sensibilidad estaría relacionada con las características embrionarias que mantienen estos tumores de células germinales, lo cual también explicaría por qué los teratomas, siendo el único subtipo totalmente diferenciado y que ha perdido por completo los rasgos embrionarios, presentaría resistencia intrínseca al CDDP (Looijenga et al., 2011; Schrader et al., 2009).

En cuanto al fenómeno de aparición de resistencia al fármaco, se sabe que existen diferentes vías por las que una célula tumoral es capaz de sobrevivir al insulto citotóxico producido por el CDDP: evitar la llegada de una cantidad suficiente de fármaco a su principal diana terapéutica (esto es, el DNA), o bien evitar la muerte celular una vez que la droga se ha unido al DNA mediante incremento de la capacidad de reparación de lesiones en el material genético o evadiendo los estímulos que producen muerte celular por apoptosis. Sin embargo, no existe consenso en la importancia o el papel de cada uno de estos mecanismos en el proceso de adquisición de resistencia en estos tumores, lo cual dificulta la aplicación racional de nuevas terapias en pacientes que no responden al tratamiento convencional.

### **1.1. Estudio de mutaciones asociadas al fenotipo resistente**

Aunque existen estudios genómicos globales en los que se han comparado líneas celulares de cáncer testicular pareadas con respuesta diferencial a CDDP (Noel et al., 2008; Wilson et al., 2005) o bien muestras procedentes de pacientes con diferentes grados de respuesta al tratamiento (Rao et al., 1998), estos se han basado principalmente en estudios de hibridación genómica comparada (CGH) o de patrones de expresión, pero hasta la fecha no existe ninguno que haya utilizado tecnologías de secuenciación masiva o de última generación (NGS) del genoma para caracterizar los cambios a nivel mutacional entre muestras o líneas celulares sensibles y resistentes al CDDP. Es por eso que decidimos utilizar esta novedosa y potente tecnología para analizar las mutaciones que pudieran intervenir en la adquisición de resistencia a esta droga en TCGTs.



La primera aproximación realizada fue la utilización de líneas celulares de cáncer testicular pareadas sensibles (S) y resistentes (R) a CDDP. Al tener ambos tipos de células el mismo *background* genético, ya que las células R derivaban de sus pareadas S, pensamos que sería un buen modelo para estudiar las mutaciones asociadas al proceso de adquisición de resistencia, puesto que evitábamos la variabilidad genética propia intertumoral. El uso de la tecnología de NGS nos permitió obtener una visión global comparativa de las mutaciones presentes en el exoma de células sensibles y aquellas encontradas en sus derivadas resistentes, consiguiendo una idea general de los cambios a nivel genético que pudieran tener un papel en la adquisición de resistencia. Así, se obtuvo una lista exhaustiva de las mutaciones que afectaban a las regiones codificantes del genoma de estas células. La presencia de mutaciones era significativamente más elevada en las células R, tal y como cabría esperar teniendo en cuenta que la hipótesis de trabajo era que estas células habrían adquirido mutaciones que les permitirían sobrevivir al insulto citotóxico causado por el CDDP.

Sin embargo, también observamos que se daba el fenómeno opuesto, es decir, la existencia de mutaciones exclusivas en las células parenterales S que habían sido revertidas en células R. Esto podría deberse al hecho de que estas mutaciones harían que las células S fueran más proclives a sucumbir a los efectos antiproliferativos del CDDP, por lo que su reversión daría una ventaja adaptativa a las células R, haciéndolas más resilientes al efecto del fármaco.

Una vez obtenidos los resultados y desechados aquellos cambios genéticos presentes en ambas líneas celulares o que no cumplieran los criterios descritos, aún era necesario discernir las mutaciones realmente implicadas en la adquisición de resistencia, o conductoras (*driving mutations*), de todas aquellas pasajeras (*passenger mutations*) que se hubieran producido por azar pero que no estuvieran realmente implicadas en la respuesta celular al fármaco. Con este propósito, se llevó a cabo un *screen* con siRNAs, en el que cada uno de los genes seleccionados del experimento de NGS como potencialmente interesante, fue inhibido de manera individualizada en el contexto de células S y R tratadas con CDDP. De esta manera, se pretendía evaluar aquellos genes

cuya infraexpresión modulara *in vitro* la capacidad de las células de sobrevivir al efecto citotóxico de la droga. Además, siendo conscientes de que no siempre es necesaria la presencia de mutaciones para que existan cambios en la funcionalidad de un gen y su proteína resultante, como demuestran, por ejemplo, los efectos de la hipo e hipermetilación de los promotores sobre los niveles de expresión génica (Berdasco and Esteller, 2010; Okamoto, 2012), en el *screen* se utilizaron también siRNAs para disminuir la expresión de los principales genes implicados en vías de reparación del DNA, así como supresores tumorales. Los resultados obtenidos, una vez analizados los datos y seleccionados aquellos genes cuya inhibición fuera capaz de sensibilizar las células R sin afectar la viabilidad de sus pareadas S, mostró que la mayoría de los *hits* eran portadores de mutaciones que habíamos descrito anteriormente mediante NGS, lo cual indicaría que la adquisición de mutaciones es un mecanismo importante en el desarrollo de resistencia.

Sin embargo, es de notar que los genes cuyo *knock-down* (KD) sensibilizaba las células R presentaban mutaciones, precisamente, en estas células R. Esto parecería indicar que se trataría de mutaciones activantes en estos genes lo que daría una ventaja adaptativa a estas células R al ser tratadas con el fármaco, por lo que la inhibición de la expresión del gen realizada con el siRNA produciría la sensibilización observada. Un ejemplo descrito en la literatura, de este fenómeno, serían las mutaciones puntuales activantes que se han caracterizado en *c-KIT* en tumores testiculares y que producen una activación constitutiva del receptor (Roberts et al., 2007).

De los 3 genes posteriormente revalidados, *ALX homeobox 4 (ALX4)* era portador de una mutación en las células R. Este gen codifica para un factor de transcripción. Se ha descrito que mutaciones en su secuencia nucleotídica producen, entre otros síntomas, hipogonadismo. Además, ha sido relacionado con el Síndrome de Potocki-Shaffer que se caracteriza por provocar, entre otros, anomalías genitales en hombres. También cabe destacar que el estado de metilación de este gen ha sido propuesto como marcador en *screens* para la detección temprana de cáncer de colon, así como factor pronóstico en cáncer gástrico (Chen et al., 2012; Ebert et al., 2006). La pérdida de este gen también se ha asociado con cáncer de mama (Chang et al., 2009). En la literatura, no existen estudios

que indiquen algún tipo de relación entre este gen y la respuesta tumoral a CDDP. Pero, aunque no parezca existir una correlación directa entre este *hit* y la aparición de resistencia al fármaco, sería interesante profundizar más en el posible papel de esta proteína en este fenómeno.

Por otro lado, es importante tener en cuenta que pueden haber otros genes en los que hemos descubierto mutaciones mediante secuenciación masiva que, pese a no haber sido seleccionados como genes candidatos una vez realizado el *screen*, podrían tener un papel en la adquisición de resistencia. Se trata de un fenómeno multifactorial, por lo que la inhibición aislada de algunos de estos genes podría no ser suficiente para ver un cambio muy evidente en la viabilidad celular, aún pudiendo contribuir de manera aditiva al fenotipo final resistente.

En el caso de *Fanconi anemia, complementation group A (FANCA)* y *SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1 (SMARCB1)*, aunque no se describieron mutaciones en el genoma de las células S ni R en la NGS, los resultados del *screen* parecen indicar su papel en la adquisición de resistencia. Como se ha comentado anteriormente, la desregulación de estos genes podría ser debida a hipo o hipermetilación anormal de sus promotores, desregulación de miRNAs que tengan alguno de estos genes como diana, etc. Tampoco se puede descartar la presencia de una amplificación en la región cromosómica donde se encuentran estos genes. De hecho, existe literatura en la que se describen cambios a nivel cromosómico y/o desequilibrios alélicos en las regiones que contienen ambos genes en TCGTs, esto es, 16q24 en el caso de *FANCA* y 22q11 en el de *SMARCB1* (Bergthorsson et al., 2006; Korkola et al., 2008; McIntyre et al., 2004; Wilson et al., 2005). También en los *arrays* de CGH (aCGH) realizados con anterioridad en nuestro grupo, se describieron ganancias en la región 22q11 en 1 de los 4 tumores testiculares estudiados.

*FANCA* codifica para una proteína implicada en señalización y reparación de puentes cruzados entre cadenas del DNA (ICL, del inglés *interstrand crosslinks*), además de en el mantenimiento de la estabilidad cromosómica, entre otras funciones. Se sabe

que el CDDP produce ICLs en el DNA y, aunque son el tipo de lesión menos frecuente, varios autores postulan que juegan un papel muy importante en la citotoxicidad generada por esta droga (Ben-Yehoyada et al., 2009; Cavallo et al., 2012; Zhu et al., 2013). Por eso, la sobreactivación de esta proteína en células R ayudaría a las células a reparar las lesiones de manera más eficiente, favoreciendo así su supervivencia. Consecuentemente, la inhibición de la expresión mediante siRNAs desembocaría en la sensibilización de las células, tal y como observamos en el presente trabajo. Además, en el estudio realizado por *Wilson y cols.* en líneas celulares de TCGTs, ya se describió la relevancia de la amplificación y/o sobreexpresión de genes de la región cromosómica 16q en la adquisición de resistencia a CDDP (Wilson et al., 2005). Esto sugiere la importancia en este proceso de algún/os gen/es presentes en esta región. Por lo tanto, *FANCA* parece jugar un papel relevante en los mecanismos de resistencia a esta droga.

En el caso de *SMARCB1*, también conocido como *SNF5/INI1*, se trata de un gen supresor de tumores, cuya proteína funciona como parte de un complejo de remodelación de la cromatina (SWI/SNF). Este complejo parece modular la reparación del DNA, permitiendo la accesibilidad de las proteínas de reparación a los sitios de daño, además de participar en la regulación de la transcripción de varios genes (tanto reprimiendo como activando) (Ray et al., 2009). Varios estudios indican que este complejo desempeña un papel esencial en la reparación por escisión de nucleótidos (NER) que, como ya se ha comentado, es el principal mecanismo encargado de la reparación de lesiones en el DNA producidas por el CDDP. Se ha objetivado que la presencia de nucleosomas en el DNA inhibe la actividad reparadora de lesiones causadas por CDDP mediante el NER (Hara et al., 2000). Esta inhibición del NER, mediada por la presencia de nucleosomas, parece ser contrarrestada gracias a la actividad del complejo SWI/SNF, que es activado cuando se detecta daño en el DNA de la célula a través de varias proteínas de la vía del NER, como *xeroderma pigmentosum, complementation group A* (XPA) y *xeroderma pigmentosum, complementation group C* (XPC) (Hara and Sancar, 2002). Por lo tanto, un aumento en la actividad de esta proteína podría incrementar la capacidad celular de reparar los daños en el DNA producidos por la droga, por lo que podría tener

un rol importante en la adquisición de resistencia. Por estos motivos, tal y como ya sugirieron *Rabik y Dolan*, la inhibición del complejo SWI/SNF podría convertirse en una estrategia para la sensibilización de tumores a CDDP y otros agentes que dañan el DNA (Rabik and Dolan, 2007).

Sin embargo, uno de los principales factores limitantes del estudio con líneas celulares es el hecho de llevar años creciendo *in vitro*, lo cual puede favorecer la aparición de mutaciones y cambios a nivel cromosómico no presentes en el tumor de origen. A lo que hay que sumar la poca cantidad y variedad de líneas celulares disponibles representativas de esta enfermedad. Además, en los tumores germinales testiculares, existen diferentes subtipos con características propias y diferenciales, por lo que la aparición de resistencia podría darse por mecanismos diferentes en cada uno de los tipos. Incluso dentro de un mismo subtipo, cada tumor podría desarrollar mecanismos diferentes para conseguir el mismo fin: evitar la muerte celular provocada por la droga. Por lo tanto, con el propósito de abordar de una forma más global este tema, a la vez que mimetizar de una manera más precisa y reproducible la situación clínica real, se generó un modelo ortotópico murino (orthoxenografts) en el que los animales eran xenoinjertados con tumores primarios procedentes de pacientes con TCGTs. Posteriormente, estos tumores que crecían en los ratones fueron tratados con concentraciones crecientes de fármaco hasta la obtención de tumores resistentes. A continuación, se procedió a la secuenciación masiva de los genomas de los 6 casos de los que disponíamos, con el objetivo de estudiar la evolución del estado mutacional de los tumores a lo largo del proceso de adquisición de resistencia al CDDP. Salvo excepciones, cada caso contenía muestras de origen de los pacientes, los xenoinjertos sensibles generados y sus derivados resistentes. El estudio también incluía tres muestras de tumores refractarios endógenos en el paciente de origen. De esta manera, pudimos estudiar el fenotipo resistente a partir de las dos posibles situaciones que existen en la clínica: la aparición de resistencia a lo largo del tratamiento y la resistencia *de novo* de tumores que no responden al tratamiento desde un principio. Esta aproximación es novedosa respecto al resto de trabajos publicados por dos motivos principales: por un

lado, es la primera vez que se genera un modelo preclínico de orthoxenografts con resistencia adquirida a CDDP en TCGTs. Este modelo tiene una gran utilidad a la hora de estudiar los mecanismos asociados a la adquisición de resistencia, puesto que esta se ha generado *in vivo*, al igual que sucede en la clínica. Además, en otros trabajos, ya hemos demostrado la eficacia del modelo en ensayos preclínicos para estudiar el efecto de nuevos fármacos o combinaciones en tumores refractarios (Juliachs et al., 2013). Por otro lado, ningún estudio previo había utilizado la tecnología de NGS para caracterizar el perfil mutacional asociado a tumores sensibles-resistentes de TCGTs, lo cual nos puede ayudar a entender este proceso de una manera más global e íntegra.

Una vez analizados los datos procedentes de la NGS, los resultados obtenidos nos permitieron demostrar, una vez más, que el modelo de orthoxenografts generado es una herramienta válida y representativa de los tumores primarios de los que se originan, puesto que la clasificación no supervisada de las muestras según estudio de SNPs agrupó los xenoinjertos con sus muestras de tumor primario pertinentes en todos los casos.

Al estudiar las mutaciones concretas de cada caso de manera individualizada y compararlas con el resto de casos, los resultados parecían indicar que el fenómeno de aparición de resistencia en tumores testiculares puede acaecer por diferentes vías, y que no existe un patrón de mutaciones en genes concretos que defina de manera generalizada este proceso, ya que, en general, no se objetivaron mutaciones recurrentes en ningún gen entre los diferentes casos. La única excepción son los tumores refractarios endógenos, que sí compartían mutaciones en unos pocos genes. Entre estos, el que nos pareció más interesante fue *postmeiotic segregation increased 2 (PMS2)*, mutado en TGT44 y TGT49, exactamente en la misma posición del gen y produciendo el mismo cambio de aminoácido en la proteína resultante. Este gen participa en la vía del MMR, produciendo señales proapoptóticas en respuesta a daño en el DNA causado por CDDP. Por lo tanto, mutaciones inactivantes en este gen producirían defectos en la activación de la apoptosis, afectando así a la respuesta de las células a la droga. Así, el estudio realizado por *Marinovic-Terzic y cols.* ya demostró que la presencia de una mutación en R20Q en

este gen era capaz de disminuir la respuesta apoptótica de las células al tratarlas con CDDP (Marinovic-Terzic et al., 2008).

Sin embargo, hay que puntualizar que en el caso de los tumores refractarios endógenos, se trata de un sistema menos controlado, ya que los pacientes han recibido varias líneas de QT con combinaciones de varios fármacos, por lo que es más complicado definir mutaciones estrictamente asociadas a la adquisición de resistencia al CDDP. Así, creemos que los tumores resistentes generados en orthoxenografts son un sistema más controlado y representativo de este fenómeno, ya que han sido tratados únicamente con el fármaco en estudio.

Por otro lado, al analizar de manera conjunta todas las mutaciones seleccionadas de los 9 casos estudiados, sí se pudieron definir ciertos patrones mutacionales convergentes, es decir, diferentes genes mutados dentro de una misma vía o con funciones celulares relacionadas entre sí. Sería el caso de la familia de los receptores olfativos, donde diferentes miembros aparecen mutados en casi todas las muestras resistentes estudiadas. Este resultado nos pareció sorprendente y difícil de asociar con la adquisición del fenotipo resistente y, a día de hoy, no podemos descartar que se trate de un falso positivo. Podría deberse al hecho de que se trata de la familia que engloba mayor número de proteínas conocida en el genoma humano (Veerappa et al., 2013), por lo que la probabilidad de obtener mutaciones de manera aleatoria es bastante alta. Otros factores como ser genes que se replican de manera tardía durante la duplicación del material genético, también ha sido sugerido como factor que los hace más proclives a las mutaciones (Lawrence et al., 2013). Además, podría tratarse de genes que no se expresan, lo cual favorecería la presencia de mutaciones sin que estas tuvieran ningún papel en la adquisición de resistencia. Sin embargo, algunos estudios han demostrado la expresión ectópica de receptores olfativos en testículo, espermatozoides y células germinales primordiales, por lo que no se puede descartar completamente que tengan algún tipo de función en la adquisición de resistencia (Flegel et al., 2013; Kang and Koo, 2012; Vanderhaeghen et al., 1997).

Este análisis mutacional conjunto indicó otro nódulo de genes mutados con funciones relacionadas. Se trata de genes implicados en vías de reparación del DNA, así como de activación de la apoptosis, como es el caso de *BRCA2*, *FANCD2* y *PARP1*, todos ellos implicados en el reconocimiento de daños en el DNA y/o la reparación de las lesiones producidas. Mutaciones activantes en estos genes podrían estar relacionadas con una mayor capacidad de procesar las lesiones producidas por el fármaco en el material genético de las células, haciéndolas menos sensibles a los efectos del CDDP.

También cabe destacar la mutación descubierta en *mutS homolog 3 (MSH3)*, gen que codifica para un miembro de la vía de *mismatch repair* (MMR), por lo que sería plausible que ejerciera algún tipo de efecto sobre la respuesta al fármaco. El estudio realizado por Francia y cols. ya apuntaba al papel de la reducción de varias proteínas de esta vía, entre las que se incluye MSH3, en la aparición de resistencia a CDDP (Francia et al., 2005).

*REV3-like, polymerase (DNA directed), zeta, catalytic subunit (REV3L)*, mutado diferencialmente en una de las muestras de tumor resistente, también podría intervenir en la adquisición de resistencia en TCGTs, ya que se trata de la subunidad catalítica de la polimerasa  $\zeta$ , que tiene una función importante en el *bypass* replicativo. A diferencia de las polimerasas clásicas, como la  $\alpha$  o la  $\theta$ , la  $\zeta$  permite a la célula saltar el aducto formado por el CDDP en el DNA y continuar con la replicación del material genético. Mutaciones activantes en este gen permitirían a la célula ser mucho más eficiente en este mecanismo, escapando, así, de la muerte celular causada por la droga. Además, este gen también presentaba mutaciones en la línea celular SuSa R, lo cual daría más fuerza a la hipótesis de su implicación en la resistencia al fármaco.

Además, tenemos las ya mencionadas mutaciones en genes directamente relacionados con vías apoptóticas, como es el caso de *CASP8* y *TNFRSF10B*. Caspasa 8 es la primera proteína efectora de la vía apoptótica iniciada por Fas y FasL, que se activa mediante p53 cuando existe daño en el DNA. Estudios previos ya observaron que la inhibición de la acción de esta caspasa mediante la droga zIETD-fmk reducía la toxicidad



celular inducida por CDDP en TCGTs (Spierings et al., 2003). Este mismo grupo afirma, además, que la vía de Fas estaría inactivada en tumores testiculares resistentes. Así mismo, *tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b (TNFRSF10B)*, también conocido como *DR5*, podría jugar un papel en la resistencia, ya que se ha demostrado que el incremento de la expresión de este gen y *CASP8* mediado por salinomicina reactivaría la apoptosis en células resistentes a CDDP de cáncer de ovario (Parajuli et al., 2013). Por lo tanto, la presencia de mutaciones inactivantes en estos dos genes podría ser un factor importante en la adquisición de resistencia.

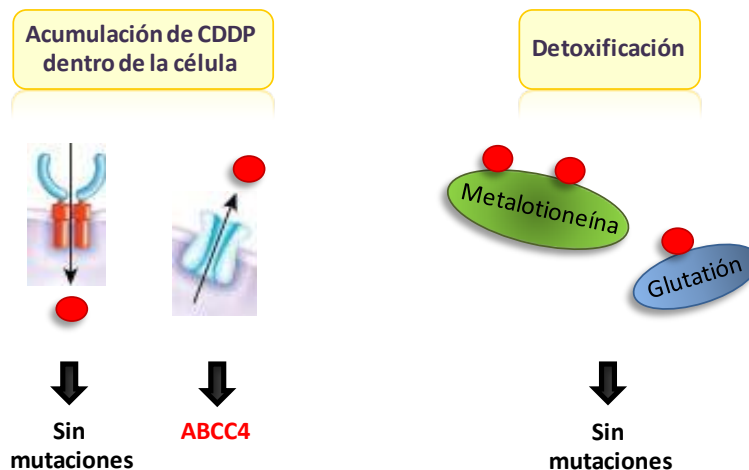
En el presente estudio no hemos detectado mutaciones, en las muestras sensibles al fármaco, en genes que participan directamente en la actividad de la vía del NER, principal mecanismo de reparación de las lesiones producidas por el CDDP y cuya baja expresión o funcionalidad de sus componentes, como sería el caso de *ERCC1*, *XPA* y *XPF*, ha sido descrita como una de las posibles causas de la alta sensibilidad de los TCGTs a terapias que dañan el DNA (Koberle et al., 1999; Welsh et al., 2004). Este hecho podría deberse a que la expresión de estos genes se vea modificada por otros mecanismos, como podrían ser las deleciones cromosómicas, regulación epigenética, o mecanismos postraduccionales como una mayor degradación o inhibición de su actividad mediante proteínas reguladoras.

Es importante mencionar que no se han descrito mutaciones en *tumor protein p53 (TP53)* en ninguna de las muestras, lo que está en línea con la opinión generalizada de que las mutaciones en este gen no son responsables de la adquisición del fenotipo resistente en estos tumores (Bauer et al., 2010; Cavallo et al., 2012; Hussain et al., 2008). Sin embargo, cabe destacar que uno de los tumores (TGT38) presentaba una mutación en la muestra sensible revertida en la muestra resistente en *MDM2 oncogene, E3 ubiquitin protein ligase (MDM2)* dentro del motivo de hélice superenrollada de la proteína para la que codifica. Esta proteína ha sido descrita como una de las principales reguladoras de la actividad de p53 mediando la degradación de esta última (Nag et al., 2013), por lo que la reversión de la mutación en *MDM2* podría, en este caso particular, estar implicada con la aparición de resistencia en este tumor, mediante la supresión de la función de p53. De

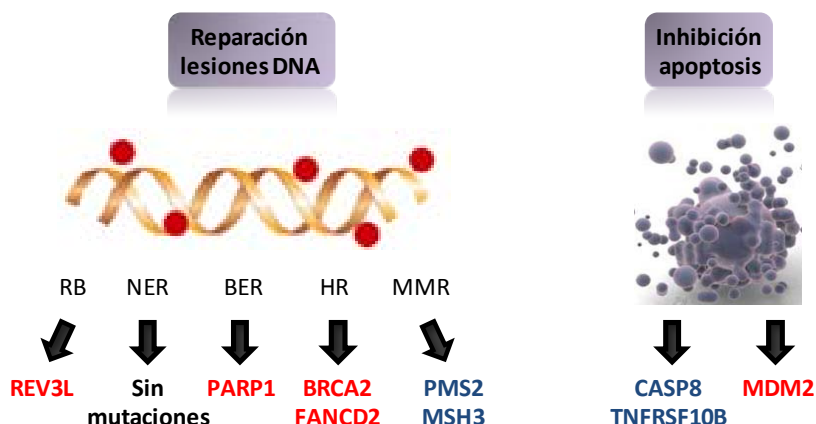
hecho, la inhibición de la proteína MDM2 como sensibilizador de TCGTs ya ha sido sugerida por algunos autores (Bauer et al., 2010; Li et al., 2010).

Finalmente, hay que añadir que este estudio no ha objetivado mutaciones en los principales genes relacionados con mecanismos de resistencia anteriores a la unión del fármaco al DNA, como los transportadores de membrana *copper transporter 1 y 2 (CTR1 y 2)* o proteínas detoxificantes como glutatión o metalotioneínas, por lo que, en general, se podría afirmar que estos mecanismos no parecen jugar un papel primordial en la aparición de resistencia en TCGTs desde una perspectiva mutacional. Aunque no se puede descartar que otros mecanismos modificadores de su expresión puedan estar implicados. Sólo existe un caso aislado (TGT21) en el que se describió una mutación en la bomba de membrana *ATP-binding cassette, sub-family C (ABCC4)*, también conocida como *MRP4*, en el dominio transmembrana del transportador. Pero no existen evidencias que asocien la actividad de esta bomba con la externalización del CDDP, por lo que su participación en este proceso es dudosa.

A.



B.



**Figura 45.-** Función de los genes con mutaciones encontradas en tumores resistentes, asociadas a la adquisición de resistencia a CDDP. Los genes marcados en rojo serían portadores de mutaciones activantes, y los marcados en azul, de mutaciones inactivantes. En el caso de *MDM2*, se trata de una reversión de la mutación descrita en la muestra sensible. A) mecanismos de adquisición de resistencia anteriores a la unión del fármaco al DNA; B) mecanismos de adquisición de resistencia tras la unión de la droga al DNA. RB: *replicative bypass*; NER: *nucleotide excision repair*; BER: *base excision repair*; HR: *homologous recombination*; MMR: *mismatch repair*.

Todo esto nos hace pensar que, tal y como se ha comentado, la resistencia se adquiere a través de un proceso complejo y característico en cada tumor, sin existir mutaciones conductoras concretas que expliquen la adquisición de resistencia de manera generalizada en este tipo de cáncer. Sin embargo, sí parece existir una tendencia a la presencia de mutaciones en vías que se activan cuando el CDDP se ha unido al DNA, es decir, en reparación de las lesiones producidas en el DNA y activación y consecución de la muerte celular mediante apoptosis. Por lo que estos tumores adquirirían la resistencia de manera preferencial desregulando la función de proteínas que actúan una vez se ha producido el daño, más que evitando que este insulto tóxico llegue a producirse. Además, precisamente por tratarse de un proceso complejo, más allá de los genes mutados descritos a lo largo de esta discusión, y algún otro que no se ha comentado pero que también ha sido implicado con resistencia al CDDP en la literatura como *SERPINE1*, *PDCD4*, *CCNE1* o *GNAS*, y que nos sirven de control de calidad del propio trabajo, es indudable que otros genes con un papel menos evidente también pueden estar implicados con el fenotipo resistente de estos tumores. Por lo tanto, sería interesante

seguir trabajando la lista de mutaciones obtenida, puesto que indudablemente, aún hay mucho más conocimiento que sacar de ella.

El siguiente paso en el que nos vamos a centrar ahora es la validación de estos genes seleccionados por su papel potencial en el proceso de pérdida de respuesta al fármaco. La evaluación se realizará mediante estudio de su expresión proteica en un panel de tumores primarios sensibles y resistentes, para comprobar si existen diferencias asociadas a uno de los fenotipos, con el objetivo último de evaluar su utilidad como marcadores genéticos de resistencia a CDDP.

## **1.2. Caracterización de *PARP6* y papel en la adquisición de resistencia**

Con el objetivo de abordar desde otra perspectiva el fenómeno de la resistencia en TCGTs, nuestro grupo había realizado, anteriormente al inicio de esta tesis, unos aCGH analizando 4 muestras de tumores testiculares sensibles y sus derivados resistentes. Este experimento se realizó con el fin de estudiar la presencia de cambios a nivel cromosómico que pudieran asociarse con la falta de respuesta al CDDP. Así, se caracterizaron varias regiones con amplificaciones o deleciones diferenciales entre los dos grupos de muestras. Uno de estos cambios, presente de manera exclusiva en 2 de las 4 muestras resistentes, era una amplificación en la región cromosómica 15q, que contiene el gen *PARP6*. Este gen pertenece a la familia de las poli (ADP-ribosa) polimerasas (PARPs), cuyos miembros más estudiados son *PARP1* y 2. Estos genes están implicados en la supervisión y mantenimiento de la integridad genómica y funcionan como moléculas clave en la reparación de roturas de una cadena en el DNA (BER, del inglés *base excision repair*), entre otras funciones celulares (Rottenberg et al., 2008). Además, se ha postulado el posible papel de las PARPs en el NER (Flohr et al., 2003), y la sobreexpresión de estas proteínas se ha relacionado con resistencia a drogas y aumento de la capacidad celular de sobrevivir al estrés genotóxico (Donawho et al., 2007). Estudios previos realizados *in silico* para caracterizar esta familia de proteínas, muestran que *PARP6* contiene el dominio catalítico PARP, por lo que debería tener actividad polimerasa, al igual que los miembros

bien caracterizados de la familia. Por todo esto, sumado al hecho de que, cuando se empezó esta tesis doctoral, no existía en la literatura ningún estudio de caracterización funcional de PARP6, pensamos que sería interesante estudiar las funciones de esta proteína y su posible implicación en la adquisición de resistencia.

PARP1, el miembro mejor caracterizado de la familia, es una enzima cuyo mecanismo de acción se basa en la poli (ADP ribosil)ación (PARilación) de proteínas que se unen al DNA cuando se producen lesiones en este, mediante la adición secuencial de unidades de ADP ribosa, formando cadenas ramificadas en dichas proteínas, así como en ella misma (auto-PARilación). En el caso de PARP6, los estudios realizados por nuestro grupo mediante ensayos *in vitro* usando NAD<sup>+</sup> radioactivo y PARP6 recombinante, demostraron que esta proteína tendría actividad mono (ADP ribosa), en vez de formar cadenas ramificadas. Estos resultados confirmaban la funcionalidad de esta proteína, aunque mediante un mecanismo de acción ligeramente distinto respecto otros miembros de esta familia proteica como PARP1 y 2.

A continuación, con el fin de investigar si esta proteína podría tener algún rol en la supervivencia celular, se utilizaron varias líneas celulares (HeLa, 293 y las líneas testiculares GCT27 y SuSa) para infra y sobreexpresar PARP6. Los resultados obtenidos indicaron la implicación de esta proteína en la viabilidad celular y en su capacidad de proliferación, puesto que su sobreexpresión producía un incremento del crecimiento celular, mientras que la infraexpresión se traducía en un descenso muy marcado de la viabilidad de las células, según se observó mediante ensayos de viabilidad con CTG y corroborado mediante un experimento de *time-lapse*. Por otra parte, observamos que la infraexpresión de la proteína se traducía en una marcada parada del ciclo celular en fase G1, lo cual apuntaría a que la falta de esta proteína producía un efecto que, de manera directa o indirecta, alteraba la progresión del ciclo celular y acababa produciendo la muerte celular, como demostraba el aumento progresivo de células en subG1 (muertas) en las horas posteriores. Así, observamos que el KD de este gen iba vinculado a un aumento importante en p53 y p21, las principales proteínas encargadas de detener el ciclo celular durante G1, además de un descenso importante en ciclina D1, cuya función

es la regulación positiva de la transición entre fase G1 y S, lo cual promovería también esta parada del ciclo celular.

A raíz de los resultados obtenidos, nos planteamos la hipótesis de que PARP6 pudiera ejercer un papel en la reparación de lesiones causadas en el genoma de las células, por lo que la falta de esta proteína produciría una acumulación de daño letal para la célula. Con este propósito, se realizó un estudio de capacidad de señalización y reparación de daño en células con infraexpresión de la proteína. Los resultados mostraron un marcado descenso en la capacidad de reparar las lesiones producidas por la radiación ionizante, por lo que, de alguna forma, esta proteína jugaría un papel en la señalización de las roturas en las cadenas del DNA y/o reclutamiento y activación de proteínas de la maquinaria de reparación. Además, la presencia de una cantidad significativa de lesiones en el DNA antes de irradiar las células, al hacer KD de PARP6, indicaría que en ausencia de esta proteína, las células tendrían problemas para reparar las lesiones que se producen de manera espontánea debido a procesos fisiológicos celulares. Esto explicaría la parada en fase G1 observada al infraexpresar la proteína, ya que las células pararían el ciclo para intentar reparar las lesiones antes de replicar su DNA y, al no ser capaces de hacerlo, se activarían vías de muerte celular, lo cual explicaría el descenso en proliferación y viabilidad observado en los experimentos realizados.

Así, la amplificación que habíamos objetivado en los tumores resistentes, en la región que contiene el gen que codifica para *PARP6*, causaría una sobreexpresión de esta proteína que, como consecuencia, daría ventaja adaptativa a las células resistentes, incrementando su capacidad proliferativa a la vez que permitiendo una reparación más eficiente de las lesiones causadas en su DNA.

## 2. TERAPIA COMBINADA DE CDDP CON UN PARPi EN EL TRATAMIENTO DE TUMORES REFRACTARIOS

Como se ha comentado al principio de esta discusión, aunque el cáncer testicular es una enfermedad con un alto porcentaje de curaciones, incluso en estadios avanzados, existe un porcentaje de pacientes que no responden al tratamiento convencional ni a otras medidas como la cirugía agresiva de masas residuales y que, por ende, acabarán falleciendo a causa de la enfermedad. Por este motivo, es imprescindible la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas para estos pacientes refractarios. También hay que tener en cuenta que los pacientes con recidivas curados mediante terapia intensiva tienen un riesgo no menospreciable de desarrollar toxicidades a largo plazo como neuropatías irreversibles o leucemias.

Partiendo de la base de que los TCGTs son tumores cuya sensibilidad se caracteriza por niveles reducidos de mecanismos de reparación de lesiones en el DNA (Usanova et al., 2010; Welsh et al., 2004), y que durante el proceso de adquisición de resistencia parece ser que estos tumores son capaces de incrementar esta capacidad de reparación, pensamos que sería muy interesante utilizar un fármaco cuya actividad estuviera dirigida a inhibir la reparación en el DNA. Así, evitando una reparación eficiente, podríamos potenciar el efecto citotóxico producido por las lesiones en el DNA causadas por el CDDP. De entre las innumerables opciones disponibles, elegimos un inhibidor de las PARPs: olaparib® (AstraZeneca). La justificación de esta elección se basaba en diferentes aspectos: por un lado, se sabe que el tratamiento con CDDP produce activación de PARP1, jugando esta proteína un papel importante en la señalización del daño causado por la droga y en el inicio del proceso de reparación, ya que esta proteína parece estar relacionada, además del BER, con la actividad del NER (Flohr et al., 2003; Nguewa et al., 2006); por otro lado, se sabe que para reparar las lesiones entre cadenas (ICLs) la célula necesita, además de algunas proteínas implicadas en la vía del NER, la participación de la recombinación homóloga (HR). Hasta el momento, los defectos en la vía del NER no han sido suficientes para explicar la exquisita sensibilidad de estos tumores a la QT, por lo que

hipotetizamos que también podrían existir defectos en la vía HR que potenciarían el efecto citotóxico del fármaco, mientras que la vía del BER parece ser funcional en estos tumores. Además, los pacientes refractarios han sido, en la mayoría de los casos, fuertemente tratados antes de probar terapias de segunda línea, lo que los deja, en muchos casos, con un frágil estado de salud, por lo que este fármaco es un candidato interesante y factible, puesto que produce efectos secundarios muy leves. Finalmente, esta combinación ya había demostrado ser efectiva en otros tipos de cáncer, como los tumores de ovario refractarios a CDDP (Nguewa et al., 2006).

Para tantear nuestra hipótesis, el primer paso fue el estudio *in vitro* de la capacidad del olaparib, sólo o en combinación con CDDP, de inhibir la proliferación celular en las líneas de cáncer testicular pareadas GCT27 y SuSa S y R. Los resultados mostraron que, en monoterapia, el olaparib era capaz de reducir la viabilidad de las células S de una manera comparable al CDDP. Sin embargo, las células R mostraban una resistencia al fármaco similar a la observada para el CDDP. Estos resultados están en línea con la idea de que las células S tendrían deficiencias en sus mecanismos de reparación, por lo que estaríamos observando un mecanismo de acción de la droga de letalidad sintética. De esta manera, los defectos en la reparación del DNA presentes en las células S no serían capaces, *per se*, de comprometer la viabilidad celular en condiciones normales. Sin embargo, al inhibir otra vía de reparación mediante la acción del olaparib, lo cual se traduce en la aparición de roturas de doble cadena (DSB), se conseguiría que estas células no fueran capaces de reparar estas lesiones en su material genético. Este fenómeno desembocaría en la muerte de las células. En el caso de las células R, en cambio, el incremento de actividad de las funciones reparadoras de la célula haría que el uso del olaparib en monoterapia no fuera capaz de comprometer la viabilidad de estas células. Pero al realizar el tratamiento con la combinación de olaparib y CDDP, la viabilidad celular se redujo drásticamente en ambos tipos celulares, sugiriendo un efecto sinérgico o aditivo de la combinación capaz, incluso, de superar los mecanismos de resistencia desarrollados por las células R.



Después de obtener unos resultados tan alentadores, pero antes de pasar a los experimentos *in vivo*, quisimos estudiar los efectos de la combinación de manera más detallada, con el fin de intentar dilucidar los mecanismos mediante los cuales ejercía sus efectos quimiopotenciadores. Para testar la hipótesis del papel del olaparib como catalizador del daño celular e inhibidor de la reparación de las lesiones, se estudió el efecto de la droga sobre la capacidad de formar focos de señalización,  $\gamma$ -H2AX, y reparación, RAD51, de daño. Efectivamente, los resultados mostraron un incremento en la cantidad y persistencia de las lesiones en el DNA de las células, principalmente en las S, cuando tratábamos con olaparib de manera individual, y también en las R al utilizar la combinación de fármacos. Además, observamos unos tiempos de eliminación de focos de RAD51 muy incrementados respecto células HeLa control, incluso al tratar solamente con olaparib en el caso de las células S, lo cual podría indicar que existen problemas en la vía de la HR. Más concretamente, los resultados parecían indicar que estos defectos se encontraban *downstream* de RAD51 puesto que las células eran capaces de reclutar esta proteína, formando focos en los puntos donde se había producido el daño, pero no de procesarlos eficientemente. La presencia de defectos en la vía de la HR podría explicar por qué estas células respondían tan bien a la terapia con PARPi. En el caso de las células R, la combinación del CDDP con olaparib parecía producir un efecto inhibitorio de la reparación que causaba un fenotipo parecido al observado en las células S, alargando de manera considerable el periodo de presencia de focos de reparación del daño. La incapacidad de reparar estas lesiones de doble cadena, altamente tóxicas para la célula, acabaría produciendo la muerte celular a causa de la persistencia del daño. Estos resultados fueron otra de las razones que nos impulsaron a probar esta combinación de fármacos *in vivo*.

Estos resultados están en línea con el estudio publicado recientemente en el que los autores sugieren que los carcinomas embrionarios, justamente la histología de las líneas celulares utilizadas en nuestro estudio, tendrían defectos en la vía de HR (Cavallo et al., 2012).

De manera complementaria, quisimos estudiar el efecto de la combinación sobre el ciclo celular. Los resultados observados mostraban que la combinación de fármacos era capaz de potenciar una parada prolongada de las células en fase S tardía y G2/M. Así, la combinación provocaba una modificación del ciclo bastante más acusada que la producida por el CDDP, indicando que estas células pasaban más tiempo intentando reparar las lesiones y que, al no ser capaces de hacerlo, acabarían muriendo tal y como parecía indicar la disminución significativa del número de células registrado, principalmente, a partir de las 72 horas.

En vista de los resultados positivos obtenidos *in vitro*, decidimos probar la utilidad de la combinación de CDDP y olaparib para tratar 3 tumores refractarios mediante la utilización de nuestro modelo preclínico de orthoxenografts. Como ya se ha explicado, este modelo permite la realización de una aproximación muy parecida a la clínica. Esto se debe a dos motivos principales:

- Respecto a ratones con tumores producidos mediante ingeniería genética, nuestro modelo parte de un tumor de células humanas, por lo que evita la variabilidad interespecies. Además, ya se ha comentado que, al no conocer las bases moleculares que producen la enfermedad, no ha sido posible la obtención de animales transgénicos con tumores que mimeticen las características de los TCGT tipo II.
- En comparación con modelos ortotópicos subcutáneos, nuestro modelo presenta la ventaja de crecer en el lugar donde se localiza el tumor primario en el paciente, lo cual significa que el tumor está creciendo en el microambiente adecuado, con estímulos hormonales y demás, propios de su lugar de origen.

Por lo tanto, esta aproximación es novedosa por tratarse del primer modelo de TCGT tipo II con resistencia adquirida, tanto *in vivo* como *de novo*, con el que se ha probado esta nueva combinación terapéutica.

Los resultados mostraron un marcado efecto de la combinación sobre el crecimiento de los tumores, reduciendo de manera significativa la masa tumoral en los 3 casos estudiados. Sin embargo, el olaparib administrado en monoterapia no fue capaz de producir un cambio significativo en el volumen de los tumores, por lo que la inhibición de las PARPs de manera aislada no parece ser suficiente para tratar exitosamente tumores testiculares refractarios. Estos resultados concuerdan con un estudio publicado recientemente en el que diferentes líneas celulares de TCGT fueron tratadas con olaparib sólo o en combinación con CDDP, observando buena respuesta al tratamiento combinado pero no al olaparib en monoterapia (Cavallo et al., 2012). Por otra parte, en el caso del tumor TGT44 no se sacrificaron todos los animales al final del tratamiento, con la finalidad de evaluar la velocidad de recrecimiento de las masas residuales. De esta manera, se observó que dos semanas después de la finalización de la administración de los fármacos, los animales del grupo de tratamiento combinado aún presentaban estabilización del tumor.

Al analizar la histología de las masas residuales, una vez finalizado el tratamiento, desafortunadamente, se objetivaron células cancerosas viables en los 3 casos, aunque TGT49 presentaba un cuadro de fibrosis generalizada, indicando un efecto bastante marcado del tratamiento. Curiosamente, los resultados del NGS desvelaron que este tumor era portador de una mutación en *BRCA2*, lo cual podría explicar la mayor eficacia del tratamiento combinado en este caso.

Por lo tanto, creemos que esta nueva combinación terapéutica podría tener un impacto positivo en la clínica, como terapia alternativa, para tratar pacientes refractarios al tratamiento convencional. Aunque el tratamiento no haya sido capaz de eliminar por completo las masas tumorales, hay que tener en cuenta que dos de los tumores estudiados en el experimento *in vivo* provenían de pacientes refractarios, altamente politratados y que acabaron muriendo a causa de la enfermedad, por lo que la respuesta observada con el tratamiento combinado es muy buena si tenemos en cuenta el *background* de los pacientes. Además, tal y como comentan *Feldman y cols.* en su estudio sobre revisión de los puntos finales en ensayos clínicos, aunque los agentes citoestáticos

dirigidos a una diana pueden tener beneficios clínicos significativos, produciendo periodos muy largos de estabilización de la enfermedad que alarguen de manera substancial la supervivencia del paciente, pueden ser catalogados como inefectivos si se valora su actividad mediante respuesta objetiva. Por eso, es necesario revisar y modificar la manera en la que se valora la efectividad de este tipo de compuestos para evitar su exclusión prematura (Feldman et al., 2011). De manera adicional, muy recientemente, se ha publicado un estudio en el que los autores objetivan la idoneidad de utilizar inhibidores de PARP en líneas celulares de cáncer de pulmón deficientes en la proteína ERCC1 (Postel-Vinay et al., 2013). En el caso de los tumores testiculares, sabemos que se ha descrito la presencia de deficiencias en esta proteína, lo cual podría ayudar a explicar los buenos resultados obtenidos. Por todos estos motivos, creemos que sería interesante seguir estudiando el potencial terapéutico de esta combinación, ajustando las dosis de los fármacos, la duración del tratamiento y la secuencia óptima de administración, con lo que posiblemente seríamos capaces de conseguir resultados aún más alentadores. También es importante mencionar que en ningún caso se observaron efectos tóxicos agudos debidos a la administración de la combinación de drogas, posiblemente debido a los pocos efectos secundarios reportados en el caso del olaparib y a la baja dosis de CDDP utilizada. Así, todavía tendríamos margen para incrementar la dosis de CDDP, lo que posiblemente se traduciría en una mejor respuesta. La alta tolerabilidad del tratamiento sería otro punto a favor para la aplicación de esta terapia combinada en la clínica.

**CONCLUSIONES**



1. La mutación presente en el gen *ALX4* parece estar asociada con la adquisición de resistencia en la línea celular de TCGT SuSa, puesto que el *knock-down* de este gen provoca una sensibilización de las células resistentes, sin afectar a sus pareadas sensibles.
2. El proceso de aparición de resistencia también está vinculado a cambios de expresión en genes que no presentan mutaciones en su secuencia. Así, el *knock-down* de *SMARCB1* y *FANCA* es capaz de resensibilizar las células resistentes.
3. La secuenciación masiva del exoma de 9 casos de tumor primario junto con muestras crecidas en ratones xenoinjertados y sus derivados resistentes demuestra la validez del modelo preclínico que hemos generado. Este modelo preclínico es de gran utilidad para estudiar la biología de estos tumores y para probar nuevos fármacos y combinaciones.
4. El perfil mutacional de los tumores estudiados indica que la adquisición de resistencia es un proceso multifactorial, y único en cada tumor, aunque se produce de manera preferencial mediante mutaciones en genes vinculados con la evasión del efecto citotóxico posterior a la unión del CDDP al DNA, principalmente aumentando la capacidad de reparación del material genético.
5. En el presente estudio, no se han descrito mutaciones en *TP53* asociadas al fenotipo resistente en ninguno de los tumores estudiados. Así mismo, tampoco se han objetivado mutaciones en la vía del NER en ninguno de los tumores sensibles ni resistentes.
6. La proteína PARP6 modula el crecimiento y viabilidad celular, posiblemente mediante su papel en señalización/reparación de daños en el material genético de las células, y consecuente efecto sobre el ciclo celular.
7. Los resultados obtenidos en la caracterización del gen *PARP6* apuntan a un papel de la amplificación encontrada en su región cromosómica en la adquisición de resistencia a CDDP en TCGTs.

8. La combinación de CDDP y olaparib muestra actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo*, en tumores testiculares refractarios a CDDP. Aunque, esta combinación no es capaz de negativizar completamente la presencia de marcadores de proliferación en las células tumorales, al tratarse de tumores refractarios, se puede considerar como una posible aproximación terapéutica para estos casos avanzados.

9. El mecanismo sinérgico del olaparib y el CDDP en estos tumores es debido a un aumento de la cantidad de lesiones producidas en el DNA de las células, hecho asociado con una disminución de la capacidad de repararlas. La persistencia de daño y la reducción de la eficiencia de la reparación de este, producen activación de la apoptosis y la consecuente eliminación de las células tumorales.



## **BIBLIOGRAFÍA**



**A**

Alakus, H., Warnecke-Eberz, U., Bollschweiler, E., Monig, S. P., Vallbohmer, D., Brabender, J., Drebber, U., Baldus, S. E., Riemann, K., Siffert, W., *et al.* (2009). GNAS1 T393C polymorphism is associated with histopathological response to neoadjuvant radiochemotherapy in esophageal cancer. *Pharmacogenomics J* 9, 202-207.

Albertella, M. R., Green, C. M., Lehmann, A. R., and O'Connor, M. J. (2005). A role for polymerase eta in the cellular tolerance to cisplatin-induced damage. *Cancer Res* 65, 9799-9806.

Almstrup, K., Hoei-Hansen, C. E., Wirkner, U., Blake, J., Schwager, C., Ansorge, W., Nielsen, J. E., Skakkebaek, N. E., Rajpert-De Meyts, E., and Leffers, H. (2004). Embryonic stem cell-like features of testicular carcinoma in situ revealed by genome-wide gene expression profiling. *Cancer Res* 64, 4736-4743.

Aparicio, J., and Germa, J. R. (2006). Treatment of stage I testicular germ-cell tumors. *Med Oncol* 23, 305-315.

Asada, Y., Varnum, D. S., Frankel, W. N., and Nadeau, J. H. (1994). A mutation in the Ter gene causing increased susceptibility to testicular teratomas maps to mouse chromosome 18. *Nat Genet* 6, 363-368.

Atkin, N. B., and Baker, M. C. (1983). i(12p): specific chromosomal marker in seminoma and malignant teratoma of the testis? *Cancer Genet Cytogenet* 10, 199-204.

**B**

Baltaci, S., Orhan, D., Turkolmez, K., Yesilli, C., Beduk, Y., and Tulunay, O. (2001). P53, bcl-2 and bax immunoreactivity as predictors of response and outcome after chemotherapy for metastatic germ cell testicular tumours. *BJU Int* 87, 661-666.

Bassett, E., Vaisman, A., Tropea, K. A., McCall, C. M., Masutani, C., Hanaoka, F., and Chaney, S. G. (2002). Frameshifts and deletions during in vitro translesion synthesis past Pt-DNA adducts by DNA polymerases beta and eta. *DNA Repair (Amst)* 1, 1003-1016.

Basu, A., and Krishnamurthy, S. (2010). Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage. *J Nucleic Acids* 2010.

Bauer, S., Muhlenberg, T., Leahy, M., Hoiczky, M., Gauler, T., Schuler, M., and Looijenga, L. (2010). Therapeutic potential of Mdm2 inhibition in malignant germ cell tumours. *Eur Urol* 57, 679-687.

Ben-Yehoyada, M., Wang, L. C., Kozekov, I. D., Rizzo, C. J., Gottesman, M. E., and Gautier, J. (2009). Checkpoint signaling from a single DNA interstrand crosslink. *Mol Cell* 35, 704-715.

Berdasco, M., and Esteller, M. (2010). Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Dev Cell* 19, 698-711.

Beretta, G. L., Gatti, L., Tinelli, S., Corna, E., Colangelo, D., Zunino, F., and Perego, P. (2004). Cellular pharmacology of cisplatin in relation to the expression of human copper transporter CTR1 in different pairs of cisplatin-sensitive and -resistant cells. *Biochem Pharmacol* 68, 283-291.

Bergoglio, V., Canitrot, Y., Hogarth, L., Minto, L., Howell, S. B., Cazaux, C., and Hoffmann, J. S. (2001). Enhanced expression and activity of DNA polymerase beta in human ovarian tumor cells: impact on sensitivity towards antitumor agents. *Oncogene* 20, 6181-6187.

Bergthorsson, J. T., Agnarsson, B. A., Gudbjartsson, T., Magnusson, K., Thoroddsen, A., Palsson, B., Bjornsson, J., Stefansson, K., Gulcher, J., Einarsson, G. V., *et al.* (2006). A genome-wide study of allelic imbalance in human testicular germ cell tumors using microsatellite markers. *Cancer Genet Cytogenet* 164, 1-9.

Bibby, M. C. (2004). Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation: advantages and disadvantages. *Eur J Cancer* 40, 852-857.

Bignell, G., Smith, R., Hunter, C., Stephens, P., Davies, H., Greenman, C., Teague, J., Butler, A., Edkins, S., Stevens, C., *et al.* (2006). Sequence analysis of the protein kinase gene family in human testicular germ-cell tumors of adolescents and adults. *Genes Chromosomes Cancer* 45, 42-46.

Bokemeyer, C., Harstrick, A., Beyer, J., Metzner, B., Ruther, U., Hartmann, J. T., Holstein, K., Derigs, H. G., de Wit, R., Casper, J., *et al.* (1998). The use of dose-intensified chemotherapy in the treatment of metastatic nonseminomatous testicular germ cell tumors. German Testicular Cancer Study Group. *Semin Oncol* 25, 24-32; discussion 45-28.

Bosl, G. J., and Motzer, R. J. (1997). Testicular germ-cell cancer. *N Engl J Med* 337, 242-253.

## C

Calabro, F., Albers, P., Bokemeyer, C., Martin, C., Einhorn, L. H., Horwich, A., Krege, S., Schmoll, H. J., Sternberg, C. N., and Daugaard, G. (2012). The contemporary role of chemotherapy for advanced testis cancer: a systematic review of the literature. *Eur Urol* 61, 1212-1221.

Carver, B. S., and Pandolfi, P. P. (2006). Mouse modeling in oncologic preclinical and translational research. *Clin Cancer Res* 12, 5305-5311.

Carver, J. R., Shapiro, C. L., Ng, A., Jacobs, L., Schwartz, C., Virgo, K. S., Hagerty, K. L., Somerfield, M. R., and Vaughn, D. J. (2007). American Society of Clinical Oncology clinical evidence review on the ongoing care of adult cancer survivors: cardiac and pulmonary late effects. *J Clin Oncol* 25, 3991-4008.

Castillo-Avila, W., Piulats, J. M., Garcia Del Muro, X., Vidal, A., Condom, E., Casanovas, O., Mora, J., Germa, J. R., Capella, G., Villanueva, A., and Vinals, F. (2009). Sunitinib inhibits tumor growth and synergizes with cisplatin in orthotopic models of cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant human testicular germ cell tumors. *Clin Cancer Res* 15, 3384-3395.

Cavallo, F., Graziani, G., Antinozzi, C., Feldman, D. R., Houldsworth, J., Bosl, G. J., Chaganti, R. S., Moynahan, M. E., Jasin, M., and Barchi, M. (2012). Reduced proficiency in homologous

recombination underlies the high sensitivity of embryonal carcinoma testicular germ cell tumors to Cisplatin and poly (adp-ribose) polymerase inhibition. *PLoS One* 7, e51563.

Clark, A. T., Rodriguez, R. T., Bodnar, M. S., Abeyta, M. J., Cedars, M. I., Turek, P. J., Firpo, M. T., and Reijo Pera, R. A. (2004). Human STELLAR, NANOG, and GDF3 genes are expressed in pluripotent cells and map to chromosome 12p13, a hotspot for teratocarcinoma. *Stem Cells* 22, 169-179.

Cook, M. B., Graubard, B. I., Rubertone, M. V., Erickson, R. L., and McGlynn, K. A. (2008). Perinatal factors and the risk of testicular germ cell tumors. *Int J Cancer* 122, 2600-2606.

Costello, J. F., Fruhwald, M. C., Smiraglia, D. J., Rush, L. J., Robertson, G. P., Gao, X., Wright, F. A., Feramisco, J. D., Peltomaki, P., Lang, J. C., *et al.* (2000). Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet* 24, 132-138.

Crockford, G. P., Linger, R., Hockley, S., Dudakia, D., Johnson, L., Huddart, R., Tucker, K., Friedlander, M., Phillips, K. A., Hogg, D., *et al.* (2006). Genome-wide linkage screen for testicular germ cell tumour susceptibility loci. *Hum Mol Genet* 15, 443-451.

Chang, H., Mohabir, N., Done, S., and Hamel, P. A. (2009). Loss of ALX4 expression in epithelial cells and adjacent stromal cells in breast cancer. *J Clin Pathol* 62, 908-914.

Chen, H. Y., Zhu, B. H., Zhang, C. H., Yang, D. J., Peng, J. J., Chen, J. H., Liu, F. K., and He, Y. L. (2012). High CpG island methylator phenotype is associated with lymph node metastasis and prognosis in gastric cancer. *Cancer Sci* 103, 73-79.

Chia, V. M., Li, Y., Goldin, L. R., Graubard, B. I., Greene, M. H., Korde, L., Rubertone, M. V., Erickson, R. L., and McGlynn, K. A. (2009). Risk of cancer in first- and second-degree relatives of testicular germ cell tumor cases and controls. *Int J Cancer* 124, 952-957.

Chishima, T., Miyagi, Y., Wang, X., Yamaoka, H., Shimada, H., Moossa, A. R., and Hoffman, R. M. (1997). Cancer invasion and micrometastasis visualized in live tissue by green fluorescent protein expression. *Cancer Res* 57, 2042-2047.

Chung, P. W., Bayley, A. J., Sweet, J., Jewett, M. A., Tew-George, B., Gospodarowicz, M. K., and Warde, P. R. (2004). Spermatocytic seminoma: a review. *Eur Urol* 45, 495-498.

## D

Damjanov, I., Solter, D., Belicza, M., and Skreb, N. (1971). Teratomas obtained through extrauterine growth of seven-day mouse embryos. *J Natl Cancer Inst* 46, 471-475 *passim*.

Davis, F. M., Parsonage, M. T., Cabot, P. J., Parat, M. O., Thompson, E. W., Roberts-Thomson, S. J., and Monteith, G. R. (2013). Assessment of gene expression of intracellular calcium channels, pumps and exchangers with epidermal growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition in a breast cancer cell line. *Cancer Cell Int* 13, 76.

De Giorgi, U., Rosti, G., Aieta, M., Testore, F., Burattini, L., Fornarini, G., Naglieri, E., Lo Re, G., Zumaglini, F., and Marangolo, M. (2006). Phase II study of oxaliplatin and gemcitabine salvage

chemotherapy in patients with cisplatin-refractory nonseminomatous germ cell tumor. *Eur Urol* **50**, 1032-1038; discussion 1038-1039.

de Haas, E. C., Zwart, N., Meijer, C., Suurmeijer, A. J., Meijer, K., Guchelaar, H. J., Hoekstra, H. J., van Leeuwen, F. E., Sleijfer, D. T., Boezen, H. M., and Gietema, J. A. (2010). Association of PAI-1 gene polymorphism with survival and chemotherapy-related vascular toxicity in testicular cancer. *Cancer* **116**, 5628-5636.

de Wit, R., and Fizazi, K. (2006). Controversies in the management of clinical stage I testis cancer. *J Clin Oncol* **24**, 5482-5492.

Dean, E., Middleton, M. R., Pwint, T., Swaisland, H., Carmichael, J., Goodege-Kunwar, P., and Ranson, M. (2012). Phase I study to assess the safety and tolerability of olaparib in combination with bevacizumab in patients with advanced solid tumours. *Br J Cancer* **106**, 468-474.

Di Vizio, D., Cito, L., Boccia, A., Chieffi, P., Insabato, L., Pettinato, G., Motti, M. L., Schepis, F., D'Amico, W., Fabiani, F., *et al.* (2005). Loss of the tumor suppressor gene PTEN marks the transition from intratubular germ cell neoplasias (ITGCN) to invasive germ cell tumors. *Oncogene* **24**, 1882-1894.

Dieckmann, K. P., Spiekermann, M., Balks, T., Flor, I., Loning, T., Bullerdiek, J., and Belge, G. (2012). MicroRNAs miR-371-3 in serum as diagnostic tools in the management of testicular germ cell tumours. *Br J Cancer* **107**, 1754-1760.

Ding, Z., Yang, X., Pater, A., and Tang, S. C. (2000). Resistance to apoptosis is correlated with the reduced caspase-3 activation and enhanced expression of antiapoptotic proteins in human cervical multidrug-resistant cells. *Biochem Biophys Res Commun* **270**, 415-420.

Doles, J., Oliver, T. G., Cameron, E. R., Hsu, G., Jacks, T., Walker, G. C., and Hemann, M. T. (2010). Suppression of Rev3, the catalytic subunit of Pol{zeta}, sensitizes drug-resistant lung tumors to chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 20786-20791.

Donawho, C. K., Luo, Y., Luo, Y., Penning, T. D., Bauch, J. L., Bouska, J. J., Bontcheva-Diaz, V. D., Cox, B. F., DeWeese, T. L., Dillehay, L. E., *et al.* (2007). ABT-888, an orally active poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor that potentiates DNA-damaging agents in preclinical tumor models. *Clin Cancer Res* **13**, 2728-2737.

Draper, J. S., Smith, K., Gokhale, P., Moore, H. D., Maltby, E., Johnson, J., Meisner, L., Zwaka, T. P., Thomson, J. A., and Andrews, P. W. (2004). Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **22**, 53-54.

Duale, N., Lindeman, B., Komada, M., Olsen, A. K., Andreassen, A., Soderlund, E. J., and Brunborg, G. (2007). Molecular portrait of cisplatin induced response in human testis cancer cell lines based on gene expression profiles. *Mol Cancer* **6**, 53.

Duiker, E. W., Meijer, A., van der Bilt, A. R., Meersma, G. J., Kooi, N., van der Zee, A. G., de Vries, E. G., and de Jong, S. (2011). Drug-induced caspase 8 upregulation sensitises cisplatin-resistant ovarian carcinoma cells to rhTRAIL-induced apoptosis. *Br J Cancer* **104**, 1278-1287.

Durant, S. T., Morris, M. M., Illand, M., McKay, H. J., McCormick, C., Hirst, G. L., Borts, R. H., and Brown, R. (1999). Dependence on RAD52 and RAD1 for anticancer drug resistance mediated by inactivation of mismatch repair genes. *Curr Biol* 9, 51-54.

## E

Ebert, M. P., Model, F., Mooney, S., Hale, K., Lograsso, J., Tonnes-Priddy, L., Hoffmann, J., Csepregi, A., Rocken, C., Molnar, B., *et al.* (2006). Aristaless-like homeobox-4 gene methylation is a potential marker for colorectal adenocarcinomas. *Gastroenterology* 131, 1418-1430.

Eble, J. N. (1994). Spermatocytic seminoma. *Hum Pathol* 25, 1035-1042.

Efstathiou, E., and Logothetis, C. J. (2006). Review of late complications of treatment and late relapse in testicular cancer. *J Natl Compr Canc Netw* 4, 1059-1070.

Einhorn, L. H., Brames, M. J., Heinrich, M. C., Corless, C. L., and Madani, A. (2006). Phase II study of imatinib mesylate in chemotherapy refractory germ cell tumors expressing KIT. *Am J Clin Oncol* 29, 12-13.

El Hilali, N., Rubio, N., Martinez-Villacampa, M., and Blanco, J. (2002). Combined noninvasive imaging and luminometric quantification of luciferase-labeled human prostate tumors and metastases. *Lab Invest* 82, 1563-1571.

Escudier, B., Eisen, T., Stadler, W. M., Szczylik, C., Oudard, S., Siebels, M., Negrier, S., Chevreau, C., Solska, E., Desai, A. A., *et al.* (2007). Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 356, 125-134.

Etemadmoghadam, D., George, J., Cowin, P. A., Cullinane, C., Kansara, M., Goringe, K. L., Smyth, G. K., and Bowtell, D. D. (2010). Amplicon-dependent CCNE1 expression is critical for clonogenic survival after cisplatin treatment and is correlated with 20q11 gain in ovarian cancer. *PLoS One* 5, e15498.

Ezeh, U. I., Turek, P. J., Reijo, R. A., and Clark, A. T. (2005). Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma. *Cancer* 104, 2255-2265.

## F

Faivre, S., Raymond, E., Woynarowski, J. M., and Cvitkovic, E. (1999). Supraadditive effect of 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) in combination with oxaliplatin in human cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 44, 117-123.

Feldman, D. R., Patil, S., Trinos, M. J., Carouso, M., Ginsberg, M. S., Sheinfeld, J., Bajorin, D. F., Bosl, G. J., and Motzer, R. J. (2011). Progression-free and overall survival in patients with relapsed/refractory germ cell tumors treated with single-agent chemotherapy: endpoints for clinical trial design. *Cancer* 118, 981-986.

Flegel, C., Manteniots, S., Osthold, S., Hatt, H., and Gisselmann, G. (2013). Expression profile of ectopic olfactory receptors determined by deep sequencing. *PLoS One* 8, e55368.

Flohr, C., Burkle, A., Radicella, J. P., and Epe, B. (2003). Poly(ADP-ribosyl)ation accelerates DNA repair in a pathway dependent on Cockayne syndrome B protein. *Nucleic Acids Res* 31, 5332-5337.

Francia, G., Green, S. K., Bocci, G., Man, S., Emmenegger, U., Ebos, J. M., Weirnerman, A., Shaked, Y., and Kerbel, R. S. (2005). Down-regulation of DNA mismatch repair proteins in human and murine tumor spheroids: implications for multicellular resistance to alkylating agents. *Mol Cancer Ther* 4, 1484-1494.

Frese, K. K., and Tuveson, D. A. (2007). Maximizing mouse cancer models. *Nat Rev Cancer* 7, 645-658.

## G

Galluzzi, L., Senovilla, L., Vitale, I., Michels, J., Martins, I., Kepp, O., Castedo, M., and Kroemer, G. (2012). Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* 31, 1869-1883.

Garner, M. J., Turner, M. C., Ghadirian, P., and Krewski, D. (2005). Epidemiology of testicular cancer: an overview. *Int J Cancer* 116, 331-339.

Germa-Lluch, J. R., Begent, R. H., and Bagshawe, K. D. (1980). Tumour-marker levels and prognosis in malignant teratoma of the testis. *Br J Cancer* 42, 850-855.

Germa-Lluch, J. R., Garcia del Muro, X., Maroto, P., Paz-Ares, L., Arranz, J. A., Guma, J., Alba, E., Sastre, J., Aparicio, J., Fernandez, A., *et al.* (2002). Clinical pattern and therapeutic results achieved in 1490 patients with germ-cell tumours of the testis: the experience of the Spanish Germ-Cell Cancer Group (GG). *Eur Urol* 42, 553-562; discussion 562-553.

Geyer, C. E., Forster, J., Lindquist, D., Chan, S., Romieu, C. G., Pienkowski, T., Jagiello-Gruszfeld, A., Crown, J., Chan, A., Kaufman, B., *et al.* (2006). Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 355, 2733-2743.

Gilbert, D., Rapley, E., and Shipley, J. (2011a). Testicular germ cell tumours: predisposition genes and the male germ cell niche. *Nat Rev Cancer* 11, 278-288.

Gilbert, D. C., Chandler, I., Summersgill, B., McIntyre, A., Missiaglia, E., Goddard, N. C., Huddart, R. A., and Shipley, J. (2011b). Genomic gain and over expression of CCL2 correlate with vascular invasion in stage I non-seminomatous testicular germ-cell tumours. *Int J Androl* 34, e114-121; discussion e121.

Gillis, A. J., Stoop, H. J., Hersmus, R., Oosterhuis, J. W., Sun, Y., Chen, C., Guenther, S., Sherlock, J., Veltman, I., Baeten, J., *et al.* (2007). High-throughput microRNAome analysis in human germ cell tumours. *J Pathol* 213, 319-328.

Giuliano, C. J., Kerley-Hamilton, J. S., Bee, T., Freemantle, S. J., Manickaratnam, R., Dmitrovsky, E., and Spinella, M. J. (2005). Retinoic acid represses a cassette of candidate pluripotency



chromosome 12p genes during induced loss of human embryonal carcinoma tumorigenicity. *Biochim Biophys Acta* 1731, 48-56.

Goddard, N. C., McIntyre, A., Summersgill, B., Gilbert, D., Kitazawa, S., and Shipley, J. (2007). KIT and RAS signalling pathways in testicular germ cell tumours: new data and a review of the literature. *Int J Androl* 30, 337-348; discussion 349.

Gutekunst, M., Oren, M., Weilbacher, A., Dengler, M. A., Markwardt, C., Thomale, J., Aulitzky, W. E., and van der Kuip, H. (2011). p53 hypersensitivity is the predominant mechanism of the unique responsiveness of testicular germ cell tumor (TGCT) cells to cisplatin. *PLoS One* 6, e19198.

## H

Hara, R., Mo, J., and Sancar, A. (2000). DNA damage in the nucleosome core is refractory to repair by human excision nuclease. *Mol Cell Biol* 20, 9173-9181.

Hara, R., and Sancar, A. (2002). The SWI/SNF chromatin-remodeling factor stimulates repair by human excision nuclease in the mononucleosome core particle. *Mol Cell Biol* 22, 6779-6787.

Harding, M., Paul, J., and Kaye, S. B. (1995). Does delayed diagnosis or scrotal incision affect outcome for men with non-seminomatous germ cell tumours? *Br J Urol* 76, 491-494.

Harrap, K. R. (1985). Preclinical studies identifying carboplatin as a viable cisplatin alternative. *Cancer Treat Rev* 12 Suppl A, 21-33.

Hirakawa, M., Sato, Y., Ohnuma, H., Takayama, T., Sagawa, T., Nobuoka, T., Harada, K., Miyamoto, H., Takahashi, Y., Katsuki, S., *et al.* (2013). A phase II study of neoadjuvant combination chemotherapy with docetaxel, cisplatin, and S-1 for locally advanced resectable gastric cancer: nucleotide excision repair (NER) as potential chemoresistance marker. *Cancer Chemother Pharmacol* 71, 789-797.

Hoffman, R. M. (1999). Orthotopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation: a bridge to the clinic. *Invest New Drugs* 17, 343-359.

Holzer, A. K., and Howell, S. B. (2006). The internalization and degradation of human copper transporter 1 following cisplatin exposure. *Cancer Res* 66, 10944-10952.

Holzer, A. K., Manorek, G. H., and Howell, S. B. (2006). Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. *Mol Pharmacol* 70, 1390-1394.

Holl, K., Surcel, H. M., Koskela, P., Dillner, J., Hallmans, G., Wadell, G., Kaasila, M., Olafsdottir, G. H., Ogmundsdottir, H. M., Pukkala, E., *et al.* (2008). Maternal Epstein-Barr virus and cytomegalovirus infections and risk of testicular cancer in the offspring: a nested case-control study. *APMIS* 116, 816-822.

Honecker, F., Mayer, F., Stoop, H., Oosterhuis, J. W., Koch, S., Bokemeyer, C., and Looijenga, L. H. (2003). Xeroderma pigmentosum group a protein and chemotherapy resistance in human germ cell tumors. *Lab Invest* 83, 1489-1495.

Honecker, F., Wermann, H., Mayer, F., Gillis, A. J., Stoop, H., van Gorp, R. J., Oechsle, K., Steyerberg, E., Hartmann, J. T., Dinjens, W. N., *et al.* (2009). Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and BRAF mutation in treatment-resistant germ cell tumors. *J Clin Oncol* 27, 2129-2136.

Horton, J. K., Srivastava, D. K., Zmudzka, B. Z., and Wilson, S. H. (1995). Strategic down-regulation of DNA polymerase beta by antisense RNA sensitizes mammalian cells to specific DNA damaging agents. *Nucleic Acids Res* 23, 3810-3815.

Houldsworth, J., Korkola, J. E., Bosl, G. J., and Chaganti, R. S. (2006). Biology and genetics of adult male germ cell tumors. *J Clin Oncol* 24, 5512-5518.

Houldsworth, J., Reuter, V., Bosl, G. J., and Chaganti, R. S. (1997). Aberrant expression of cyclin D2 is an early event in human male germ cell tumorigenesis. *Cell Growth Differ* 8, 293-299.

Houldsworth, J., Xiao, H., Murty, V. V., Chen, W., Ray, B., Reuter, V. E., Bosl, G. J., and Chaganti, R. S. (1998). Human male germ cell tumor resistance to cisplatin is linked to TP53 gene mutation. *Oncogene* 16, 2345-2349.

Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., *et al.* (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350, 2335-2342.

Hussain, S. A., Ma, Y. T., Palmer, D. H., Hutton, P., and Cullen, M. H. (2008). Biology of testicular germ cell tumors. *Expert Rev Anticancer Ther* 8, 1659-1673.

## I

IGCCCG (1997). 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.

## J

Jacobsen, G. K., Henriksen, O. B., and von der Maase, H. (1981). Carcinoma in situ of testicular tissue adjacent to malignant germ-cell tumors: a study of 105 cases. *Cancer* 47, 2660-2662.

Jain, A., Brames, M. J., Vaughn, D. J., and Einhorn, L. H. (2013). Phase II Clinical Trial of Oxaliplatin and Bevacizumab in Refractory Germ Cell Tumors. *Am J Clin Oncol*.

Jansen, B. A., Brouwer, J., and Reedijk, J. (2002). Glutathione induces cellular resistance against cationic dinuclear platinum anticancer drugs. *J Inorg Biochem* 89, 197-202.

Johnson, S. W., Swiggard, P. A., Handel, L. M., Brennan, J. M., Godwin, A. K., Ozols, R. F., and Hamilton, T. C. (1994). Relationship between platinum-DNA adduct formation and removal and cisplatin cytotoxicity in cisplatin-sensitive and -resistant human ovarian cancer cells. *Cancer Res* 54, 5911-5916.

Juliachs, M., Vidal, A., Del Muro, X. G., Piulats, J. M., Condom, E., Casanovas, O., Graupera, M., Germa, J. R., Villanueva, A., and Vinals, F. (2013). Effectivity of pazopanib treatment in orthotopic models of human testicular germ cell tumors. *BMC Cancer* 13, 382.

Juric, D., Sale, S., Hromas, R. A., Yu, R., Wang, Y., Duran, G. E., Tibshirani, R., Einhorn, L. H., and Sikic, B. I. (2005). Gene expression profiling differentiates germ cell tumors from other cancers and defines subtype-specific signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 17763-17768.

## K

Kang, N., and Koo, J. (2012). Olfactory receptors in non-chemosensory tissues. *BMB Rep* 45, 612-622.

Kaye, S. B., Lubinski, J., Matulonis, U., Ang, J. E., Gourley, C., Karlan, B. Y., Amnon, A., Bell-McGuinn, K. M., Chen, L. M., Friedlander, M., *et al.* (2012). Phase II, Open-Label, Randomized, Multicenter Study Comparing the Efficacy and Safety of Olaparib, a Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibitor, and Pegylated Liposomal Doxorubicin in Patients With BRCA1 or BRCA2 Mutations and Recurrent Ovarian Cancer. *J Clin Oncol* 30, 372-379.

Kaye, S. B., Mead, G. M., Fossa, S., Cullen, M., deWit, R., Bodrogi, I., van Groeningen, C., Sylvester, R., Collette, L., Stenning, S., *et al.* (1998). Intensive induction-sequential chemotherapy with BOP/VIP-B compared with treatment with BEP/EP for poor-prognosis metastatic nonseminomatous germ cell tumor: a Randomized Medical Research Council/European Organization for Research and Treatment of Cancer study. *J Clin Oncol* 16, 692-701.

Kelland, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 7, 573-584.

Kelland, L. R., Mistry, P., Abel, G., Freidlos, F., Loh, S. Y., Roberts, J. J., and Harrap, K. R. (1992a). Establishment and characterization of an in vitro model of acquired resistance to cisplatin in a human testicular nonseminomatous germ cell line. *Cancer Res* 52, 1710-1716.

Kelland, L. R., Mistry, P., Abel, G., Loh, S. Y., O'Neill, C. F., Murrer, B. A., and Harrap, K. R. (1992b). Mechanism-related circumvention of acquired cis-diamminedichloroplatinum(II) resistance using two pairs of human ovarian carcinoma cell lines by ammine/amine platinum(IV) dicarboxylates. *Cancer Res* 52, 3857-3864.

Kersemaekers, A. M., Mayer, F., Molier, M., van Weeren, P. C., Oosterhuis, J. W., Bokemeyer, C., and Looijenga, L. H. (2002). Role of P53 and MDM2 in treatment response of human germ cell tumors. *J Clin Oncol* 20, 1551-1561.

Kim, P. K., Mahidhara, R., and Seol, D. W. (2001). The role of caspase-8 in resistance to cancer chemotherapy. *Drug Resist Updat* 4, 293-296.

Koberle, B., Brenner, W., Albers, A., Usanova, S., Thuroff, J. W., and Kaina, B. (2010a). ERCC1 and XPF expression in human testicular germ cell tumors. *Oncol Rep* 23, 223-227.

Koberle, B., Masters, J. R., Hartley, J. A., and Wood, R. D. (1999). Defective repair of cisplatin-induced DNA damage caused by reduced XPA protein in testicular germ cell tumours. *Curr Biol* 9, 273-276.

Koberle, B., Roginskaya, V., Zima, K. S., Masters, J. R., and Wood, R. D. (2008). Elevation of XPA protein level in testis tumor cells without increasing resistance to cisplatin or UV radiation. *Mol Carcinog* 47, 580-586.

Koberle, B., Tomicic, M. T., Usanova, S., and Kaina, B. (2010b). Cisplatin resistance: preclinical findings and clinical implications. *Biochim Biophys Acta* 1806, 172-182.

Koch, M., Krieger, M. L., Stolting, D., Brenner, N., Beier, M., Jaehde, U., Wiese, M., Royer, H. D., and Bendas, G. (2013). Overcoming chemotherapy resistance of ovarian cancer cells by liposomal cisplatin: molecular mechanisms unveiled by gene expression profiling. *Biochem Pharmacol* 85, 1077-1090.

Kollmannsberger, C., Beyer, J., Liersch, R., Schoeffski, P., Metzner, B., Hartmann, J. T., Rick, O., Stengele, K., Hohloch, K., Spott, C., *et al.* (2004). Combination chemotherapy with gemcitabine plus oxaliplatin in patients with intensively pretreated or refractory germ cell cancer: a study of the German Testicular Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 22, 108-114.

Kollmannsberger, C., Nichols, C., and Bokemeyer, C. (2006). Recent advances in management of patients with platinum-refractory testicular germ cell tumors. *Cancer* 106, 1217-1226.

Kondagunta, G. V., and Motzer, R. J. (2006). Chemotherapy for advanced germ cell tumors. *J Clin Oncol* 24, 5493-5502.

Kool, M., de Haas, M., Scheffer, G. L., Scheper, R. J., van Eijk, M. J., Juijn, J. A., Baas, F., and Borst, P. (1997). Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res* 57, 3537-3547.

Korkola, J. E., Heck, S., Olshen, A. B., Reuter, V. E., Bosl, G. J., Houldsworth, J., and Chaganti, R. S. (2008). In vivo differentiation and genomic evolution in adult male germ cell tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 47, 43-55.

Korkola, J. E., Houldsworth, J., Chadalavada, R. S., Olshen, A. B., Dobrzynski, D., Reuter, V. E., Bosl, G. J., and Chaganti, R. S. (2006). Down-regulation of stem cell genes, including those in a 200-kb gene cluster at 12p13.31, is associated with in vivo differentiation of human male germ cell tumors. *Cancer Res* 66, 820-827.

Koropatnick, J., Kloth, D. M., Kadhim, S., Chin, J. L., and Cherian, M. G. (1995). Metallothionein expression and resistance to cisplatin in a human germ cell tumor cell line. *J Pharmacol Exp Ther* 275, 1681-1687.

Koster, R., di Pietro, A., Timmer-Bosscha, H., Gibcus, J. H., van den Berg, A., Suurmeijer, A. J., Bischoff, R., Gietema, J. A., and de Jong, S. (2010). Cytoplasmic p21 expression levels determine cisplatin resistance in human testicular cancer. *J Clin Invest* 120, 3594-3605.

Koster, R., Timmer-Bosscha, H., Bischoff, R., Gietema, J. A., and de Jong, S. (2011). Disruption of the MDM2-p53 interaction strongly potentiates p53-dependent apoptosis in cisplatin-resistant human testicular carcinoma cells via the Fas/FasL pathway. *Cell Death Dis* 2, e148.

Koychev, D., Oechsle, K., Bokemeyer, C., and Honecker, F. (2011). Treatment of patients with relapsed and/or cisplatin-refractory metastatic germ cell tumours: an update. *Int J Androl* 34, e266-273.

Kraggerud, S. M., Skotheim, R. I., Szymanska, J., Eknaes, M., Fossa, S. D., Stenwig, A. E., Peltomaki, P., and Lothe, R. A. (2002). Genome profiles of familial/bilateral and sporadic testicular germ cell tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 34, 168-174.

Krege, S., Beyer, J., Souchon, R., Albers, P., Albrecht, W., Algaba, F., Bamberg, M., Bodrogi, I., Bokemeyer, C., Cavallin-Stahl, E., *et al.* (2008a). European consensus conference on diagnosis and treatment of germ cell cancer: a report of the second meeting of the European Germ Cell Cancer Consensus group (EGCCCG): part I. *Eur Urol* 53, 478-496.

Krege, S., Beyer, J., Souchon, R., Albers, P., Albrecht, W., Algaba, F., Bamberg, M., Bodrogi, I., Bokemeyer, C., Cavallin-Stahl, E., *et al.* (2008b). European consensus conference on diagnosis and treatment of germ cell cancer: a report of the second meeting of the European Germ Cell Cancer Consensus Group (EGCCCG): part II. *Eur Urol* 53, 497-513.

Kuo, T. H., Kubota, T., Watanabe, M., Furukawa, T., Kase, S., Tanino, H., Saikawa, Y., Ishibiki, K., Kitajima, M., and Hoffman, R. M. (1993). Site-specific chemosensitivity of human small-cell lung carcinoma growing orthotopically compared to subcutaneously in SCID mice: the importance of orthotopic models to obtain relevant drug evaluation data. *Anticancer Res* 13, 627-630.

Kuwahara, D., Tsutsumi, K., Oyake, D., Ohta, T., Nishikawa, H., and Koizuka, I. (2003). Inhibition of caspase-9 activity and Apaf-1 expression in cisplatin-resistant head and neck squamous cell carcinoma cells. *Auris Nasus Larynx* 30 *Suppl*, S85-88.

## L

Ladanyi, M., Samaniego, F., Reuter, V. E., Motzer, R. J., Jhanwar, S. C., Bosl, G. J., and Chaganti, R. S. (1990). Cytogenetic and immunohistochemical evidence for the germ cell origin of a subset of acute leukemias associated with mediastinal germ cell tumors. *J Natl Cancer Inst* 82, 221-227.

Lam, M. Y., and Nadeau, J. H. (2003). Genetic control of susceptibility to spontaneous testicular germ cell tumors in mice. *APMIS* 111, 184-190; discussion 191.

Lawrence, M. S., Stojanov, P., Polak, P., Kryukov, G. V., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Carter, S. L., Stewart, C., Mermel, C. H., Roberts, S. A., *et al.* (2013). Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* 499, 214-218.

Li, B., Cheng, Q., Li, Z., and Chen, J. (2010). p53 inactivation by MDM2 and MDMX negative feedback loops in testicular germ cell tumors. *Cell Cycle* 9, 1411-1420.

Liu, S., Fang, Y., Shen, H., Xu, W., and Li, H. (2013). Berberine sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin through miR-21/PDCD4 axis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*.

Looijenga, L. H., Gillis, A. J., Stoop, H., Biermann, K., and Oosterhuis, J. W. (2011). Dissecting the molecular pathways of (testicular) germ cell tumour pathogenesis; from initiation to treatment-resistance. *Int J Androl* 34, e234-251.

Looijenga, L. H., Olie, R. A., van der Gaag, I., van Sluijs, F. J., Matoska, J., Ploem-Zaaijer, J., Knepfle, C., and Oosterhuis, J. W. (1994). Seminomas of the canine testis. Counterpart of spermatocytic seminoma of men? *Lab Invest* 71, 490-496.

Looijenga, L. H., and Oosterhuis, J. W. (1999). Pathogenesis of testicular germ cell tumours. *Rev Reprod* 4, 90-100.

Lutzker, S. G., and Levine, A. J. (1996). A functionally inactive p53 protein in teratocarcinoma cells is activated by either DNA damage or cellular differentiation. *Nat Med* 2, 804-810.

Lutzker, S. G., Mathew, R., and Tallar, D. R. (2001). A p53 dose-response relationship for sensitivity to DNA damage in isogenic teratocarcinoma cells. *Oncogene* 20, 2982-2986.

## M

Man, S., Munoz, R., and Kerbel, R. S. (2007). On the development of models in mice of advanced visceral metastatic disease for anti-cancer drug testing. *Cancer Metastasis Rev* 26, 737-747.

Mannuel, H. D., and Hussain, A. (2009). Update on testicular germ cell tumors. *Curr Opin Oncol* 21, 254-259.

Mannuel, H. D., Mitikiri, N., Khan, M., and Hussain, A. (2012). Testicular germ cell tumors: biology and clinical update. *Curr Opin Oncol* 24, 266-271.

Marinovic-Terzic, I., Yoshioka-Yamashita, A., Shimodaira, H., Avdievich, E., Hunton, I. C., Kolodner, R. D., Edelman, W., and Wang, J. Y. (2008). Apoptotic function of human PMS2 compromised by the nonsynonymous single-nucleotide polymorphic variant R20Q. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 13993-13998.

Martinez-Rivera, M., and Siddik, Z. H. (2012). Resistance and gain-of-resistance phenotypes in cancers harboring wild-type p53. *Biochem Pharmacol* 83, 1049-1062.

Masters, J. R., Thomas, R., Hall, A. G., Hogarth, L., Matheson, E. C., Cattan, A. R., and Lohrer, H. (1996). Sensitivity of testis tumour cells to chemotherapeutic drugs: role of detoxifying pathways. *Eur J Cancer* 32A, 1248-1253.

Mayer, F., Gillis, A. J., Dinjens, W., Oosterhuis, J. W., Bokemeyer, C., and Looijenga, L. H. (2002). Microsatellite instability of germ cell tumors is associated with resistance to systemic treatment. *Cancer Res* 62, 2758-2760.

Mayer, F., Honecker, F., Looijenga, L. H., and Bokemeyer, C. (2003a). Towards an understanding of the biological basis of response to cisplatin-based chemotherapy in germ-cell tumors. *Ann Oncol* 14, 825-832.

- Mayer, F., Stoop, H., Scheffer, G. L., Scheper, R., Oosterhuis, J. W., Looijenga, L. H., and Bokemeyer, C. (2003b). Molecular determinants of treatment response in human germ cell tumors. *Clin Cancer Res* 9, 767-773.
- McIntyre, A., Gilbert, D., Goddard, N., Looijenga, L., and Shipley, J. (2008). Genes, chromosomes and the development of testicular germ cell tumors of adolescents and adults. *Genes Chromosomes Cancer* 47, 547-557.
- McIntyre, A., Summersgill, B., Jafer, O., Rodriguez, S., Zafarana, G., Oosterhuis, J. W., Gillis, A. J., Looijenga, L., Cooper, C., Huddart, R., *et al.* (2004). Defining minimum genomic regions of imbalance involved in testicular germ cell tumors of adolescents and adults through genome wide microarray analysis of cDNA clones. *Oncogene* 23, 9142-9147.
- McLaren, A. (1992). Development of primordial germ cells in the mouse. *Andrologia* 24, 243-247.
- Meeks, J. J., Sheinfeld, J., and Eggener, S. E. (2012). Environmental toxicology of testicular cancer. *Urol Oncol* 30, 212-215.
- Meijer, C., Timmer, A., De Vries, E. G., Groten, J. P., Knol, A., Zwart, N., Dam, W. A., Sleijfer, D. T., and Mulder, N. H. (2000). Role of metallothionein in cisplatin sensitivity of germ-cell tumours. *Int J Cancer* 85, 777-781.
- Miller, J. C., and Einhorn, L. H. (1990). Phase II study of daily oral etoposide in refractory germ cell tumors. *Semin Oncol* 17, 36-39.
- Mirabello, L., Savage, S. A., Korde, L., Gadalla, S. M., and Greene, M. H. (2010). LINE-1 methylation is inherited in familial testicular cancer kindreds. *BMC Med Genet* 11, 77.
- Mistry, P., Kelland, L. R., Abel, G., Sidhar, S., and Harrap, K. R. (1991). The relationships between glutathione, glutathione-S-transferase and cytotoxicity of platinum drugs and melphalan in eight human ovarian carcinoma cell lines. *Br J Cancer* 64, 215-220.
- Motzer, R. J., Nichols, C. J., Margolin, K. A., Bacik, J., Richardson, P. G., Vogelzang, N. J., Bajorin, D. F., Lara, P. N., Jr., Einhorn, L., Mazumdar, M., and Bosl, G. J. (2007). Phase III randomized trial of conventional-dose chemotherapy with or without high-dose chemotherapy and autologous hematopoietic stem-cell rescue as first-line treatment for patients with poor-prognosis metastatic germ cell tumors. *J Clin Oncol* 25, 247-256.
- Motzer, R. J., Rodriguez, E., Reuter, V. E., Bosl, G. J., Mazumdar, M., and Chaganti, R. S. (1995). Molecular and cytogenetic studies in the diagnosis of patients with poorly differentiated carcinomas of unknown primary site. *J Clin Oncol* 13, 274-282.
- Moyer, A. M., Sun, Z., Batzler, A. J., Li, L., Schaid, D. J., Yang, P., and Weinshilboum, R. M. (2010). Glutathione pathway genetic polymorphisms and lung cancer survival after platinum-based chemotherapy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 19, 811-821.
- Mueller, S., Schittenhelm, M., Honecker, F., Malenke, E., Lauber, K., Wesselborg, S., Hartmann, J. T., Bokemeyer, C., and Mayer, F. (2006). Cell-cycle progression and response of germ cell tumors to cisplatin in vitro. *Int J Oncol* 29, 471-479.

Mueller, T., Voigt, W., Simon, H., Fruehauf, A., Bulankin, A., Grothey, A., and Schmolz, H. J. (2003). Failure of activation of caspase-9 induces a higher threshold for apoptosis and cisplatin resistance in testicular cancer. *Cancer Res* 63, 513-521.

## N

Nag, S., Qin, J., Srivenugopal, K. S., Wang, M., and Zhang, R. (2013). The MDM2-p53 pathway revisited. *J Biomed Res* 27, 254-271.

Nathanson, K. L., Kanetsky, P. A., Hawes, R., Vaughn, D. J., Letrero, R., Tucker, K., Friedlander, M., Phillips, K. A., Hogg, D., Jewett, M. A., *et al.* (2005). The Y deletion gr/gr and susceptibility to testicular germ cell tumor. *Am J Hum Genet* 77, 1034-1043.

Nguewa, P. A., Fuertes, M. A., Cepeda, V., Alonso, C., Quevedo, C., Soto, M., and Perez, J. M. (2006). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor 3-aminobenzamide enhances apoptosis induction by platinum complexes in cisplatin-resistant tumor cells. *Med Chem* 2, 47-53.

Nichols, C. R., Catalano, P. J., Crawford, E. D., Vogelzang, N. J., Einhorn, L. H., and Loehrer, P. J. (1998). Randomized comparison of cisplatin and etoposide and either bleomycin or ifosfamide in treatment of advanced disseminated germ cell tumors: an Eastern Cooperative Oncology Group, Southwest Oncology Group, and Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol* 16, 1287-1293.

Nichols, C. R., Williams, S. D., Loehrer, P. J., Greco, F. A., Crawford, E. D., Weetlaufer, J., Miller, M. E., Bartolucci, A., Schacter, L., and Einhorn, L. H. (1991). Randomized study of cisplatin dose intensity in poor-risk germ cell tumors: a Southeastern Cancer Study Group and Southwest Oncology Group protocol. *J Clin Oncol* 9, 1163-1172.

Nitzsche, B., Gloesenkamp, C., Schrader, M., Ocker, M., Preissner, R., Lein, M., Zakrzewicz, A., Hoffmann, B., and Hopfner, M. (2010). Novel compounds with antiangiogenic and antiproliferative potency for growth control of testicular germ cell tumours. *Br J Cancer* 103, 18-28.

Noel, E. E., Perry, J., Chaplin, T., Mao, X., Cazier, J. B., Joel, S. P., Oliver, R. T., Young, B. D., and Lu, Y. J. (2008). Identification of genomic changes associated with cisplatin resistance in testicular germ cell tumor cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 47, 604-613.

Nuver, J., Smit, A. J., Postma, A., Sleijfer, D. T., and Gietema, J. A. (2002). The metabolic syndrome in long-term cancer survivors, an important target for secondary preventive measures. *Cancer Treat Rev* 28, 195-214.

## O

Ohkubo, T., and Yamazaki, J. (2012). T-type voltage-activated calcium channel Cav3.1, but not Cav3.2, is involved in the inhibition of proliferation and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Int J Oncol* 41, 267-275.

Ohm, J. E., McGarvey, K. M., Yu, X., Cheng, L., Schuebel, K. E., Cope, L., Mohammad, H. P., Chen, W., Daniel, V. C., Yu, W., *et al.* (2007). A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing. *Nat Genet* 39, 237-242.



Okamoto, K. (2012). Epigenetics: a way to understand the origin and biology of testicular germ cell tumors. *Int J Urol* *19*, 504-511.

Olasz, J., Mandoky, L., Geczi, L., Bodrogi, I., Csuka, O., and Bak, M. (2005). Influence of hMLH1 methylation, mismatch repair deficiency and microsatellite instability on chemoresistance of testicular germ-cell tumors. *Anticancer Res* *25*, 4319-4324.

Oliveros, J. C. (2007). VENNY. An interactive tool for comparing lists with venn diagrams.

Oosterhuis, J. W., Castedo, S. M., de Jong, B., Cornelisse, C. J., Dam, A., Sleijfer, D. T., and Schraffordt Koops, H. (1989). Ploidy of primary germ cell tumors of the testis. Pathogenetic and clinical relevance. *Lab Invest* *60*, 14-21.

Oosterhuis, J. W., Kersemaekers, A. M., Jacobsen, G. K., Timmer, A., Steyerberg, E. W., Molier, M., Van Weeren, P. C., Stoop, H., and Looijenga, L. H. (2003). Morphology of testicular parenchyma adjacent to germ cell tumours. An interim report. *APMIS* *111*, 32-40; discussion 41-32.

Oosterhuis, J. W., and Looijenga, L. H. (2005). Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nat Rev Cancer* *5*, 210-222.

Ouyang, W., Yang, C., Zhang, S., Liu, Y., Yang, B., Zhang, J., Zhou, F., Zhou, Y., and Xie, C. (2013). Absence of death receptor translocation into lipid rafts in acquired TRAIL-resistant NSCLC cells. *Int J Oncol* *42*, 699-711.

## P

Palmer, R. D., Murray, M. J., Saini, H. K., van Dongen, S., Abreu-Goodger, C., Muralidhar, B., Pett, M. R., Thornton, C. M., Nicholson, J. C., Enright, A. J., and Coleman, N. (2010). Malignant germ cell tumors display common microRNA profiles resulting in global changes in expression of messenger RNA targets. *Cancer Res* *70*, 2911-2923.

Parajuli, B., Shin, S. J., Kwon, S. H., Cha, S. D., Chung, R., Park, W. J., Lee, H. G., and Cho, C. H. (2013). Salinomycin induces apoptosis via death receptor-5 up-regulation in cisplatin-resistant ovarian cancer cells. *Anticancer Res* *33*, 1457-1462.

Paul, I., Chacko, A. D., Stasik, I., Busacca, S., Crawford, N., McCoy, F., McTavish, N., Wilson, B., Barr, M., O'Byrne, K. J., *et al.* (2012). Acquired differential regulation of caspase-8 in cisplatin-resistant non-small-cell lung cancer. *Cell Death Dis* *3*, e449.

Pectasides, D., Pectasides, M., Farmakis, D., Aravantinos, G., Nikolaou, M., Koumpou, M., Gaglia, A., Kostopoulou, V., Mylonakis, N., and Skarlos, D. (2004). Gemcitabine and oxaliplatin (GEMOX) in patients with cisplatin-refractory germ cell tumors: a phase II study. *Ann Oncol* *15*, 493-497.

Piulats, J. M., Jimenez, L., Garcia del Muro, X., Villanueva, A., Vinals, F., and Germa-Lluch, J. R. (2009). Molecular mechanisms behind the resistance of cisplatin in germ cell tumours. *Clin Transl Oncol* *11*, 780-786.

Postel-Vinay, S., Bajrami, I., Friboulet, L., Elliott, R., Fontebasso, Y., Dorvault, N., Olaussen, K. A., Andre, F., Soria, J. C., Lord, C. J., and Ashworth, A. (2013). A high-throughput screen identifies

PARP1/2 inhibitors as a potential therapy for ERCC1-deficient non-small cell lung cancer. *Oncogene*.

## R

Rabik, C. A., and Dolan, M. E. (2007). Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev* 33, 9-23.

Rao, P. H., Houldsworth, J., Palanisamy, N., Murty, V. V., Reuter, V. E., Motzer, R. J., Bosl, G. J., and Chaganti, R. S. (1998). Chromosomal amplification is associated with cisplatin resistance of human male germ cell tumors. *Cancer Res* 58, 4260-4263.

Rapley, E. (2007). Susceptibility alleles for testicular germ cell tumour: a review. *Int J Androl* 30, 242-250; discussion 250.

Ray, A., Mir, S. N., Wani, G., Zhao, Q., Battu, A., Zhu, Q., Wang, Q. E., and Wani, A. A. (2009). Human SNF5/INI1, a component of the human SWI/SNF chromatin remodeling complex, promotes nucleotide excision repair by influencing ATM recruitment and downstream H2AX phosphorylation. *Mol Cell Biol* 29, 6206-6219.

Reed, E. (2005). ERCC1 and clinical resistance to platinum-based therapy. *Clin Cancer Res* 11, 6100-6102.

Roberts, K. G., Odell, A. F., Byrnes, E. M., Baleato, R. M., Griffith, R., Lyons, A. B., and Ashman, L. K. (2007). Resistance to c-KIT kinase inhibitors conferred by V654A mutation. *Mol Cancer Ther* 6, 1159-1166.

Rodriguez, E., Houldsworth, J., Reuter, V. E., Meltzer, P., Zhang, J., Trent, J. M., Bosl, G. J., and Chaganti, R. S. (1993). Molecular cytogenetic analysis of i(12p)-negative human male germ cell tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 8, 230-236.

Rosenberg, B., Vancamp, L., and Krigas, T. (1965). Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature* 205, 698-699.

Rosenberg, B., VanCamp, L., Trosko, J. E., and Mansour, V. H. (1969). Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature* 222, 385-386.

Rosenberg, C., Van Gorp, R. J., Geelen, E., Oosterhuis, J. W., and Looijenga, L. H. (2000). Overrepresentation of the short arm of chromosome 12 is related to invasive growth of human testicular seminomas and nonseminomas. *Oncogene* 19, 5858-5862.

Roskoski, R., Jr. (2005). Signaling by Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 337, 1-13.

Rottenberg, S., Jaspers, J. E., Kersbergen, A., van der Burg, E., Nygren, A. O., Zander, S. A., Derksen, P. W., de Bruin, M., Zevenhoven, J., Lau, A., *et al.* (2008). High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 17079-17084.

## S

Saitou, M., Payer, B., O'Carroll, D., Ohinata, Y., and Surani, M. A. (2005). Blimp1 and the emergence of the germ line during development in the mouse. *Cell Cycle* 4, 1736-1740.

Samakoglu, S., Deevi, D. S., Li, H., Wang, S., Murphy, M., Bao, C., Bassi, R., Prewett, M., and Tonra, J. R. (2012). Preclinical rationale for combining an EGFR antibody with cisplatin/gemcitabine for the treatment of NSCLC. *Cancer Genomics Proteomics* 9, 77-92.

Samimi, G., Safaei, R., Katano, K., Holzer, A. K., Rochdi, M., Tomioka, M., Goodman, M., and Howell, S. B. (2004). Increased expression of the copper efflux transporter ATP7A mediates resistance to cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res* 10, 4661-4669.

Schrader, M., Kempkensteffen, C., Christoph, F., Hinz, S., Weikert, S., Lein, M., Krause, H., Stephan, C., Jung, K., Hoepfner, M., *et al.* (2009). Germ cell tumors of the gonads: a selective review emphasizing problems in drug resistance and current therapy options. *Oncology* 76, 77-84.

Sharma, S., Shah, N. A., Joiner, A. M., Roberts, K. H., and Canman, C. E. (2012). DNA polymerase zeta is a major determinant of resistance to platinum-based chemotherapeutic agents. *Mol Pharmacol* 81, 778-787.

Sharpless, N. E., and Depinho, R. A. (2006). The mighty mouse: genetically engineered mouse models in cancer drug development. *Nat Rev Drug Discov* 5, 741-754.

Siddik, Z. H. (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 22, 7265-7279.

Skakkebaek, N. E. (1972). Possible carcinoma-in-situ of the testis. *Lancet* 2, 516-517.

Skotheim, R. I., Autio, R., Lind, G. E., Kraggerud, S. M., Andrews, P. W., Monni, O., Kallioniemi, O., and Lothe, R. A. (2006). Novel genomic aberrations in testicular germ cell tumors by array-CGH, and associated gene expression changes. *Cell Oncol* 28, 315-326.

Solter, D., and Damjanov, I. (1979). Teratocarcinomas rarely develop from embryos transplanted into athymic mice. *Nature* 278, 554-555.

Sommerer, F., Hengge, U. R., Markwarth, A., Vomschloss, S., Stolzenburg, J. U., Wittekind, C., and Tannapfel, A. (2005). Mutations of BRAF and RAS are rare events in germ cell tumours. *Int J Cancer* 113, 329-335.

Sonne, S. B., Almstrup, K., Dalgaard, M., Juncker, A. S., Edsgard, D., Ruban, L., Harrison, N. J., Schwager, C., Abdollahi, A., Huber, P. E., *et al.* (2009). Analysis of gene expression profiles of microdissected cell populations indicates that testicular carcinoma in situ is an arrested gonocyte. *Cancer Res* 69, 5241-5250.

Spierings, D. C., de Vries, E. G., Vellenga, E., and de Jong, S. (2003). The attractive Achilles heel of germ cell tumours: an inherent sensitivity to apoptosis-inducing stimuli. *J Pathol* 200, 137-148.

Stevens, L. C. (1970). Experimental production of testicular teratomas in mice of strains 129, A/He, and their F1 hybrids. *J Natl Cancer Inst* *44*, 923-929.

Stevens, L. C., and Little, C. C. (1954). Spontaneous Testicular Teratomas in an Inbred Strain of Mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *40*, 1080-1087.

Stordal, B., Pavlakis, N., and Davey, R. (2007). Oxaliplatin for the treatment of cisplatin-resistant cancer: a systematic review. *Cancer Treat Rev* *33*, 347-357.

Strohmeyer, T., Reissmann, P., Cordon-Cardo, C., Hartmann, M., Ackermann, R., and Slamon, D. (1991). Correlation between retinoblastoma gene expression and differentiation in human testicular tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 6662-6666.

Summersgill, B., Osin, P., Lu, Y. J., Huddart, R., and Shipley, J. (2001). Chromosomal imbalances associated with carcinoma in situ and associated testicular germ cell tumours of adolescents and adults. *Br J Cancer* *85*, 213-220.

## T

Tabernero, J., Paz-Ares, L., Salazar, R., Lianes, P., Guerra, J., Borrás, J., Villavicencio, H., Leiva, O., and Cortes-Funes, H. (2004). Incidence of contralateral germ cell testicular tumors in South Europe: report of the experience at 2 Spanish university hospitals and review of the literature. *J Urol* *171*, 164-167.

Tomida, J., Itaya, A., Shigechi, T., Unno, J., Uchida, E., Ikura, M., Masuda, Y., Matsuda, S., Adachi, J., Kobayashi, M., *et al.* (2013). A novel interplay between the Fanconi anemia core complex and ATR-ATRIP kinase during DNA cross-link repair. *Nucleic Acids Res.*

Trabert, B., Sigurdson, A. J., Sweeney, A. M., Amato, R. J., Strom, S. S., and McGlynn, K. A. (2011). Baldness, acne and testicular germ cell tumours. *Int J Androl* *34*, e59-67.

Travis, L. B., Curtis, R. E., Storm, H., Hall, P., Holowaty, E., Van Leeuwen, F. E., Kohler, B. A., Pukkala, E., Lynch, C. F., Andersson, M., *et al.* (1997). Risk of second malignant neoplasms among long-term survivors of testicular cancer. *J Natl Cancer Inst* *89*, 1429-1439.

Travis, L. B., Fossa, S. D., Schonfeld, S. J., McMaster, M. L., Lynch, C. F., Storm, H., Hall, P., Holowaty, E., Andersen, A., Pukkala, E., *et al.* (2005). Second cancers among 40,576 testicular cancer patients: focus on long-term survivors. *J Natl Cancer Inst* *97*, 1354-1365.

Turnbull, C., and Rahman, N. (2011). Genome-wide association studies provide new insights into the genetic basis of testicular germ-cell tumour. *Int J Androl* *34*, e86-96; discussion e96-87.

Tutt, A., Robson, M., Garber, J. E., Domchek, S. M., Audeh, M. W., Weitzel, J. N., Friedlander, M., Arun, B., Loman, N., Schmutzler, R. K., *et al.* (2010). Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet* *376*, 235-244.

**U**

Usanova, S., Piee-Staffa, A., Sied, U., Thomale, J., Schneider, A., Kaina, B., and Koberle, B. (2010). Cisplatin sensitivity of testis tumour cells is due to deficiency in interstrand-crosslink repair and low ERCC1-XPF expression. *Mol Cancer* 9, 248.

**V**

van de Geijn, G. J., Hersmus, R., and Looijenga, L. H. (2009). Recent developments in testicular germ cell tumor research. *Birth Defects Res C Embryo Today* 87, 96-113.

Vanderhaeghen, P., Schurmans, S., Vassart, G., and Parmentier, M. (1997). Molecular cloning and chromosomal mapping of olfactory receptor genes expressed in the male germ line: evidence for their wide distribution in the human genome. *Biochem Biophys Res Commun* 237, 283-287.

Veerappa, A. M., Vishweswaraiah, S., Lingaiah, K., Murthy, M., Manjegowda, D. S., Nayaka, R., and Ramachandra, N. B. (2013). Unravelling the Complexity of Human Olfactory Receptor Repertoire by Copy Number Analysis across Population Using High Resolution Arrays. *PLoS One* 8, e66843.

Viatori, M. (2012). Testicular cancer. *Semin Oncol Nurs* 28, 180-189.

Vidal, A., Munoz, C., Munoz, C., Guillen, M. J., Moreto, J., Puertas, S., Martinez-Iniesta, M., Figueras, A., Padulles, L., Garcia-Rodriguez, F. J., Berdiel-Acer, M., *et al.* (2012). Lurbinedetin (PM01183), a new DNA minor groove binder, inhibits growth of orthotopic primary graft of cisplatin-resistant epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 18, 5399-5411.

Voorhoeve, P. M., le Sage, C., Schrier, M., Gillis, A. J., Stoop, H., Nagel, R., Liu, Y. P., van Duijse, J., Drost, J., Griekspoor, A., *et al.* (2006). A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell* 124, 1169-1181.

Vos, A., Oosterhuis, J. W., de Jong, B., Buist, J., and Schraffordt Koops, H. (1990). Cytogenetics of carcinoma in situ of the testis. *Cancer Genet Cytogenet* 46, 75-81.

Voskoglou-Nomikos, T., Pater, J. L., and Seymour, L. (2003). Clinical predictive value of the in vitro cell line, human xenograft, and mouse allograft preclinical cancer models. *Clin Cancer Res* 9, 4227-4239.

**W**

Walt, H., Oosterhuis, J. W., and Stevens, L. C. (1993). Experimental testicular germ cell tumorigenesis in mouse strains with and without spontaneous tumours differs from development of germ cell tumours of the adult human testis. *Int J Androl* 16, 267-271.

Welsh, C., Day, R., McGurk, C., Masters, J. R., Wood, R. D., and Koberle, B. (2004). Reduced levels of XPA, ERCC1 and XPF DNA repair proteins in testis tumor cell lines. *Int J Cancer* 110, 352-361.

Wilson, C., Yang, J., Strefford, J. C., Summersgill, B., Young, B. D., Shipley, J., Oliver, T., and Lu, Y. J. (2005). Overexpression of genes on 16q associated with cisplatin resistance of testicular germ cell tumor cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 43, 211-216.

Winter, C., and Albers, P. (2011). Testicular germ cell tumors: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol* 7, 43-53.

Wylie, C. (1999). Germ cells. *Cell* 96, 165-174.

## X

Xie, F. J., Zhao, P., Kou, J. Y., Hong, W., Fu, L., Hu, L., Hong, D., Su, D., Gao, Y., and Zhang, Y. P. (2012). The T393C polymorphism of GNAS1 as a predictor for chemotherapy sensitivity and survival in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with gemcitabine plus platinum. *Cancer Chemother Pharmacol* 69, 1443-1448.

## Y

Ye, H., and Ulbright, T. M. (2012). Difficult differential diagnoses in testicular pathology. *Arch Pathol Lab Med* 136, 435-446.

## Z

Zdraveski, Z. Z., Mello, J. A., Farinelli, C. K., Essigmann, J. M., and Marinus, M. G. (2002). MutS preferentially recognizes cisplatin- over oxaliplatin-modified DNA. *J Biol Chem* 277, 1255-1260.

Zhang, X., Wang, X., Song, X., Liu, C., Shi, Y., Wang, Y., Afonja, O., Ma, C., Chen, Y. H., and Zhang, L. (2010a). Programmed cell death 4 enhances chemosensitivity of ovarian cancer cells by activating death receptor pathway in vitro and in vivo. *Cancer Sci* 101, 2163-2170.

Zhang, Y., Shu, Y. M., Wang, S. F., Da, B. H., Wang, Z. H., and Li, H. B. (2010b). Stabilization of mismatch repair gene PMS2 by glycogen synthase kinase 3beta is implicated in the treatment of cervical carcinoma. *BMC Cancer* 10, 58.

Zhang, Y. H., Wu, Q., Xiao, X. Y., Li, D. W., and Wang, X. P. (2010c). Silencing MRP4 by small interfering RNA reverses acquired DDP resistance of gastric cancer cell. *Cancer Lett* 291, 76-82.

Zhu, G., Song, L., and Lippard, S. J. (2013). Visualizing Inhibition of Nucleosome Mobility and Transcription by Cisplatin-DNA Interstrand Crosslinks in Live Mammalian Cells. *Cancer Res* 73, 4451-4460.

Zurita, A. J., Diestra, J. E., Condom, E., Garcia Del Muro, X., Scheffer, G. L., Scheper, R. J., Perez, J., Germa-Lluch, J. R., and Izquierdo, M. A. (2003). Lung resistance-related protein as a predictor of clinical outcome in advanced testicular germ-cell tumours. *Br J Cancer* 88, 879-886.

**ANEXOS**





## ANEXO PRIMERO

Mutaciones somáticas SuSa R		
Localización	Consecuencia	Gen
1:12371539	NON_SYNONYMOUS_CODING	VPS13D
1:13743088	NON_SYNONYMOUS_CODING	PRAMEF20
1:147131089	NON_SYNONYMOUS_CODING	ACP6
1:149858711	NON_SYNONYMOUS_CODING	HIST2H2AC
1:150551619	NON_SYNONYMOUS_CODING	MCL1
1:152128380	STOP_GAINED	RPTN
1:152281953	NON_SYNONYMOUS_CODING	FLG
1:155264987	NMD_TRANSCRIPT,3PRIME_UTR	PKLR
1:156501002	NON_SYNONYMOUS_CODING	IQGAP3
1:161019446	NON_SYNONYMOUS_CODING	ARHGAP30
1:161130692-161130693	FRAMESHIFT_CODING	USP21
1:169578805	NON_SYNONYMOUS_CODING	SELP
1:18014080	NON_SYNONYMOUS_CODING	ARHGEF10L
1:200376373	STOP_GAINED	ZNF281
1:200376375	NON_SYNONYMOUS_CODING	ZNF281
1:204438497	NON_SYNONYMOUS_CODING	PIK3C2B
1:22155882	NON_SYNONYMOUS_CODING	HSPG2
1:22168521	STOP_GAINED	HSPG2
1:22456337	NON_SYNONYMOUS_CODING	WNT4
1:237813210	NON_SYNONYMOUS_CODING	RYR2
1:26669482	NMD_TRANSCRIPT,INTRONIC	AIM1L
1:29365928	NON_SYNONYMOUS_CODING	EPB41
1:33958789	NON_SYNONYMOUS_CODING,SPLICE_SITE	ZSCAN20
1:36181516	NON_SYNONYMOUS_CODING	C1orf216
1:3755591	NON_SYNONYMOUS_CODING	CEP104
1:40126877	FRAMESHIFT_CODING	NT5C1A
1:41218916	NON_SYNONYMOUS_CODING,SPLICE_SITE	NFYC
1:47280856	STOP_GAINED	CYP4B1
1:48701511	NMD_TRANSCRIPT,3PRIME_UTR	SLC5A9
1:53323171	NON_SYNONYMOUS_CODING	ZYG11A
1:54649938	NON_SYNONYMOUS_CODING,SPLICE_SITE	CYB5RL
1:55555396	STOP_GAINED	USP24
1:86913378	NON_SYNONYMOUS_CODING	CLCA2
1:87538652	NON_SYNONYMOUS_CODING	HS2ST1
1:89586844	NMD_TRANSCRIPT,SYNONYMOUS_CODING	GBP2
2:106761708	STOP_GAINED	UXS1
2:11284076	NON_SYNONYMOUS_CODING	C2orf50
2:11738056	NON_SYNONYMOUS_CODING	GREB1

Localización	Consecuencia	Gen
2:128408919	NON_SYNONYMOUS_CODING	GPR17
2:152537251	NON_SYNONYMOUS_CODING	NEB
2:162815052	NON_SYNONYMOUS_CODING	SLC4A10
2:168099376	STOP_GAINED	XIRP2
2:173898665	NON_SYNONYMOUS_CODING	RAPGEF4
2:175618359	NON_SYNONYMOUS_CODING	CHRNA1
2:179516877	NON_SYNONYMOUS_CODING	TTN
2:179669382	NON_SYNONYMOUS_CODING,SPLICE_SITE	TTN
2:191848414	NON_SYNONYMOUS_CODING	STAT1
2:201997848	NON_SYNONYMOUS_CODING	CFLAR
2:210642131	NON_SYNONYMOUS_CODING	UNC80
2:219507880	NON_SYNONYMOUS_CODING	ZNF142
2:219609860	NON_SYNONYMOUS_CODING	TTLL4
2:219691770	NON_SYNONYMOUS_CODING	PRKAG3
2:220422770	STOP_GAINED	OBSL1
2:230020579	NMD_TRANSCRIPT,3PRIME_UTR	PID1
2:234102556	NON_SYNONYMOUS_CODING	INPP5D
2:238247704	NON_SYNONYMOUS_CODING	COL6A3
2:241622297	5PRIME_UTR,NMD_TRANSCRIPT	AQP12B
2:37088347	NON_SYNONYMOUS_CODING	STRN
2:48952883	NMD_TRANSCRIPT,SYNONYMOUS_CODING	LHCGR
2:69174302-69174303	FRAMESHIFT_CODING	GKN2
2:69304597	NON_SYNONYMOUS_CODING	ANTXR1
2:74682927	NMD_TRANSCRIPT,INTRONIC	INO80B
2:74709227	NMD_TRANSCRIPT,SYNONYMOUS_CODING	CCDC142
2:74901744	NMD_TRANSCRIPT,3PRIME_UTR	SEMA4F
2:88405863	NON_SYNONYMOUS_CODING	SMYD1
2:98444051	NMD_TRANSCRIPT,INTRONIC	TMEM131
2:99013269	NON_SYNONYMOUS_CODING	CNGA3
3:100511550	NON_SYNONYMOUS_CODING	ABI3BP
3:108363059	NON_SYNONYMOUS_CODING	DZIP3
3:108363061	NON_SYNONYMOUS_CODING	DZIP3
3:112357959	NON_SYNONYMOUS_CODING	CCDC80
3:113004398	NON_SYNONYMOUS_CODING	BOC
3:120347258	NON_SYNONYMOUS_CODING	HGD
3:128292334	NON_SYNONYMOUS_CODING	C3orf27
3:13677948	NON_SYNONYMOUS_CODING	FBLN2
3:142272745	NON_SYNONYMOUS_CODING	ATR
3:142753774	FRAMESHIFT_CODING	U2SURP
3:142753779	NON_SYNONYMOUS_CODING	U2SURP

Localización	Consecuencia	Gen
3:172474797	NON_SYNONYMOUS_CODING	ECT2
3:183382712	NON_SYNONYMOUS_CODING	KLHL24
3:183958585	NON_SYNONYMOUS_CODING	VWA5B2
3:184429068	NON_SYNONYMOUS_CODING	MAGEF1
3:185155368	NMD_TRANSCRIPT,INTRONIC	MAP3K13
3:185375120	NON_SYNONYMOUS_CODING	IGF2BP2
3:193386146	NON_SYNONYMOUS_CODING	OPA1
3:195510155	NON_SYNONYMOUS_CODING	MUC4
3:45000830	NMD_TRANSCRIPT,SYNONYMOUS_CODING	ZDHHC3
3:4738854	NON_SYNONYMOUS_CODING	ITPR1
3:47889985	NMD_TRANSCRIPT,3PRIME_UTR	DHX30
3:49397737	NON_SYNONYMOUS_CODING	RHOA
3:53274266	NMD_TRANSCRIPT,ESSENTIAL_SPLICE_SITE	TKT
3:89480313	NON_SYNONYMOUS_CODING	EPHA3
3:93754209	NON_SYNONYMOUS_CODING	ARL13B
4:113353611	NMD_TRANSCRIPT,INTRONIC	ALPK1
4:119252904	NON_SYNONYMOUS_CODING	PRSS12
4:13602110	NON_SYNONYMOUS_CODING	BOD1L
4:151788823	NON_SYNONYMOUS_CODING,SPLICE_SITE	LRBA
4:153893602	NON_SYNONYMOUS_CODING	FHDC1
4:155720536	NON_SYNONYMOUS_CODING	RBM46
4:187157973	NON_SYNONYMOUS_CODING	KLKB1
4:25673253	NON_SYNONYMOUS_CODING	SLC34A2
4:39523090	NON_SYNONYMOUS_CODING	UGDH
4:47645239-47645240	FRAMESHIFT_CODING	CORIN
4:5500720	NON_SYNONYMOUS_CODING	STK32B
4:56230421-56230422	FRAMESHIFT_CODING	SRD5A3
4:71099858	NON_SYNONYMOUS_CODING	C4orf7
5:125807980	NMD_TRANSCRIPT,NON_SYNONYMOUS_CODING	GRAMD3
5:127493810	NON_SYNONYMOUS_CODING	SLC12A2
5:131534043	NON_SYNONYMOUS_CODING	P4HA2
5:137750870	NMD_TRANSCRIPT,3PRIME_UTR	KDM3B
5:140347720	NON_SYNONYMOUS_CODING	PCDHAC2
5:148392139	NMD_TRANSCRIPT,SPLICE_SITE,INTRONIC	SH3TC2
5:148748040-148748041	FRAMESHIFT_CODING	PCYOX1L
5:150514033	NMD_TRANSCRIPT,INTRONIC	ANXA6
5:179301914-179301915	FRAMESHIFT_CODING	TBC1D9B
5:180661444	NON_SYNONYMOUS_CODING	TRIM41
5:26885803	NON_SYNONYMOUS_CODING	CDH9
5:39393402	NON_SYNONYMOUS_CODING	DAB2

Localización	Consecuencia	Gen
5:41199989	NON_SYNONYMOUS_CODING	C6
6:106989119	STOP_GAINED	AIM1
6:108066160	NON_SYNONYMOUS_CODING	SCML4
6:10894066	NMD_TRANSCRIPT,INTRONIC	TMEM14B
6:111672826	NMD_TRANSCRIPT,INTRONIC	REV3L
6:137323240	NON_SYNONYMOUS_CODING	IL20RA
6:143755085	NON_SYNONYMOUS_CODING	ADAT2
6:146350888	NON_SYNONYMOUS_CODING	GRM1
6:150092333	NON_SYNONYMOUS_CODING	PCMT1
6:158505033	NON_SYNONYMOUS_CODING,SPLICE_SITE	SYNJ2
6:162137079	NMD_TRANSCRIPT,INTRONIC	PARK2
6:166780371	NON_SYNONYMOUS_CODING	BRP44L
6:25762206	NON_SYNONYMOUS_CODING	SLC17A4
6:26251895	NON_SYNONYMOUS_CODING	HIST1H2BH
6:27216670	NMD_TRANSCRIPT,INTRONIC	PRSS16
6:29080313	NON_SYNONYMOUS_CODING	OR2J3
6:35288733	NON_SYNONYMOUS_CODING	DEF6
6:42625824	NON_SYNONYMOUS_CODING	UBR2
6:44120311	NMD_TRANSCRIPT,INTRONIC	TMEM63B
6:52993614	NON_SYNONYMOUS_CODING	GCM1
6:5369371	NON_SYNONYMOUS_CODING	FARS2
6:53883852	NON_SYNONYMOUS_CODING	MLIP
6:56458642	NON_SYNONYMOUS_CODING	DST
6:7373937	NON_SYNONYMOUS_CODING	CAGE1
6:97587113	NON_SYNONYMOUS_CODING	KLHL32
7:100816747	NON_SYNONYMOUS_CODING	C7orf52
7:100843707	NON_SYNONYMOUS_CODING	MOGAT3
7:103061245	STOP_GAINED	SLC26A5
7:103322630	NON_SYNONYMOUS_CODING	RELN
7:103629593	NON_SYNONYMOUS_CODING	RELN
7:105189096	NON_SYNONYMOUS_CODING	RINT1
7:122342692	STOP_GAINED	RNF148
7:124532388	NON_SYNONYMOUS_CODING	POT1
7:126173719	NON_SYNONYMOUS_CODING	GRM8
7:131196118	NMD_TRANSCRIPT,NON_SYNONYMOUS_CODING	PODXL
7:139415828-139415829	FRAMESHIFT_CODING	HIPK2
7:139661947	NON_SYNONYMOUS_CODING	TBXAS1
7:151805352	NMD_TRANSCRIPT,3PRIME_UTR	GALNT11
7:15652176	NON_SYNONYMOUS_CODING	MEOX2
7:17873695	NON_SYNONYMOUS_CODING	SNX13

Localización	Consecuencia	Gen
7:47913498	NMD_TRANSCRIPT,INTRONIC	HUS1
7:82579220	NON_SYNONYMOUS_CODING	PCLO
7:938631	NMD_TRANSCRIPT,INTRONIC	COX19
7:97863080	NON_SYNONYMOUS_CODING	TECPR1
8:103282355	NON_SYNONYMOUS_CODING	UBR5
8:10465042	NON_SYNONYMOUS_CODING	RP1L1
8:113293466	NON_SYNONYMOUS_CODING	CSMD3
8:117869509	NON_SYNONYMOUS_CODING	RAD21
8:120816201	NMD_TRANSCRIPT,3PRIME_UTR	TAF2
8:125078713	NON_SYNONYMOUS_CODING	FER1L6
8:24321441	NON_SYNONYMOUS_CODING	ADAM7
8:29194701	NON_SYNONYMOUS_CODING	DUSP4
8:3263708	NON_SYNONYMOUS_CODING	CSMD1
8:3266971	STOP_GAINED	CSMD1
8:37794295	NON_SYNONYMOUS_CODING	GOT1L1
8:68116998	STOP_GAINED	ARFGEF1
9:101910034	NON_SYNONYMOUS_CODING	TGFBR1
9:104324528	NON_SYNONYMOUS_CODING,SPLICE_SITE	RNF20
9:119158891	NON_SYNONYMOUS_CODING	PAPPA
9:125910149	NON_SYNONYMOUS_CODING,SPLICE_SITE	STRBP
9:130151302	NON_SYNONYMOUS_CODING	GARNL3
9:130442485	NON_SYNONYMOUS_CODING	STXBP1
9:132980232	NON_SYNONYMOUS_CODING	NCS1
9:134034841	STOP_GAINED	NUP214
9:18906804	NMD_TRANSCRIPT,NON_SYNONYMOUS_CODING	ADAMTSL1
9:32467823	NON_SYNONYMOUS_CODING	DDX58
9:711364-711365	FRAMESHIFT_CODING	KANK1
9:711368	NON_SYNONYMOUS_CODING	KANK1
9:74345104	NMD_TRANSCRIPT,3PRIME_UTR	TMEM2
9:79867264	NON_SYNONYMOUS_CODING	VPS13A
9:88611457-88611458	FRAMESHIFT_CODING	NAA35
9:88611460	NON_SYNONYMOUS_CODING	NAA35
9:95947866	NON_SYNONYMOUS_CODING	WNK2
9:97063105	NON_SYNONYMOUS_CODING	ZNF169
10:101578562	NON_SYNONYMOUS_CODING	ABCC2
10:101716497	NON_SYNONYMOUS_CODING	DNMBP
10:102275768	NMD_TRANSCRIPT,INTRONIC	SEC31B
10:104130553	NON_SYNONYMOUS_CODING	GBF1
10:111882016	NON_SYNONYMOUS_CODING	ADD3
10:112540854	NON_SYNONYMOUS_CODING	RBM20

Localización	Consecuencia	Gen
10:116373421	NON_SYNONYMOUS_CODING	ABLIM1
10:118318678	NON_SYNONYMOUS_CODING	PNLIP
10:127569284	NON_SYNONYMOUS_CODING	DHX32
10:6255709	NON_SYNONYMOUS_CODING,SPLICE_SITE	PFKFB3
10:6264998	NMD_TRANSCRIPT,INTRONIC	PFKFB3
10:70956826	NON_SYNONYMOUS_CODING	SUPV3L1
10:75283506-75283507	SPLICE_SITE,FRAMESHIFT_CODING	USP54
10:88651891	NON_SYNONYMOUS_CODING	BMPR1A
10:91178199	STOP_GAINED	IFIT5
11:1023964	NON_SYNONYMOUS_CODING	MUC6
11:11454308	NON_SYNONYMOUS_CODING	GALNTL4
11:117784455	NMD_TRANSCRIPT,INTRONIC	TMPRSS13
11:123988461	NON_SYNONYMOUS_CODING	VWA5A
11:1281958	NON_SYNONYMOUS_CODING,SPLICE_SITE	MUC5B
11:17522662	NMD_TRANSCRIPT,3PRIME_UTR	USH1C
11:18735601	NMD_TRANSCRIPT,NON_SYNONYMOUS_CODING	IGSF22
11:28143667	NMD_TRANSCRIPT,INTRONIC	METTLL15
11:315003	NON_SYNONYMOUS_CODING	IFITM2
11:44297176	NON_SYNONYMOUS_CODING	ALX4
11:45992864	NON_SYNONYMOUS_CODING	PHF21A
11:47359241	NMD, NON_SYNONYMOUS_CODING,SPLICE_SITE	MYBPC3
11:55136236	NON_SYNONYMOUS_CODING	OR4A15
11:55735611	NON_SYNONYMOUS_CODING	OR10AG1
11:57077788	NMD_TRANSCRIPT,3PRIME_UTR	TNKS1BP1
11:61719391	NON_SYNONYMOUS_CODING	BEST1
11:62416169-62416170	FRAMESHIFT_CODING	INTS5
11:62607023	NON_SYNONYMOUS_CODING	WDR74
11:65348561	STOP_GAINED	EHBP1L1
11:65688806	NON_SYNONYMOUS_CODING	DRAP1
11:70172667	NMD_TRANSCRIPT,INTRONIC	PPFIA1
11:74680627	NON_SYNONYMOUS_CODING	SPCS2
12:100444024-100444048	FRAMESHIFT_CODING	UHRF1BP1L
12:110234475	NON_SYNONYMOUS_CODING	TRPV4
12:112165923	NON_SYNONYMOUS_CODING	ACAD10
12:112843066	NON_SYNONYMOUS_CODING	RPL6
12:120960065	NON_SYNONYMOUS_CODING	COQ5
12:123089488-123089489	FRAMESHIFT_CODING	KNTC1
12:12315138	NMD_TRANSCRIPT,INTRONIC	BCL2L14
12:124267663	NON_SYNONYMOUS_CODING	DNAH10
12:124422204	FRAMESHIFT_CODING	CCDC92

Localización	Consecuencia	Gen
12:129190222	NON_SYNONYMOUS_CODING	TMEM132C
12:131283082	NON_SYNONYMOUS_CODING	STX2
12:133384642	NON_SYNONYMOUS_CODING	GOLGA3
12:15656986	NON_SYNONYMOUS_CODING	PTPRO
12:16047039	NMD_TRANSCRIPT,3PRIME_UTR	STRAP
12:20890018	NMD_TRANSCRIPT,INTRONIC	SLCO1C1
12:30827668	NON_SYNONYMOUS_CODING	IPO8
12:31247529	NON_SYNONYMOUS_CODING	DDX11
12:32135016	NON_SYNONYMOUS_CODING	C12orf35
12:42503445	NON_SYNONYMOUS_CODING	GXYLT1
12:52885437	NON_SYNONYMOUS_CODING	KRT6A
12:53186115	NON_SYNONYMOUS_CODING	KRT3
12:53565086	NON_SYNONYMOUS_CODING	CSAD
12:53715230	FRAMESHIFT_CODING	AAAS
12:53895751	NMD_TRANSCRIPT,INTRONIC	TARBP2
12:54368972	NON_SYNONYMOUS_CODING	HOXC11
12:56333339	NMD_TRANSCRIPT,INTRONIC	DGKA
12:58145054	NON_SYNONYMOUS_CODING	CDK4
12:6861168	NON_SYNONYMOUS_CODING	MLF2
12:6972412	NON_SYNONYMOUS_CODING	USP5
12:72032276	NMD_TRANSCRIPT,SYNONYMOUS_CODING	ZFC3H1
12:7361223	NON_SYNONYMOUS_CODING	PEX5
12:9232717	NON_SYNONYMOUS_CODING	A2M
12:9311143	NON_SYNONYMOUS_CODING	PZP
13:100992473	NON_SYNONYMOUS_CODING	PCCA
13:111372278	STOP_LOST	ING1
13:23910385	STOP_GAINED	SACS
13:24798921	NMD_TRANSCRIPT,INTRONIC	SPATA13
13:25353827	NON_SYNONYMOUS_CODING	RNF17
13:26343303	NMD_TRANSCRIPT,3PRIME_UTR	ATP8A2
13:27256989	NON_SYNONYMOUS_CODING	WASF3
13:49719887	NMD_TRANSCRIPT,INTRONIC	FNDC3A
13:74419978	NON_SYNONYMOUS_CODING	KLF12
13:99575608	NON_SYNONYMOUS_CODING	DOCK9
14:104205323	NON_SYNONYMOUS_CODING	PPP1R13B
14:104429508	STOP_GAINED	TDRD9
14:21488969	NON_SYNONYMOUS_CODING	NDRG2
14:24807153	NON_SYNONYMOUS_CODING	RIPK3
14:31869706	STOP_GAINED	HEATR5A
14:51087394	STOP_GAINED	ATL1

Localización	Consecuencia	Gen
14:59113827	NON_SYNONYMOUS_CODING	DACT1
14:64494254	NON_SYNONYMOUS_CODING	SYNE2
14:64519394	NON_SYNONYMOUS_CODING	SYNE2
14:69806260	NON_SYNONYMOUS_CODING	GALNTL1
14:92139276	NON_SYNONYMOUS_CODING	CATSPERB
14:96781920	NON_SYNONYMOUS_CODING,SPLICE_SITE	ATG2B
15:23812286	NON_SYNONYMOUS_CODING	MKRN3
15:30665281-30665282	FRAMESHIFT_CODING	CHRFAM7A
15:40268998-40268999	NON_SYNONYMOUS_CODING	EIF2AK4
15:40289239	NON_SYNONYMOUS_CODING	EIF2AK4
15:40594368	NON_SYNONYMOUS_CODING	PLCB2
15:42302330-42302331	FRAMESHIFT_CODING	PLA2G4E
15:42302338-42302339	FRAMESHIFT_CODING	PLA2G4E
15:43900153	NMD_TRANSCRIPT,3PRIME_UTR	STRC
15:43925147	NMD_TRANSCRIPT,INTRONIC	CATSPER2
15:48720095	NON_SYNONYMOUS_CODING	FBN1
15:49083533	NON_SYNONYMOUS_CODING	CEP152
15:50822009	NON_SYNONYMOUS_CODING	USP50
15:59784567	NON_SYNONYMOUS_CODING	FAM81A
15:62228852	NON_SYNONYMOUS_CODING	VPS13C
15:65447374	NON_SYNONYMOUS_CODING	CLPX
15:65968889	STOP_GAINED	DENND4A
15:74948293	NON_SYNONYMOUS_CODING	EDC3
15:86687071	NON_SYNONYMOUS_CODING	AGBL1
15:91043251	NON_SYNONYMOUS_CODING	IQGAP1
16:11073189	NON_SYNONYMOUS_CODING	CLEC16A
16:1395007-1395008	FRAMESHIFT_CODING	BAIAP3
16:3458560	NON_SYNONYMOUS_CODING	ZNF174
16:3458566	NON_SYNONYMOUS_CODING	ZNF174
16:67040270	NMD_TRANSCRIPT,INTRONIC	CES4A
16:84485640	NON_SYNONYMOUS_CODING	ATP2C2
16:8890008	STOP_GAINED	TMEM186
17:1387456	NON_SYNONYMOUS_CODING	MYO1C
17:17881033	NON_SYNONYMOUS_CODING	LRRC48
17:30348271	STOP_GAINED	LRRC37B
17:33935275	NON_SYNONYMOUS_CODING	AP2B1
17:34264842	NON_SYNONYMOUS_CODING	LYZL6
17:35937655	STOP_GAINED	SYNRG
17:36493046	NON_SYNONYMOUS_CODING	GPR179
17:36865502	NON_SYNONYMOUS_CODING	MLLT6



Localización	Consecuencia	Gen
17:38172826	NON_SYNONYMOUS_CODING	CSF3
17:39165172	NON_SYNONYMOUS_CODING	KRTAP3-1
17:39280076	NON_SYNONYMOUS_CODING	KRTAP4-12
17:39406083	NON_SYNONYMOUS_CODING	KRTAP9-9
17:39525990	NON_SYNONYMOUS_CODING	KRT33B
17:39967439	NON_SYNONYMOUS_CODING	LEPREL4
17:42330656	NON_SYNONYMOUS_CODING	SLC4A1
17:42433338	NON_SYNONYMOUS_CODING	FAM171A2
17:43907856	NON_SYNONYMOUS_CODING	CRHR1
17:48586476	NMD_TRANSCRIPT,INTRONIC	MYCBPAP
17:48625831	NMD_TRANSCRIPT,INTRONIC	SPATA20
17:48646270	NON_SYNONYMOUS_CODING	CACNA1G
17:48681498	NMD_TRANSCRIPT,INTRONIC	CACNA1G
17:54978921	NON_SYNONYMOUS_CODING	TRIM25
17:61573807	NON_SYNONYMOUS_CODING	ACE
17:68129139-68129140	FRAMESHIFT_CODING	KCNJ16
17:72541086	NON_SYNONYMOUS_CODING,SPLICE_SITE	CD300C
17:72916155	NON_SYNONYMOUS_CODING	USH1G
17:72943229	NON_SYNONYMOUS_CODING	OTOP3
17:7661874	NON_SYNONYMOUS_CODING	DNAH2
17:79411556	NON_SYNONYMOUS_CODING	BAHCC1
18:18975429	NON_SYNONYMOUS_CODING	GREB1L
18:42529990	NON_SYNONYMOUS_CODING	SETBP1
18:48510726	NON_SYNONYMOUS_CODING	ELAC1
19:11917388	NON_SYNONYMOUS_CODING	ZNF491
19:14031650	NON_SYNONYMOUS_CODING	CC2D1A
19:14707884	NMD_TRANSCRIPT,INTRONIC	CLEC17A
19:17013544	NON_SYNONYMOUS_CODING	CPAMD8
19:18895815	NON_SYNONYMOUS_CODING	COMP
19:19119192	NON_SYNONYMOUS_CODING	SUGP2
19:2389894	NON_SYNONYMOUS_CODING	TMPRSS9
19:33302201	NON_SYNONYMOUS_CODING	TDRD12
19:4216784	NON_SYNONYMOUS_CODING	ANKRD24
19:42827846	NON_SYNONYMOUS_CODING	TMEM145
19:43411916	NON_SYNONYMOUS_CODING	PSG6
19:43411994	NON_SYNONYMOUS_CODING	PSG6
19:44377699	NON_SYNONYMOUS_CODING	ZNF404
19:44661643	NON_SYNONYMOUS_CODING	ZNF226
19:45911707	NON_SYNONYMOUS_CODING	CD3EAP
19:46857090	NON_SYNONYMOUS_CODING	PPP5C

Localización	Consecuencia	Gen
19:47870258	NMD_TRANSCRIPT,SYNONYMOUS_CODING	DHX34
19:50251362	NON_SYNONYMOUS_CODING	TSKS
19:55107317	NON_SYNONYMOUS_CODING	LILRA1
19:55952009-55952010	FRAMESHIFT_CODING	SHISA7
19:57640858	NON_SYNONYMOUS_CODING	USP29
19:8564154	NON_SYNONYMOUS_CODING	PRAM1
19:9362689	NON_SYNONYMOUS_CODING	OR7E24
20:2398006	NON_SYNONYMOUS_CODING	TGM6
20:33437809	NON_SYNONYMOUS_CODING	GGT7
20:34240895	NMD_TRANSCRIPT,INTRONIC	CPNE1
20:36150809	NON_SYNONYMOUS_CODING	NNAT
20:43929972	NON_SYNONYMOUS_CODING	MATN4
20:45000235	NON_SYNONYMOUS_CODING	ELMO2
20:56140633	NON_SYNONYMOUS_CODING	PCK1
21:34926325	NMD_TRANSCRIPT,SYNONYMOUS_CODING	SON
22:25601187	NON_SYNONYMOUS_CODING,SPLICE_SITE	CRYBB3
22:32111107	NON_SYNONYMOUS_CODING	PRR14L
22:37333484	NON_SYNONYMOUS_CODING	CSF2RB
22:37494577	NON_SYNONYMOUS_CODING	TMPRSS6
22:38336759	NON_SYNONYMOUS_CODING	MICALL1
22:50902780	NON_SYNONYMOUS_CODING	SBF1
X:109507733	STOP_GAINED	AMMECR1
X:15596344	NON_SYNONYMOUS_CODING	ACE2
X:2951422	NON_SYNONYMOUS_CODING	ARSH
X:76855947	NON_SYNONYMOUS_CODING	ATRX
X:77912639-77912640	FRAMESHIFT_CODING	ZCCHC5
X:91090748-91090749	FRAMESHIFT_CODING	PCDH11X
X:91873347	NON_SYNONYMOUS_CODING	PCDH11X
Y:15471823	NON_SYNONYMOUS_CODING	UTY

### Mutaciones presentes en S y revertidas en SuSa R

Localización	Consecuencia	Gen
1:151630779	NMD_TRANSCRIPT,3PRIME_UTR	SNX27
1:152284271	STOP_GAINED	FLG
1:175372428	NON_SYNONYMOUS_CODING	TNR
1:180062736	NON_SYNONYMOUS_CODING	CEP350
1:197391049	NMD_TRANSCRIPT,SYNONYMOUS_CODING	CRB1
1:219366466	NON_SYNONYMOUS_CODING	LYPLAL1
1:57320587	NON_SYNONYMOUS_CODING	C8A
2:112614429	STOP_GAINED	ANAPC1
2:162873647	NON_SYNONYMOUS_CODING	DPP4
2:223787813	NON_SYNONYMOUS_CODING	ACSL3
2:227915769	NON_SYNONYMOUS_CODING	COL4A4
2:247619	NMD_TRANSCRIPT,INTRONIC	SH3YL1
4:185329406	NMD_TRANSCRIPT,3PRIME_UTR	IRF2
5:130970718	NON_SYNONYMOUS_CODING	RAPGEF6
5:37063924-37063925	NON_SYNONYMOUS_CODING	NIPBL
5:90087024	NON_SYNONYMOUS_CODING	GPR98
6:29556127	NON_SYNONYMOUS_CODING	OR2H2
6:37623573	NON_SYNONYMOUS_CODING	MDGA1
6:38810525	NON_SYNONYMOUS_CODING	DNAH8
6:41884544	NON_SYNONYMOUS_CODING	MED20
6:82933293	NON_SYNONYMOUS_CODING	IBTK
7:103251193	NON_SYNONYMOUS_CODING	RELN
7:129045047	NON_SYNONYMOUS_CODING	AHCYL2
9:104433368	NON_SYNONYMOUS_CODING	GRIN3A
9:8341727	NON_SYNONYMOUS_CODING	PTPRD
11:104825505	FRAMESHIFT_CODING	CASP4
11:108143632	NMD_TRANSCRIPT,INTRONIC	ATM
11:118849868	NMD_TRANSCRIPT,NON_SYNONYMOUS_CODING	FOXR1
11:49208267	NON_SYNONYMOUS_CODING	FOLH1
11:6661619	NON_SYNONYMOUS_CODING	DCHS1
11:86017569	NMD_TRANSCRIPT,INTRONIC	C11orf73
12:31854936	NON_SYNONYMOUS_CODING	AMN1
12:51100373	NMD_TRANSCRIPT,3PRIME_UTR	DIP2B
12:62954708	NON_SYNONYMOUS_CODING	MON2
12:7048198	NON_SYNONYMOUS_CODING	ATN1
12:88584252	NON_SYNONYMOUS_CODING	TMTC3
12:9246078	STOP_GAINED	A2M
12:93171787	NON_SYNONYMOUS_CODING	EEA1

Localización	Consecuencia	Gen
15:101438347	NON_SYNONYMOUS_CODING	ALDH1A3
15:81592267	NON_SYNONYMOUS_CODING	IL16
17:38249621	NON_SYNONYMOUS_CODING	THRA
17:38633935	NON_SYNONYMOUS_CODING	TNS4
18:7926610	NON_SYNONYMOUS_CODING	PTPRM
19:17743712	NON_SYNONYMOUS_CODING	UNC13A
19:42085728	NMD_TRANSCRIPT, NON_SYNONYMOUS_CODING	CEACAM21
20:23016431	NON_SYNONYMOUS_CODING	SSTR4
20:60887979	STOP_GAINED	LAMA5
X:125686207	NON_SYNONYMOUS_CODING	DCAF12L1
X:144904206	NON_SYNONYMOUS_CODING	SLITRK2
X:50052676	NON_SYNONYMOUS_CODING	CCNB3

## ANEXO SEGUNDO

Mutaciones somáticas codificantes potencialmente relevantes en el proceso de adquisición de resistencia en tumores testiculares. Las mutaciones resaltadas en gris claro y cursiva indican aquellas presentes en tumores sensibles y revertidas en su derivado resistente. Mutaciones resaltadas en gris oscuro y letras blancas corresponden a cambios que han sido reportados en *Cancer Gene Census*. Las mutaciones encuadradas han sido vinculadas con resistencia a QT con CDDP en la literatura. NSC: no sinónima codificante, SG: stop ganado, SL: stop perdido, FSh: cambio pauta de lectura.

### Perfil mutacional caso 1 (TGT21A/B):

Gen	Conse.	cDNA	Proteína	AA	Codón	TGT21TP	TGT21AX	TGT21BX	TGT21BXQT5
PDCD4	SG	1262	330	E/*	Gag/Tag	0%	0%	0%	53%
DHX8	SG	1688	538	W/*	tGg/tAg	0%	0%	0%	27%
UBTD2	NSC	962	186	G/R	Gga/Aga	0%	0%	0%	56%
OTOF	NSC	252	35	A/S	Gcg/Tcg	0%	0%	0%	54%
RAB1A	NSC	394	68	K/N	aaA/aaT	0%	0%	0%	54%
GABRG2	NSC	613	82	R/P	cGa/cCa	0%	0%	0%	52%
OR52M1	NSC	329	110	A/V	gCc/gTc	0%	0%	0%	52%
MYLK4	NSC	1120	259	K/N	aaG/aaC	0%	0%	0%	50%
FBN3	NSC	6684	2133	G/A	gGc/gCc	0%	0%	0%	50%
PCF11	NSC	2611	720	D/V	gAt/gTt	0%	0%	0%	46%
LONRF2	NSC	2419	593	M/I	atG/atT	0%	0%	0%	46%
FLNA	NSC	676	226	R/P	cGg/cCg	0%	0%	0%	45%
ABCC4	NSC	3012	965	R/W	Agg/Tgg	0%	0%	0%	42%
FAM113A	NSC	1123	259	H/Q	caC/caA	0%	0%	0%	41%
SPATA7	NSC	1736	521	D/Y	Gat/Tat	1%	0%	0%	34%
ARRDC3	NSC	425	53	G/V	gGa/gTa	1%	0%	0%	31%
ZFP90	NSC	685	217	R/I	aGa/aTa	0%	0%	0%	28%

Gen	Conse.	cDNA	Proteína	AA	Codón	TGT21TP	TGT21AX	TGT21BX	TGT21BXQT5
ZNF438	NSC	1558	332	V/L	Gtg/Ttg	0%	0%	0%	25%
CNTLN	NSC	1010	328	R/S	agG/agT	0%	1%	0%	25%
MUC16	NSC	10699	3499	R/G	Agg/Ggg	0%	1%	0%	21%
PCDHGA6	NSC	1843	615	G/R	Gga/Aga	0%	0%	0%	20%
RPS6KA5	NSC	328	38	T/I	aCa/aTa	0%	0%	0%	18%
KRT35	NSC	1236	368	R/Q	cGg/cAg	0%	0%	0%	16%
RTL1	NSC	3043	995	P/L	cCt/cTt	0%	0%	0%	16%
<b>MBD5</b>	<b>NSC</b>	<b>2241</b>	<b>415</b>	<b>G/V</b>	<b>gGt/gTt</b>	<b>38%</b>	<b>32%</b>	<b>34%</b>	<b>0%</b>
<b>LRP1</b>	<b>NSC</b>	<b>1971-1973</b>	<b>502-503</b>	<b>RT/P</b>	<b>cGGAcc/cc</b>	<b>19%</b>	<b>22%</b>	<b>19%</b>	<b>0%</b>

**Perfil mutacional caso 2 (TGT12):**

Gen	Conse.	cDNA	Proteína	AA	Codón	TGT12TP	TGT12X	TGT12XQT4
CYBB	NSC	900	141	G/V	gGa/gTa	0%	0%	35%
SYTL2	NSC	162	23	Q/L	cAg/cTg	0%	0%	33%
SEC63	NSC	1229	350	R/H	cGt/cAt	0%	0%	23%
NAV3	NSC	2220	683	M/L	Atg/Ctg	0%	0%	22%
BSDC1	NSC	256	82	R/K	aGg/aAg	0%	0%	21%
UTP15	NSC	1173	175	D/Y	Gac/Tac	0%	0%	19%
ODZ4	NSC	1712	417	T/A	Aca/Gca	0%	0%	19%
MSH3	NSC	2601	841	A/T	Gct/Act	0%	0%	19%
ODZ4	NSC	1709	416	T/A	Acc/Gcc	0%	0%	19%
GAS2L2	NSC	642	205	P/L	cCc/cTc	0%	0%	16%

## Perfil mutacional caso 3 (TGT1):

Gen	Conse.	cDNA	Proteína	AA	Codón	TGT1TP	TGT1X	TGT1XQT4
MRPS30	SG	668	210	W/*	tgG/tgA	0%	0%	42%
HECTD1	SG	6764	2092	S/*	tCa/tGa	0%	0%	21%
IQCF5	SG	147	49	C/*	tgC/tgA	0%	0%	17%
STK31	SG	848	243	W/*	tgG/tgA	0%	0%	16%
RNF8	SG	331	72	W/*	tgG/tgA	0%	0%	13%
LRRTM3	FSh	1940-1941	464-465	-	-	0%	0%	27%
PGRMC1	NSC	554	148	A/D	gCc/gAc	0%	0%	100%
BTK	NSC	1097	262	G/C	Ggc/Tgc	0%	0%	94%
COL4A5	NSC	683	147	G/R	Gga/Aga	0%	0%	76%
THOC2	NSC	570	180	G/W	Ggg/Tgg	0%	0%	74%
TNFRSF10B	NSC	934	217	G/R	Gga/Aga	0%	0%	69%
CDC42BPG	NSC	4154	1385	K/M	aAg/aTg	0%	0%	64%
MATN2	NSC	884	296	G/R	Gga/Aga	0%	0%	56%
HDGFL1	NSC	216	69	P/L	cCc/cTc	0%	0%	55%
DNAH7	NSC	7101	2334	R/C	Cgc/Tgc	1%	0%	50%
RAI1	NSC	2888	963	G/E	gGg/gAg	0%	0%	50%
FAM196B	NSC	2679	433	L/F	Ctt/Ttt	0%	0%	47%
WDR87	NSC	6773	2204	S/R	agC/agA	0%	0%	46%
SV2C	NSC	1959	506	K/M	aAg/aTg	2%	0%	45%
HEATR7B2	NSC	4976	1200	A/S	Gcc/Tcc	0%	0%	44%
CARD10	NSC	912	291	T/M	aCg/aTg	0%	0%	43%
<b>RAP1GDS1</b>	<b>NSC</b>	<b>1037</b>	<b>314</b>	<b>G/R</b>	<b>Gga/Aga</b>	<b>0%</b>	<b>0%</b>	<b>43%</b>
PRAMEF2	NSC	736	217	W/G	Tgg/Ggg	0%	0%	41%
PLCD4	NSC	1322	328	K/R	aAg/aGg	0%	0%	40%



Gen	Conse.	cDNA	Proteína	AA	Codón	TGT1TP	TGT1X	TGT1XQT4
COL14A1	NSC	4957	1563	G/R	Gga/Aga	0%	0%	38%
HNF1A	NSC	946	268	P/L	cCg/cTg	0%	0%	38%
FER1L6	NSC	5272	1689	P/L	cCt/cTt	0%	0%	36%
TCP11L2	NSC	1247	358	G/E	gGa/gAa	0%	0%	34%
RLN3	NSC	109	18	E/K	Gag/Aag	0%	0%	34%
C15orf2	NSC	3223	917	G/R	Ggg/Agg	0%	0%	33%
STT3A	NSC	863	235	R/Q	cGg/cAg	0%	0%	32%
OR2A5	NSC	907	291	S/R	agC/agA	0%	0%	31%
RAB11FIP5	NSC	742	167	Q/H	caG/caT	0%	0%	31%
YTHDF1	NSC	571	77	T/A	Act/Gct	0%	0%	31%
RG9MTD1	NSC	680	200	Q/L	cAg/cTg	0%	0%	28%
CASP8	NSC	269	25	P/S	Ccc/Tcc	0%	0%	27%
ZNF238	NSC	370	74	L/P	cTg/cCg	0%	0%	27%
RND1	NSC	250	84	K/Q	Aag/Cag	0%	0%	26%
C1orf185	NSC	492	164	N/K	aaC/aaG	0%	0%	26%
ANKS1B	NSC	4	2	G/R	Ggg/Agg	0%	0%	26%
F13B	NSC	1624	527	P/L	cCt/cTt	0%	0%	26%
AP3B1	NSC	379	68	G/E	gGg/gAg	0%	0%	25%
FAM179B	NSC	5136	1641	R/K	aGg/aAg	0%	0%	25%
TYK2	NSC	1086	202	L/M	Ctg/Atg	0%	0%	25%
GLT8D2	NSC	553	57	L/F	Ctc/Ttc	0%	0%	25%
SLC8A3	NSC	1297	412	G/E	gGg/gAg	0%	0%	25%
PTGR2	NSC	1084	278	K/N	aaA/aaT	0%	0%	24%
SYNRG	NSC	1023	333	G/C	Ggc/Tgc	0%	0%	24%
GP2	NSC	575	143	G/C	Ggc/Tgc	0%	0%	24%
KPNA4	NSC	1813	503	G/R	Ggc/Cgc	0%	0%	23%

Gen	Conse.	cDNA	Proteína	AA	Codón	TGT1TP	TGT1X	TGT1XQT4
PTPRB	NSC	2212	728	R/Q	cGg/cAg	0%	0%	23%
NMUR1	NSC	186	18	G/R	Ggg/Agg	0%	0%	22%
SF3A2	NSC	703	194	K/M	aAg/aTg	0%	0%	22%
LIN9	NSC	1392	464	F/L	ttC/ttA	0%	0%	21%
PLCB1	NSC	3499	1008	L/F	ttG/ttC	0%	0%	20%
EBF3	NSC	243	57	Q/P	cAg/cCg	0%	0%	20%
PLCB1	NSC	3502	1009	K/N	aaG/aaT	0%	0%	20%
CELSR3	NSC	579	100	G/R	Ggg/Agg	0%	0%	20%
ZIM3	NSC	1162	259	A/V	gCc/gTc	0%	0%	20%
SF3A2	NSC	704	194	K/N	aaG/aaT	0%	0%	20%
PARP1	NSC	1406	421	G/E	gGg/gAg	0%	0%	19%
RYR2	NSC	1276	426	A/T	Gct/Act	0%	0%	17%
KYNU	NSC	1144	296	H/Y	Cat/Tat	0%	0%	17%
SELP	NSC	1755	564	P/S	Cca/Tca	0%	0%	16%
MUC17	NSC	5015	1651	L/F	Ctt/Ttt	0%	0%	16%
P2RX2	NSC	992	331	P/L	cCt/cTt	0%	0%	16%
C2orf3	NSC	611	159	L/F	ttG/ttT	0%	0%	15%
P2RX2	NSC	997	333	E/Q	Gaa/Caa	0%	0%	15%
DCST1	NSC	588	166	S/F	tCc/tTc	1%	0%	15%
<b>HOXA9</b>	<b>NSC</b>	<b>118</b>	<b>40</b>	<b>G/R</b>	<b>Gga/Aga</b>	<b>0%</b>	<b>0%</b>	<b>14%</b>
ZAN	NSC	7613	1066	E/K	Gag/Aag	0%	0%	13%
VWF	NSC	5567	1771	G/E	gGg/gAg	0%	0%	12%
SERPINE1	NSC	535	131	Q/K	Caa/Aaa	0%	0%	11%
DNAH10	NSC	1588	499	A/S	Gct/Tct	0%	0%	11%

#### Perfil mutacional caso 4 (TGT17):

En este caso, al tratarse de un tumor primario refractario en el paciente y al no tener tejido normal de este para comparar, las mutaciones descritas en la tabla son todas aquellas que ya se habían descrito anteriormente en *Cancer Gene Census*.

Gen	Conse.	cDNA	Proteína	AA	Codón	TGT17TP	TGT17X
CCNE1	NSC	1366	395	T/P	Acc/Ccc	65%	48%
CDK12	NSC	922	204	R/T	aGg/aCg	39%	48%
CLTCL1	FSh	3621-3622	1201	-	-	100%	100%
CREB3L1	FSh	1974-1975	508	-	-	100%	100%
CRLF2	NSC	730	244	V/M	Gtg/Atg	100%	100%
ETV5	NSC	406	80	L/F	Ctt/Ttt	58%	53%
FAM22A	NSC	2016	22	G/S	Ggc/Agc	79%	79%
FAM22A	NSC	257	87	G/S	Ggc/Agc	35%	21%
FAM22A	NSC	312	105	R/K	aGg/aAg	13%	12%
FCGR2B	NSC	528	134	V/G	gTg/gGg	52%	55%
MLL3	FSh	2666-2667	816	-	-	21%	18%
MLL3	NSC	1090	291	L/F	Ctt/Ttt	60%	61%
MLL3	NSC	3182	988	C/F	tGt/tTt	45%	44%
MLL3	NSC	2810	864	E/G	gAa/gGa	27%	26%
MLL3	NSC	2731	838	G/S	Ggt/Agt	23%	26%
MLL3	NSC	2753	845	G/E	gGg/gAg	18%	33%
MLL3	NSC	3178	987	Y/H	Tac/Cac	9%	13%
PDE4DIP	FSh	311	30	-	-	18%	12%
PDE4DIP	FSh	1383	388	-	-	15%	11%
PDE4DIP	NSC	1234	304	A/T	Gcc/Acc	28%	26%

<b>Gen</b>	<b>Conse.</b>	<b>cDNA</b>	<b>Proteína</b>	<b>AA</b>	<b>Codón</b>	<b>TGT17TP</b>	<b>TGT17X</b>
PER1	NSC	3689	1151	D/Y	Gac/Tac	37%	56%
RANBP17	FSh	866-869	202-203	-	-	31%	28%
TSHR	NSC	713	155	I/L	Ata/Tta	31%	32%
USP6	NSC	4725	1009	S/F	tCc/tTc	52%	43%
USP6	NSC	1900	67	I/M	atT/atG	18%	16%
USP6	NSC	1901	68	R/W	Cgg/Tgg	18%	16%

## Perfil mutacional caso 5 (TGT44):

En este caso, al tratarse de un tumor primario refractario en el paciente y al no tener tejido normal de este para comparar, las mutaciones descritas en la tabla son todas aquellas que ya se habían descrito anteriormente en *Cancer Gene Census*.

Gen	Conse.	cDNA	Proteína	AA	Codón	TGT44TP	TGT44X	TGT44XQT3
ACSL3	NSC	702	96	K/E	Aaa/Gaa	94%	49%	100%
CLTCL1	FSh	3621-3622	1201	-	-	98%	96%	95%
CREB3L1	FSh	1974-1975	508	-	-	100%	100%	95%
ETV5	FSh	406	80	-	-	57%	54%	57%
ETV5	NSC	406	80	L/F	Ctt/Ttt	57%	54%	57%
FAM22A	NSC	861	160	A/T	Gca/Aca	65%	68%	67%
FAM22A	NSC	2016	22	G/S	Ggc/Agc	63%	62%	72%
FANCD2	NSC	2029	623	Q/P	cAg/cCg	22%	19%	5%
IL6ST	NSC	1712	559	R/K	aGa/aAa	94%	100%	100%
ITK	NSC	382	11	L/P	cTg/cCg	90%	100%	100%
MLL3	FSh	2666-2667	816	-	-	19%	22%	14%
MLL3	NSC	1090	291	L/F	Ctt/Ttt	62%	52%	62%
MLL3	NSC	2731	838	G/S	Ggt/Agc	48%	34%	44%
MLL3	NSC	5806	1863	P/A	Ccc/Gcc	32%	42%	34%
MLL3	NSC	3178	987	Y/H	Tac/Cac	29%	21%	34%
MLL3	NSC	2893	892	G/R	Gga/Aga	25%	22%	32%
MLL3	NSC	2876	886	R/H	cGt/cAt	19%	24%	18%
MLL3	NSC	2404	729	N/D	Aat/Gat	19%	18%	26%
MLL3	SG	2929	904	R/*	Cga/Tga	19%	15%	16%
MLLT6	NSC	189	33	V/A	gTc/gCc	100%	100%	100%
NOTCH2	NSC	466	7	N/S	aAt/aGt	19%	11%	15%

Gen	Conse.	cDNA	Proteína	AA	Codón	TGT44TP	TGT44X	TGT44XQT3
PCM1	NSC	2277	613	I/S	aTt/aGt	58%	48%	48%
PCSK7	NSC	2961	777	P/L	cCg/cTg	50%	62%	53%
PDE4DIP	FSh	1383	388	-	-	18%	12%	15%
PDE4DIP	FSh	311	30	-	-	16%	19%	16%
PDE4DIP	NSC	1234	304	A/T	Gcc/Acc	26%	20%	25%
PDE4DIP	NSC	4301	1371	V/I	Gtc/Atc	18%	16%	21%
PDE4DIP	SG	534	107	R/*	Cga/Tga	21%	15%	21%
PMS2	NSC	1835	577	K/E	Aag/Gag	68%	68%	74%
PMS2	NSC	2676	857	G/A	gGt/gCt	67%	70%	71%
PRDM1	NSC	1295	354	S/N	aGc/aAc	54%	100%	66%
ROS1	NSC	4956	1586	R/H	cGt/cAt	25%	0%	29%
USP6	NSC	1900	67	I/M	atT/atG	16%	24%	19%

Perfil mutacional caso 6 (TGT47):

Gen	Conse.	cDNA	Proteína	AA	Codón	TGT47TP	TGT47X	TGT47XQT4
LIPE	NSC	3498	1074	G/A	gGg/gCg	20%	25%	100%
SNAPC4	NSC	1993-1995	542	S/-	AGC/-	33%	43%	92%
TTC22	FSh	738	235	-	-	42%	39%	91%
PKD1L2	NSC	3146	1049	L/R	cTc/cGc	0%	0%	71%
RASGRF2	NSC	331	94	D/V	gAc/gTc	0%	0%	57%
OR4X1	NSC	489	163	Q/H	caG/caC	0%	0%	56%
RASGRF2	NSC	330	94	D/N	Gac/Aac	0%	0%	50%
NOB1	NSC	684	223	Q/L	cAg/cTg	0%	0%	45%
CYP7A1	NSC	1421	428	L/H	cTc/cAc	0%	0%	43%
PCMTD2	NSC	705	185	G/E	gGg/gAg	0%	0%	38%
HLX	SL	1616	275	*/W	tAg/tGg	0%	0%	38%
KLF12	NSC	767	256	T/I	aCt/aTt	0%	0%	38%
SIGLEC9	NSC	1140	358	L/P	cTg/cCg	0%	0%	36%
URB1	NSC	468	118	V/L	Gtt/Ctt	0%	0%	36%
LCP1	NSC	1401	388	G/E	gGg/gAg	0%	0%	35%
CAND2	NSC	1383	448	R/W	Cgg/Tgg	0%	0%	33%
SHANK2	NSC	64	22	G/R	Ggg/Agg	0%	0%	27%
PNLIPRP2	NSC	747	241	G/R	Ggc/Cgc	0%	0%	26%
SFMBT2	NSC	319	42	T/S	Act/Tct	0%	0%	22%
DNAH12	NSC	2175	665	L/H	cTt/cAt	0%	0%	22%
BCORL1	NSC	3481	1161	Q/K	Cag/Aag	0%	0%	21%
SIK3	NSC	2873	806	G/R	Ggg/Agg	0%	0%	20%
MUL1	NSC	382	82	Q/L	cAg/cTg	0%	0%	18%
AFF4	NSC	825	154	E/V	gAg/gTg	0%	0%	18%

Gen	Conse.	cDNA	Proteína	AA	Codón	TGT47TP	TGT47X	TGT47XQT4
CNR1	NSC	1288	380	A/S	Gca/Tca	0%	0%	16%
MAPK7	NSC	927	176	G/V	gGt/gTt	0%	0%	15%
TRIM68	NSC	363	43	L/H	cTc/cAc	0%	0%	15%
CTAGE5	NSC	1030	259	D/Y	Gat/Tat	0%	0%	14%
METTL13	NSC	2211	694	T/S	Acg/Tcg	0%	0%	13%
F13A1	NSC	1956	564	V/F	Gtc/Ttc	0%	0%	12%
PTPRB	NSC	2473	815	G/E	gGg/gAg	0%	0%	12%
GLCCI1	NSC	1807	417	R/Q	cGg/cAg	0%	0%	12%
ST3GAL6	NSC	168	38	R/Q	cGg/cAg	0%	0%	11%
ZNF595	NSC	345	58	Q/K	Caa/Aaa	0%	0%	11%
<b>ASMTL</b>	<b>FSh</b>	<b>1897</b>	<b>622</b>	-	-	<b>11%</b>	<b>36%</b>	<b>0%</b>



### Perfil mutacional caso 7 (TGT49):

En este caso, al tratarse de un tumor primario refractario en el paciente y al no tener tejido normal de este para comparar, las mutaciones descritas en la tabla son todas aquellas que ya se habían descrito anteriormente en *Cancer Gene Census*.

Gen	Conse.	cDNA	Proteína	AA	Codón	TGT49X
BRCA2	NSC	3030	935	D/N	Gat/Aat	60%
CLTCL1	FS	3621-3622	1201	-	-	96%
CREB3L1	FS	1974-1975	508	-	-	95%
DDX5	NSC	1495	442	V/A	gTg/gCg	19%
DDX5	NSC	1881	571	P/A	Cca/Gca	16%
DNMT3A	NSC	1676	480	V/G	gTg/gGg	37%
ETV5	NSC	406	80	L/F	Ctt/Ttt	49%
FAM22A	NSC	2016	22	G/S	Ggc/Agc	59%
FCGR2B	NSC	528	134	V/G	gTg/gGg	40%
GNAS	SG	490	34	W/*	tGg/tAg	48%
MDS2	NSC	865-866	93	V/VR	gta/gtAAGa	41%
MLL3	NSC	1090	291	L/F	Ctt/Ttt	55%
MLL3	NSC	2731	838	G/S	Ggt/Aggt	33%
MLL3	NSC	3182	988	C/F	tGt/tTt	25%
MLL3	NSC	3178	987	Y/H	Tac/Cac	18%
MLL3	NSC	2893	892	G/R	Gga/Aga	15%
MYST4	NSC	1491	394	D/H	Gac/Cac	19%
MYST4	NSC	1557	416	T/S	Acc/Tcc	16%
NACA	NSC	3647	1122	H/P	cAc/cCc	100%
NACA	NSC	3648	1122	H/Q	caC/caA	92%
NOTCH2	FS	67-68	23	-	-	35%

Gen	Conse.	cDNA	Proteína	AA	Codón	TGT49X
NOTCH2	NSC	2402	709	G/D	gGc/gAc	27%
PALB2	NSC	2790	864	P/S	Cct/Tct	100%
PDE4DIP	FS	5184	1665	-	-	18%
PDE4DIP	FS	1040	273	-	-	18%
PDE4DIP	NSC	1234	304	A/T	Gcc/Acc	28%
PMS2	NSC	2676	857	G/A	gGt/gCt	44%
PRDM1	NSC	1295	354	S/N	aGc/aAc	56%
SDHC	NSC	346	110	E/Q	Gaa/Caa	32%
SMO	NSC	798	173	R/H	cGc/cAc	43%
TSHR	NSC	1477	441	T/P	Acc/Ccc	43%
USP6	NSC	1901	68	R/W	Cgg/Tgg	25%
USP6	NSC	1900	67	I/M	atT/atG	24%

**Perfil mutacional caso 8 (TGT38):**

Gen	Conse.	cDNA	Proteína	AA	Codón	TGT38X	TGT38XQT5
FAM163B	NSC	174	51	V/I	Gtt/Att	50%	100%
PSG9	NSC	688	198	P/R	cCg/cGg	45%	100%
C8orf17	FS	1148-1161	12-16	-	-	50%	91%
DNHD1	NSC	13055	4164	P/L	cCg/cTg	33%	86%
C6orf138	NSC	54	5	V/G	gTg/gGg	0%	63%
SYVN1	NSC	962	307	H/P	cAc/cCc	0%	60%
<b>CBLC</b>	<b>NSC</b>	<b>605</b>	<b>181</b>	<b>T/I</b>	<b>aCc/aTc</b>	<b>0%</b>	<b>52%</b>
HRCT1	NSC	242	49	G/E	gGg/gAg	0%	50%
CPZ	NSC	1612	480	P/A	Ccc/Gcc	0%	47%
NLGN4X	NSC	1796	370	G/V	gGc/gTc	0%	43%
FBN2	NSC	642	68	A/V	gCc/gTc	0%	41%
RPS6KA2	NSC	454	64	E/D	gaG/gaT	0%	41%
GSN	NSC	1089	302	M/I	atG/atA	0%	39%
LUZP4	NSC	263	86	G/R	Gga/Aga	0%	38%
NLRP11	NSC	1676	322	A/G	gCc/gGc	0%	37%
NLRP9	NSC	1425	466	P/L	cCt/cTt	0%	35%
SCAF8	NSC	1592	529	G/R	Gga/Aga	0%	35%
ROBO3	NSC	1846	536	A/S	Gct/Tct	0%	33%
ZFPM2	NSC	1898	573	H/D	Cac/Gac	0%	33%
ABCA12	NSC	6307	2050	E/K	Gaa/Aaa	0%	33%
NAP1L3	FS	911-912	216	-	-	0%	33%
<b>RALGDS</b>	<b>NSC</b>	<b>1050</b>	<b>101</b>	<b>A/S</b>	<b>Gct/Tct</b>	<b>0%</b>	<b>32%</b>
CPZ	NSC	1982	603	P/L	cCa/cTa	0%	32%
ZFPM2	FS	1897	572	-	-	0%	31%

Gen	Conse.	cDNA	Proteína	AA	Codón	TGT38X	TGT38XQT5
FCGBP	NSC	3030	1008	G/R	Ggg/Agg	0%	31%
TBX1	NSC	1286	386	G/A	gGc/gCc	0%	30%
C17orf57	NSC	1482	459	P/L	cCt/cTt	0%	30%
NLGN1	NSC	1520	507	A/V	gCa/gTa	0%	29%
METTL22	NSC	1030	258	G/S	Ggt/Agt	0%	29%
TECTA	SG	1569	523	Y/*	taC/taG	0%	29%
YPEL3	NSC	822	35	P/L	cCg/cTg	0%	29%
PCNT	NSC	5484	1793	E/Q	Gag/Cag	0%	27%
ZNF347	NSC	634	176	R/I	aGa/aTa	0%	27%
FAM135B	NSC	2572	801	M/L	Atg/Ttg	0%	26%
ANO1	NSC	2030	642	P/L	cCc/cTc	0%	25%
OR2AG2	NSC	144	16	G/W	Ggg/Tgg	0%	25%
PLEKHH1	NSC	1649	503	A/S	Gcg/Tcg	0%	25%
RALYL	NSC	154	19	E/D	gaG/gaT	0%	25%
TNNC2	NSC	251	53	K/M	aAg/aTg	0%	24%
MUC4	NSC	12088	4006	T/S	Act/Tct	0%	24%
UGT2A1	NSC	1589	530	G/E	gGa/gAa	0%	24%
ITGAL	NSC	2474	766	E/D	gaA/gaT	0%	24%
NAALADL2	NSC	1781	551	E/D	gaG/gaT	0%	23%
UBXN11	FS	1725-1728	453-454	-	-	0%	22%
EPHB6	NSC	3333	861	P/T	Cct/Act	0%	21%
MLL5	NSC	1869	495	D/N	Gac/Aac	0%	20%
MECOM	SG	340	108	E/*	Gag/Tag	0%	20%
SLTM	FS	1520-1521	466-467	-	-	0%	20%
UPF3B	NSC	673	210	M/I	atG/atA	0%	20%

Gen	Conse.	cDNA	Proteína	AA	Codón	TGT38X	TGT38XQT5
C6orf138	NSC	185	49	P/T	Ccc/Acc	0%	19%
ZNF318	NSC	3632	1185	G/V	gGc/gTc	0%	19%
TFAP2B	NSC	1474-1476	435-436	NT/N	aaCACc/aac	0%	18%
GRIN2C	NSC	2473	722	T/M	aCg/aTg	0%	18%
MUC4	NSC	7909	2613	S/G	Agc/Ggc	0%	17%
ARHGEF12	NSC	610	47	G/V	gGg/gTg	0%	16%
ATG4C	NSC	1070	288	A/G	gCt/gGt	0%	16%
ADAMTS6	NSC	1038	75	P/L	cCt/cTt	0%	16%
TRIB2	NSC	114	15	G/E	gGg/gAg	0%	16%
ASTN2	NSC	2862	954	L/F	ttG/ttC	0%	16%
BRD1	NSC	2565	850	R/H	cGc/cAc	0%	15%
KLHL9	NSC	1110	321	R/C	Cgc/Tgc	0%	15%
IVL	NSC	276	71	P/R	cCt/cGt	0%	15%
NSD1	NSC	263	88	N/S	aAt/aGt	0%	15%
OR6K6	FS	592	166	-	-	0%	15%
<b>FAM160A1</b>	<b>FS</b>	<b>721</b>	<b>49</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>18%</b>	<b>0%</b>
<b>GRIA4</b>	<b>NSC</b>	<b>611</b>	<b>204</b>	<b>R/T</b>	<b>aGa/aCa</b>	<b>29%</b>	<b>0%</b>
<b>OR51J1</b>	<b>NSC</b>	<b>10</b>	<b>4</b>	<b>S/T</b>	<b>Tct/Act</b>	<b>39%</b>	<b>0%</b>
<b>OR8H3</b>	<b>NSC</b>	<b>520</b>	<b>174</b>	<b>I/F</b>	<b>Att/Ttt</b>	<b>27%</b>	<b>0%</b>
<b>KIF21A</b>	<b>NSC</b>	<b>417</b>	<b>134</b>	<b>K/I</b>	<b>aAa/aTa</b>	<b>22%</b>	<b>0%</b>
MDM2	NSC	845-846	180-181	-/E	-/GAG	32%	0%
<b>MYO1C</b>	<b>NSC</b>	<b>1445</b>	<b>467</b>	<b>K/Q</b>	<b>Aag/Cag</b>	<b>20%</b>	<b>0%</b>
<b>USP22</b>	<b>NSC</b>	<b>792</b>	<b>259</b>	<b>V/L</b>	<b>Gtg/Ctg</b>	<b>29%</b>	<b>0%</b>
<b>KCTD3</b>	<b>NSC</b>	<b>1175</b>	<b>294</b>	<b>T/R</b>	<b>aCg/aGg</b>	<b>25%</b>	<b>0%</b>
<b>OR10Z1</b>	<b>NSC</b>	<b>721</b>	<b>241</b>	<b>C/G</b>	<b>Tgt/Ggt</b>	<b>16%</b>	<b>0%</b>

Gen	Conse.	cDNA	Proteína	AA	Codón	TGT38X	TGT38XQT5
<i>ZRANB2</i>	NSC	940	213	S/C	tCt/tGt	24%	0%
<i>GNAS</i>	NSC	709	236	D/N	Gac/Aac	33%	0%
<i>ROPN1B</i>	NSC	452	67	L/I	Cta/Ata	25%	0%
<i>GABRA1</i>	NSC	412	33	D/N	Gat/Aat	40%	0%
<i>PDE4D</i>	NSC	260	87	A/E	gCa/gAa	26%	0%
<i>PCDHGA5</i>	NSC	2179	727	A/P	Gct/Cct	56%	0%
<i>PRDM9</i>	NSC	1164	122	Q/K	Cag/Aag	43%	0%
<i>DCBLD1</i>	NSC	563	148	A/G	gCg/gGg	28%	0%
<i>MAGEB4</i>	NSC	1062	289	L/S	tTg/tCg	31%	0%
<i>WDR44</i>	NSC	2768	779	N/K	aaC/aaG	39%	0%
<i>FAM47A</i>	NSC	2350	766	D/E	gaC/gaA	32%	0%
<i>GRIN2B</i>	NSC	1864	552	E/Q	Gag/Cag	15%	0%
<i>STK4</i>	SG	392	117	R/*	Cga/Tga	26%	0%

**Perfil mutacional caso 9 (TGT34):**

Gen	Conse.	cDNA	Proteína	AA	Codón	TGT34TP	TGT34X	TGT34XQT4
PTPN9	SG	1263	265	W/*	tgG/tgA	0%	0%	32%
FCGR3B	NSC	255	86	N/S	aAc/aGc	38%	38%	100%
CACNA1G	NSC	1633	545	A/S	Gcc/Tcc	40%	42%	86%
OR11L1	NSC	379	108	G/D	gGc/gAc	42%	24%	85%
PREP	NSC	2194	667	S/R	agC/agA	0%	0%	52%
EXOC4	NSC	1077	241	K/N	aaA/aaT	0%	0%	38%
GRIA2	NSC	449	109	R/S	agA/agT	0%	0%	36%
INPP4B	NSC	1935	579	S/P	Tct/Cct	0%	0%	31%
NHS	NSC	2860	841	D/V	gAt/gTt	0%	0%	30%
STOX1	NSC	994	304	D/V	gAt/gTt	0%	0%	29%
ATXN7L1	NSC	104	27	R/T	aGa/aCa	0%	0%	27%
C16orf7	NSC	1456	444	A/D	gCc/gAc	0%	0%	26%
HNRNPA1	NSC	929-930	292-293	-/G	-/GGA	0%	0%	25%
REV3L	NSC	846	131	T/A	Aca/Gca	0%	0%	25%
DNAH3	NSC	6726	2242	R/S	agG/agT	0%	0%	25%
NCOR2	NSC	1903	583	T/S	Acc/Tcc	0%	0%	23%
FLNB	NSC	2921	919	Q/L	cAg/cTg	0%	0%	22%
ZHX3	NSC	365	2	A/V	gCc/gTc	0%	0%	21%
ACSBG1	NSC	396	112	A/S	Gcc/Tcc	0%	0%	21%
CILP2	NSC	2619	845	R/L	cGt/cTt	0%	0%	21%
PANK2	NSC	163	55	E/K	Gag/Aag	0%	0%	19%
ITGB4	NSC	1295	432	G/E	gGg/gAg	0%	0%	19%
ZNF609	NSC	412	138	I/V	Att/Gtt	0%	0%	19%
NTS	NSC	634	96	Q/H	caG/caC	0%	0%	18%

Gen	Conse.	cDNA	Proteína	AA	Codón	TGT34TP	TGT34X	TGT34XQT4
WTAP	NSC	2647	297	N/S	aAc/aGc	0%	0%	18%
MARCH10	NSC	2641	801	S/R	agC/agA	0%	0%	18%
DENND1A	NSC	361	23	R/Q	cGg/cAg	0%	0%	18%
WTAP	NSC	2676	307	P/S	Cca/Tca	0%	0%	18%
CCNYL1	NSC	221	75	V/I	Gta/Ata	0%	0%	18%
BRD1	NSC	2709	898	F/Y	tTc/tAc	0%	0%	18%
CEP104	NSC	573	85	V/F	Gtt/Ttt	0%	0%	17%
ZCCHC7	NSC	695	125	Y/C	tAt/tGt	0%	0%	17%
GBX2	NSC	675	213	A/S	Gct/Tct	0%	0%	17%
DCAF4L2	NSC	536	147	V/L	Gtg/Ctg	0%	0%	17%
HNRNPF	NSC	508	62	G/E	gGa/gAa	0%	0%	17%
ZFP91	NSC	1681	504	S/A	Tct/Gct	0%	0%	16%
FOSB	NSC	1053	154	N/S	aAc/aGc	0%	0%	16%
WTAP	NSC	2652	299	T/P	Acc/Ccc	0%	0%	16%
PPFIA4	NSC	2705	245	D/G	gAt/gGt	0%	0%	16%
STK35	NSC	1221	317	F/Y	tTc/tAc	0%	0%	15%
<b>HYDIN</b>	<b>NSC</b>	<b>9095</b>	<b>2993</b>	<b>E/G</b>	<b>gAg/gGg</b>	<b>16%</b>	<b>31%</b>	<b>0%</b>
<b>TBKBP1</b>	<b>NSC</b>	<b>982</b>	<b>45</b>	<b>I/V</b>	<b>Atc/Gtc</b>	<b>14%</b>	<b>26%</b>	<b>0%</b>
<b>FCGR3A</b>	<b>NSC</b>	<b>349</b>	<b>106</b>	<b>I/V</b>	<b>Atc/Gtc</b>	<b>16%</b>	<b>19%</b>	<b>0%</b>
<b>PM20D1</b>	<b>NSC</b>	<b>296</b>	<b>84</b>	<b>H/R</b>	<b>cAt/cGt</b>	<b>41%</b>	<b>42%</b>	<b>0%</b>
<b>FCGR2C</b>	<b>NSC</b>	<b>451</b>	<b>118</b>	<b>T/I</b>	<b>aCc/aTc</b>	<b>35%</b>	<b>45%</b>	<b>0%</b>
<b>ADIPOR1</b>	<b>NSC</b>	<b>1061</b>	<b>268</b>	<b>A/P</b>	<b>Gca/Cca</b>	<b>45%</b>	<b>50%</b>	<b>0%</b>
<b>FCGR3B</b>	<b>NSC</b>	<b>377</b>	<b>127</b>	<b>I/V</b>	<b>Atc/Gtc</b>	<b>36%</b>	<b>37%</b>	<b>0%</b>
<b>DHX9</b>	<b>NSC</b>	<b>1872</b>	<b>566</b>	<b>R/K</b>	<b>aGg/aAg</b>	<b>40%</b>	<b>49%</b>	<b>0%</b>
<b>NPR3</b>	<b>NSC</b>	<b>1128</b>	<b>262</b>	<b>A/V</b>	<b>gCg/gTg</b>	<b>38%</b>	<b>24%</b>	<b>0%</b>
<b>POM121C</b>	<b>NSC</b>	<b>497</b>	<b>166</b>	<b>P/Q</b>	<b>cCg/cAg</b>	<b>25%</b>	<b>35%</b>	<b>0%</b>



