



Archivos Españoles de Urología

ISSN: 0004-0614

urologia@arch-espanoles-de-urologia.es

Editorial Iniestares S.A.

España

Germà-Lluch, Josep Ramon; Piulats, Josep Maria  
BASES MOLECULARES DE LA RESISTENCIA A CISPLATINO EN CÁNCER DE TESTÍCULO  
Archivos Españoles de Urología, vol. 66, núm. 5, junio, 2013, pp. 524-535  
Editorial Iniestares S.A.  
Madrid, España

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181031087014>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica  
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal  
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

## **BASES MOLECULARES DE LA RESISTENCIA A CISPLATINO EN CÁNCER DE TESTÍCULO**

Josep Ramon Germà-Lluch y Josep Maria Piulats.

Instituto Catalán de Oncología de Hospitalet. IDIBELL. Hospitalet. Barcelona. España.

**Resumen.-** El cisplatino ha sido, desde su introducción hace algo más de 30 años, la piedra angular del tratamiento de los tumores germinales testiculares y parte fundamental en los esquemas administrados en múltiples tumores de origen ovárico, pulmón, cabeza y cuello, vejiga, entre otros. Algunos tumores presentan resistencia primaria a este fármaco, otros la desarrollarán a pesar de una buena respuesta inicial. En el caso

de los tumores germinales testiculares la gran mayoría son exquisitamente sensibles a esta droga pero hasta un 20% de los pacientes con enfermedad metastásica presentarán resistencia, la mayor parte secundaria tras una muy buena respuesta inicial. El cisplatino actúa uniéndose al ADN para así activar los mecanismos de reconocimiento de daño genético y activar apoptosis por la vía mitocondrial. Los mecanismos de resistencia a cisplatino han sido clasificados en (1) mecanismos que suceden antes de la unión al ADN, y (2) una vez se ha unido al ADN. La mayoría de los avances en el descubrimiento de los mismos han utilizado como modelos otras neoplasias, mayoritariamente tumores de ovario y pulmón. En esta revisión describiremos los mecanismos biológicos que hay detrás de la resistencia al cisplatino desde la perspectiva global pero intentándonos centrar en los tumores germinales testiculares.

**Palabras clave:** Tumores germinales. Cáncer de testículo. Cisplatino. Tratamiento. Resistencia. Biología molecular.



### CORRESPONDENCIA

Josep Ramon Germà-Lluch  
Josep Maria Piulats  
Institut Català d'Oncologia de l'Hospitalet  
IDIBELL.  
Gran Via 199-203.  
08908 L'Hospitalet-Barcelona (España).

jrgerma@iconcologia.net  
jmpiculats@iconcologia.net

**Summary.-** Cisplatin has been the cornerstone of germ cell testicular tumors therapy since its introduction more than 30 years ago, and a basic part of the schemes given to multiple ovarian, lung, head and neck, and bladder tumors among others. Some tumors present primary resistance to this drug, others will develop it despite good initial response. In the case of testicular germ cell tumors most of them are very sensitive to this drug but up to 20% of patients with metastatic disease will present resistance, most of them secondary after a very good initial response. Cisplatin acts by binding to DNA to activate genetic damage recognition mechanisms and apoptosis through the mitochondrial pathway. Resistance mechanisms to cisplatin have been classified in those that happen (1) before its binding to DNA and

(2) once it binds to DNA. Most advances in their discovery have used other neoplasias as models, mainly ovarian and lung tumors. In this review we will describe the biological mechanisms behind resistance to cisplatin from the global perspective but trying to focus in testicular germ cell tumors.

**Keywords:** Germ Cell Tumors. Testicular Cancer. Cisplatin. Treatment. Resistance. Molecular biology.

## INTRODUCCIÓN

Los tumores de células germinales (TCG) son un grupo heterogéneo de neoplasias que suelen aparecer en las gónadas masculinas pero también en las femeninas, así como a lo largo de toda la línea media del organismo como el mediastino, retroperitoneo o la glándula pineal (1). Esta distribución anatómica probablemente correlaciona con la ruta de migración de las células germinales primordiales durante la embriogénesis (2). Los tumores germinales podemos clasificarlos en 5 entidades con diferente epidemiología, curso clínico, anatomía patológica y genética (Tabla I).

El grupo de los tumores de células germinales de testículo (TCGT) constituyen tres de estas 5 entidades: los teratomas y tumores del seno endodérmico de los recién nacidos y niños; los tumores tipo seminoma y no seminoma (NSE) de los adolescentes y adultos jóvenes; y por último el seminoma espermatocítico (1). Esta distinción ha sido aceptada en el 2004 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (3).

Los TCGT tipo I o teratomas y tumores del seno endodérmico (TSE) son tumores que pueden aparecer tanto en las gónadas masculinas como en los ovarios a la vez que en otras áreas a lo largo de la línea media, como el área sacrococcígea. La incidencia es baja de 0.12 por 100,000 personas (4). 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 tiene la capacidad de metastatizar y han de ser abordados de manera más agresiva con esquemas de tratamiento que incluyan la quimioterapia (5). Los TCGT tipo 3 o seminomas espermatocíticos son tumores que aparecen en el testículo a edades superiores a los 50 años. Su incidencia es también baja de 0.20 por 100,000 personas (6,7). Es una enfermedad exclusivamente

testicular y puede ser bilateral hasta en un 5% de los casos. El comportamiento clínico es el de un tumor benigno que se cura con la extirpación del testículo, la orquiectomía.

El TCGT tipo 2 o seminomas/no seminomas (NSE) del adolescente o adulto joven es la neoplasia más frecuente de los tres TCGT y el tumor maligno más frecuente entre los 15 a 34 años de edad (8,9). De los 3 TCGT es el único que no dispone de un modelo preclínico adecuado para su estudio, probablemente esto se debe a la falta de conocimiento de las alteraciones genéticas que predisponen para esta enfermedad. En nuestro laboratorio hemos desarrollado en los últimos años, el único modelo disponible en la actualidad de implantación ortotópica de TCGT tipo 2 que estamos utilizando para el estudio de la biología de estos tumores, conocimiento de mecanismos de resistencia a drogas e intentar descubrir nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de estos tumores (10,11). El foco de esta revisión se centra en el estudio de mecanismos de resistencia a cisplatino (CDDP), la droga más importante en el tratamiento de este tumor. A partir de ahora nos centraremos exclusivamente en los tumores de tipo 2 o seminomas/NSE de adolescentes y adultos jóvenes.

La historia del CDDP comenzó de forma accidental hace 40 años en el laboratorio del físico Barnett Rosenberg en la universidad estatal de Michigan. 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 los experimentos con *Escherichia coli* observó que la apariencia de las bacterias cambiaba y este efecto no era debido al campo eléctrico sino al uso de electrodos hechos con platino, material considerado inerte en ese momento. El análisis químico del medio identificó dos complejos activos como los causantes de este efecto biológico, el *cis*-diammine tetracloroplatino(IV) y el *cis*-isomero  $[PtII(NH_3)_2Cl_2]$ . Este segundo complejo es el que acabo modificándose para dar el CDDP. Las formas isoméricas *trans* resultaron ser mucho menos efectivas. Estos hallazgos fueron publicados en 1965 (12). Durante 1968 el CDDP fue administrado de forma intraperitoneal a ratones portadores de células de sarcoma-180 a dosis de 8 mg/kg demostrando su actividad antitumoral al causar una importante regresión de los tumores en este modelo (13). En 1971 se trató por primera vez un paciente con CDDP dentro de ensayo clínico y los resultados del fase I publicados en 1975 fueron espectaculares con 3 remisiones completas y tres remisiones parciales en 11 pacientes poli-tratados previamente. La aprobación por la *US Food and Drug Administration* (FDA) se produjo en 1978 para

Tabla I. Clasificación de los tumores de células germinales aceptada por la OMS.

Tipo	Localización	Fenotipo	Edad	Origen	Genotipo	Modelo Animal
I	Teste/ovario/ región sacra/				Diploide(teratoma).	
					Aneuploide(TSE) ganancia 1q,	
	retroperitoneo/	Teratoma/TSE	Neonatos y niños	CGP/gonocito	20q y 12(p13); pérdidas 1p, 4	Teratoma murino
	mediastino/cuello/ SNC/otros				y 6q	
II					Aneuploide (+/-triplo) ganancia X,	
	Teste	Seminoma/NSE	>15 años	CGP/gonocito	7, 8, 12p y 21; pérdidas Y, 1p,	No disponible
					11, 13 y 18	
	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 (pinedal)	Germinoma/NSE	Niños	CGP/gonocito	Diploide/tri-tetraploide	No disponible
III	Teste	Seminoma	>50 años	Espermatogonia/ espermatocito	Aneuploide ganancias 9	Seminoma canino
		espermatocítico				
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	Ovulo vacío/ espermatozoa	Diploide (XX y XY)	Ratón androgenote

el tratamiento de neoplasias testiculares y de vejiga urinaria (14).

Desde entonces el CDDP se ha convertido en uno de los agentes quimioterapéuticos más prescritos y más importantes para el tratamiento de los tumores sólidos. Se han seguido investigando y desarrollando nuevos compuestos, por un lado con el objetivo de disminuir su toxicidad renal, como el CBDCA, y por otro intentando aumentar su biodistribución oral como se consigue con el satraplatino (14). Una segunda vía de investigación es entender los mecanismos por los que la enfermedad se hace resistente a este fármaco. Esta resistencia se puede adquirir en el curso del tratamiento, como sucede en los tumores de ovario o los TCG, o presentarse de forma intrínseca desde el inicio del tratamiento, como sucede en el cáncer colorectal, próstata, pulmón o mama (14). Con los tratamientos disponibles en la actualidad, del global de pacientes con TCGT y afectación metastásica conseguiremos curaciones en un 70-80% con poliquimioterapia basada en CDDP. A pesar de esto hasta un 20% de los pacientes diagnosticados con enfermedad diseminada no conseguirán remisiones duraderas y fallecerán por su enfermedad (9,15,16).

## MECANISMO DE ACCIÓN DEL CISPLATINO

El principal mecanismo de acción del CDDP y CBDCA es que tras ser activado al llegar al compartimento intracelular por hidratación de uno de las dos moléculas de cloro, ésta se une de manera covalente al ADN generando complejos ADN-proteína y ADN-ADN, ya sea en la misma cadena o entre cadenas distintas de material genético. Esto activa inmediatamente varias rutas de señalización intracelular con el objetivo de reconocer el daño en el DNA, reparar el daño causado mediante la detención del ciclo celular o iniciar programas de apoptosis por la vía mitocondrial. Las lesiones en el ADN inducidas por platino generan distorsiones, que pueden ser reconocidas por múltiples mecanismos de reparación. Entre todos ellos, el "nucleotide excision repair" (NER) parece ser el más activo a la hora de eliminar CDDP del ADN. En esta fase es importante el papel de p53 que, tras el reconocimiento del daño, actúa parando el ciclo celular en G<sub>1</sub>/S vía transactivación de p21 dando tiempo al DNA a repararse si el daño no es importante, y si esto no es posible induciendo apoptosis mediada por Bax (14,17).

Como ya hemos comentado, CDDP también se une a proteínas. Los mecanismos de citotoxicidad mediados por esta acción no han sido estudiados en profundidad pero pueden ser importantes si tenemos

en cuenta que únicamente el 1% del CDDP intracelular se une al ADN nuclear y que CDDP ha demostrado tener efectos citotóxicos en modelos de células enucleadas (citoplastos) (18).

## Quimiosensibilidad de los TCGT a cisplatino

Los TCGT son un excelente modelo para la identificación de mecanismos moleculares asociados a la resistencia a fármacos. Mientras los seminomas son altamente sensibles tanto a la radioterapia como a la quimioterapia, los tumores NSE son capaces de reparar las roturas de doble cadena inducidas por la radiación y por lo tanto son menos sensibles a esta. A excepción de los teratomas, los tumores NSE son altamente sensibles a la quimioterapia. Esto puede explicarse por las características de las células de las que se originan, las células madre embrionarias. Estas células entran en apoptosis ante el mínimo daño irreparable en el DNA (19). 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 puede estar detrás del desarrollo de resistencia a tratamientos que dañen el DNA (1,20).

Varios estudios han demostrado que las células derivadas de TCGT tienen niveles bajos de miembros del NER, en particular *xeroderma pigmentosum complementation A* (XPA) (19). Esto se ha confirmado en otro estudio a la vez que también demuestra niveles bajos de otros dos miembros del NER, el XPF y el ERCC1 en comparación con líneas celulares provenientes de otros tipos de tumores (21,22). Todos estos estudios revelan que los TCGT presentan una baja capacidad de reparación del DNA y por lo tanto, tras lesionar el DNA con CDDP, prima la apoptosis a la detención del ciclo celular para intentar la reparación del daño. Es conocido que los TCG expresan p53 *wild-type* aunque algunos estudios indican que esta no es funcional o sólo de forma parcial. Han sido descritos microRNAs que se sobreexpresan en TCG y no en testículo normal y que actuarían impidiendo la inhibición que p53 ejerce sobre la CDK2 probablemente vía inhibición directa de la proteína LATS2 que es un conocido inhibidor de CDK2 (23). Recientemente un grupo alemán ha demostrado *in vitro* que la expresión de p53 hipersensible al daño genético es un mecanismo predominante en la respuesta de TCGT a CDDP. En este estudio se demuestra que el silenciamiento de p53 mediante RNA de interferencia es suficiente para generar células resistentes a CDDP, a la vez que a otros agentes terapéuticos no genotóxicos como antagonistas de Mdm2 o inhibidores del proteosoma (24). Otros estudios sugieren mecanismos relacionados con la proteína específica de testículo *high mobility group box* (HMG-domain),

FAS-ligand o con niveles de *serine/arginine-rich protein-specific kinase* (SRPK1) (21,25,26). En resumen, las bases moleculares de la exquisita y única respuesta al tratamiento que presentan los TCG todavía no están del todo aclarados, pero parecen estar relacionados con las características intrínsecas de las células de origen, las CGP/gonocitos.

## MECANISMOS DE RESISTENCIA A CISPLATINO

A pesar de los prometedores resultados obtenidos inicialmente con CDDP y posteriormente con CBDCA, pronto la atención se centró en determinar cómo la enfermedad adquiría mecanismos de resistencia y por qué algunos tumores lo eran desde el inicio. Los primeros estudios *in vitro* demostraron que

la resistencia podía ser mediada por dos mecanismos: (I) un fallo en conseguir niveles intracelulares suficientes del fármaco para ejercer su acción en el DNA; (II) un fallo en iniciar el proceso de apoptosis una vez el medicamento ha ejercido su acción creando los puentes en el DNA. La resistencia a CDDP en muchas células tumorales demuestra tener patrones muy diferentes y mixtos que combinan alteraciones en varios mecanismos relacionados con la captación del CDDP, mecanismos de reconocimiento del daño, reparación del DNA y apoptosis. La mayoría de modelos utilizados para analizar los mecanismos de resistencia a platino han utilizado otros modelos tumorales diferentes a los TCGT, por lo que a continuación describiremos estos mecanismos en general y a continuación la evidencia disponible en la literatura en TCGT.

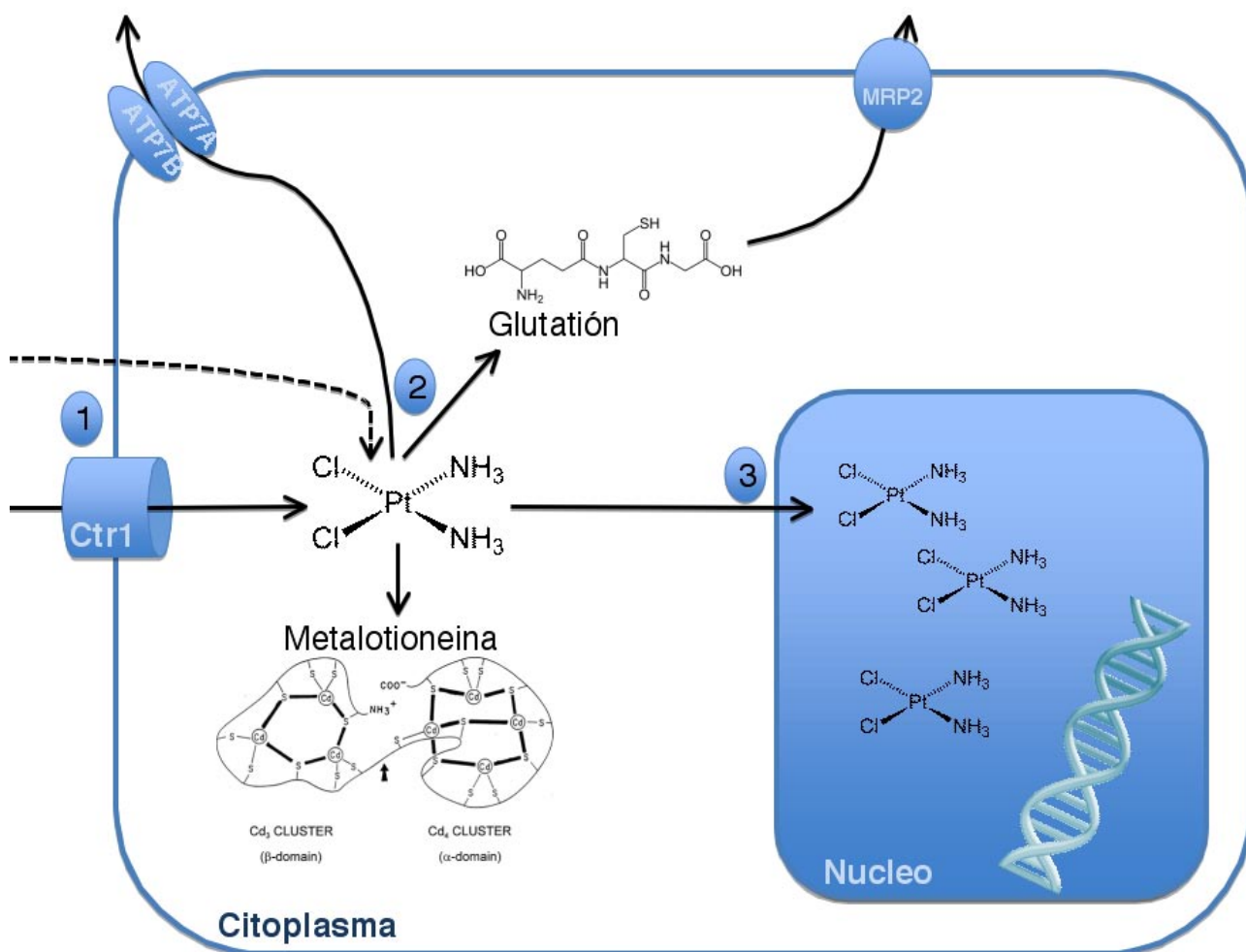


Figura 1. Representación de los mecanismos de resistencia a CDDP y CBDCA que impiden conseguir una correcta concentración en citoplasma para que llegue a unirse al DNA. (1) El CDDP utiliza mecanismos de transporte activo para entrar en la célula aun que en menor cantidad lo puede hacer por difusión pasiva (línea discontinua). (2) Una vez dentro de la célula el CDDP es activado mediante la hidratación de una de las dos moléculas de cloro. Mecanismos de detoxificación celular como transportadores activos (ATP7A; ATP7B), glutatión y MRP2, o conjugación con metalotioneínas, pueden impedir al CDDP su objetivo de llegar al núcleo (3).

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

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 del fármaco en comparación con la célula de origen (27). Hasta hace pocos años el mecanismo molecular complejo por el cual el CDDP entraba en las células estaba muy poco definido. El CDDP es una molécula muy polar y entra en las células muy lentamente en comparación con otros agentes para tratar el cáncer. La captación celular pasiva del CDDP se encuentra influida por factores como la concentración de sodio y potasio, pH o la presencia de agentes reductores. Recientemente ha entrado en juego el descubrimiento de que el CDDP utiliza transportadores de membrana y este mecanismo de difusión celular activa podría ser más importante que la vía pasiva, a la

vez que también jugaría un papel más importante en los mecanismos de resistencia (28). En los últimos años el transportador responsable de la homeostasis del cobre *copper transporter-1* (CTR1) ha demostrado tener un rol sustancial en la entrada de CDDP en la célula (29,30). En experimentos iniciales utilizando fibroblastos embrionarios de ratón *Ctrl<sup>-/-</sup>*, éstos fueron expuestos a concentraciones importantes de 2nM de CDDP y CBDCA. Estas células acumularon alrededor de un 35% de la cantidad del fármaco respecto al acumulado por las mismas células *wild-type*, además la pérdida de *CTR1* llevaba a un aumento de la resistencia de 2 a 3 veces (31). Tanto el cobre como el CDDP a concentraciones clínicamente relevantes producen una rápida regulación negativa de la expresión del *CTR1* en líneas celulares de ovario. Esto ocurre vía internalización del *CTR1* de la membrana plasmática por macropinocitosis seguida de degradación en el proteasoma (32). Los mecanismos de

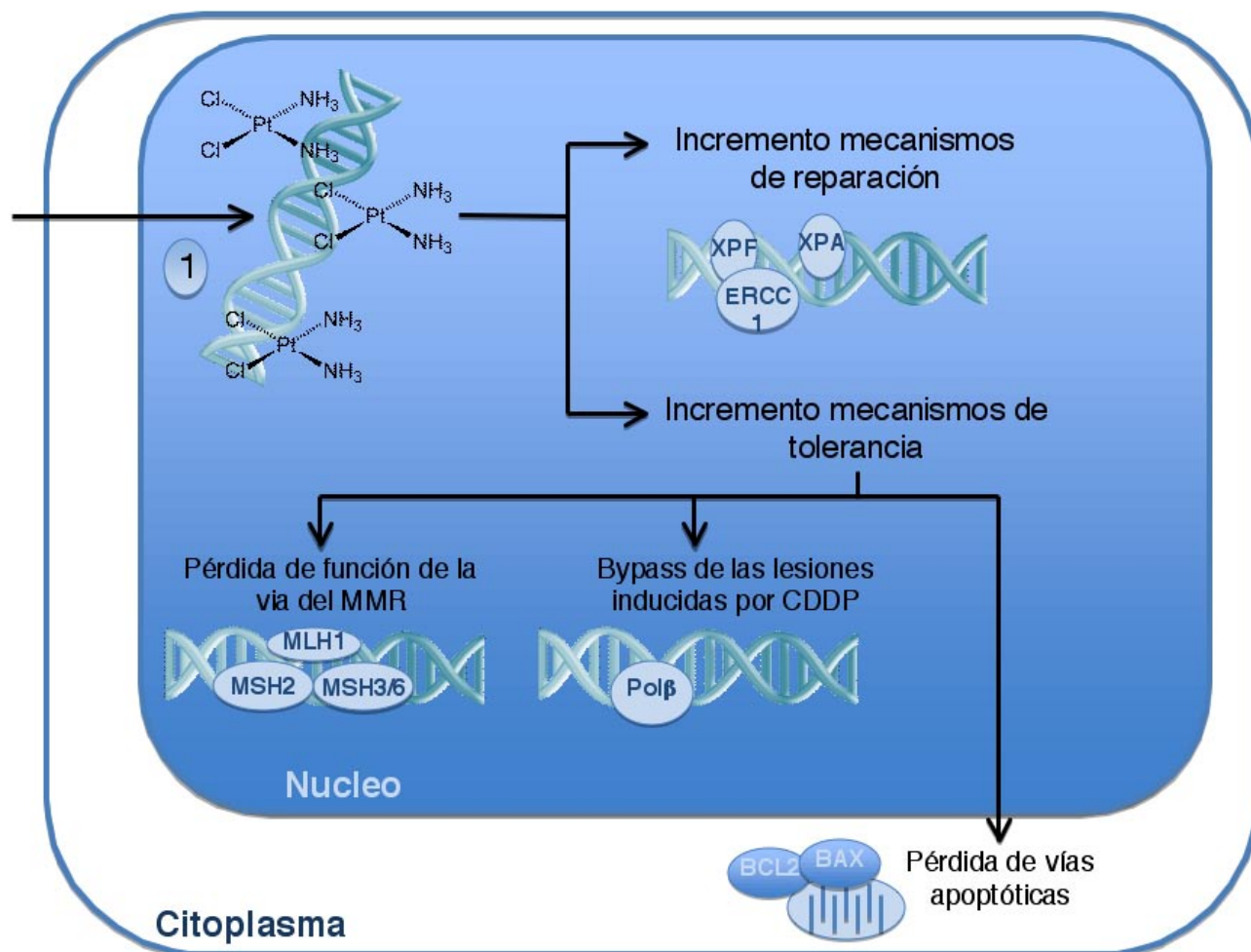


Figura 2. Una vez el CDDP se ha unido al DNA (1) la célula dañada aun puede recuperarse por varias vías. El platino puede ser eliminado del DNA y recuperar el daño causado; pero si esto no es posible la célula no tiene por que morir ya que existen muchas maneras que hacen que esta sea más tolerante al agente tóxico.

resistencia a varias drogas (MDR) están modulados por la expresión de bombas de membrana dependientes de ATP como la glicoproteína-P. A diferencia de otros productos en los que estas proteínas actúan reduciendo la penetración celular, en los compuestos derivados del platino reducen la concentración intracelular (28). Existen trabajos que asocian resistencia a CDDP con proteínas como *MDR1* (*ATP-binding-cassette, ABCB1*), *multidrug resistance protein-1* (*MRP1, ABCC1*), *MRP2* (*CMOAT, ABCC2*), *MRP3* (*ABCC3*) y *MRP5* (*ABCC5*). En los últimos años han tomado más protagonismo a este nivel bombas involucradas en mecanismos de eliminación del cobre, las ATPasas *ATP7A* y *ATP7B* (33). Células de carcinoma de ovario transfectadas con *ATP7A* mostraron un pequeño incremento en la expresión de *ATP7A* pero esto fue suficiente para causar resistencia a CDDP y CBDCA (34).

La evidencia en la literatura del papel de las bombas de membrana en la resistencia a CDDP en TCG es más bien escasa. Un primer estudio demostró que los TCG raramente expresan *lung resistance protein* (LRP), una de las pocas bombas de membrana que pueden eliminar el CDDP (35). En un segundo estudio que compara muestras de pacientes con enfermedad sensible y refractaria a CDDP la expresión de MDR, MRP2 y LRP en una y otra cohorte fueron demasiado bajas para sacar conclusiones (36). Únicamente un estudio realizado por nuestro grupo que compara muestras de pacientes sensibles y refractarios encontró que la positividad para LRP se asociaba con peor evolución clínica, no así MDR, MRP1 ni BCRP (37). Un único estudio utilizando cultivo celular con la línea GCT27 no demostró relación entre la sobreexpresión de los transportadores ABC y la adquisición de resistencia *in vitro* mientras que sí lo demostraban en una línea de cáncer de ovario y colorrectal (38). No se han reportado estudios todavía que correlacionen los mecanismos de transporte (CTR1) y detoxificación (*ATP7A*, *ATP7B*) del cobre en TCG.

parte del papel que tienen las bombas de membrana para internalizar o exportar los compuestos de platino, existe evidencia del papel de la implicación de niveles elevados citoplasmáticos de moléculas que contienen grupos tiol, como causa de resistencia a CDDP y CBDCA. Estas moléculas, como el tripéptido glutatión o las metalotioneinas, son ricas en aminoácidos que contienen azufre como la cisteína o la metionina y participan en los mecanismos de detoxificación ya que el platino se une con fuerte avidez al azufre. En estudios preliminares *in vitro* con un panel de 8 líneas derivadas de tumores de ovario se observó una correlación significativa entre sensibilidad a CDDP/CBDCA y niveles celulares de glutatión

(39). La unión del CDDP con el glutatión debe ser catalizada por la enzima glutatión-S-transferasa (GST) que hace que la molécula, una vez conjugada, sea más aniónica y por lo tanto más susceptible de ser externalizada de la célula por las bombas específicas dependientes de ATP como las *MRP1* o *MRP2* (40). Un estudio que utiliza dos líneas de tumor de ovario provenientes de la misma paciente antes y después del tratamiento, siendo la segunda resistente a platino, demostró un incremento de la GST en las células resistentes en casi tres veces (41). Hay también publicados varios trabajos traslacionales con muestras de biopsias de pacientes que demuestran un papel de la vía del glutatión en resistencia adquirida o intrínseca a CDDP así como a otros agentes alquilantes (42). Se ha correlacionado la pérdida de actividad del CDDP y un incremento en glutatión y/o metalotioneinas *in vitro* en líneas celulares de TCG (43,44). Por otro lado otros grupos han correlacionado este hecho de forma inversa en líneas celulares y muestras clínicas de pacientes con TCG. Recientemente se ha correlacionado polimorfismos funcionales de isoformas de la enzima GST y toxicidad neurológica inducida por CDDP como polineuropatía, síndrome de Raynaud, acúfenos y sordera (45,46).

En resumen podemos decir que la mayoría de TCG presenta una baja expresión de bombas de membrana con afinidad para exportar el CDDP y que presentan niveles bajos de actividad de la GST. Todo esto contribuye a la quimiosensibilidad de esta enfermedad pero probablemente no es un mecanismo común en la adquisición de resistencia aunque sí pueden contribuir en casos individuales de TCG.

### **Mecanismos de resistencia tras la unión al DNA**

Una vez el platino se ha unido al DNA la supervivencia celular, y por lo tanto la resistencia, puede acaecer gracias a mecanismos de reparación del DNA que elimina estos puentes creados por el fármaco, o por mecanismos de tolerancia. Se ha demostrado en varias líneas celulares que las células resistentes a platino presentan una capacidad superior de reparación del DNA si se comparan con líneas celulares sensibles (47). De las 4 principales vías de reparación del DNA que son el "*nucleotide-excision repair*" (NER), "*base-excision repair*" (BER), "*mismatch repair*" (MMR) y "*double-strand-break repair*" (DSBR), es el NER el más importante en eliminar las lesiones inducidas por CDDP del DNA. La proteína más estudiada de este complejo es el *excision repair cross-complementing-1* (ERCC1). ERCC1 forma un heterodímero con la proteína *xeroderma pigmentosum complementation group F* (XPF) y actúa cortando una hebra de DNA en el extremo 5' de la



zona donde el platino se une al DNA. El papel de la vía del NER se ha estudiado *in vitro*. Líneas celulares de cáncer de ovario resistentes a platino mostraron niveles elevados de expresión tanto de ERCC1 como XPF (48). Si se silenciaba ERCC1 mediante RNAs de interferencia se conseguía restituir la sensibilidad al fármaco (49). Además estudios clínicos con pacientes afectas de cáncer de ovario han demostrado correlacionar niveles elevados de mRNA de ERCC1 con resistencia clínica a la quimioterapia (50). En algunos casos se han asociado ciertos polimorfismos del gen de ERCC1 con reducción en la expresión del gen y por lo tanto mayor respuesta a esquemas de quimioterapia que incluyan platino (51). Esta demostrado que el CDDP es eliminado de manera lenta del DNA genómico en un panel de diferentes líneas celulares procedentes de TCG lo que indica una baja actividad del NER (52). En contra de esto dos líneas celulares de TCG con resistencia adquirida a CDDP presentaban la misma capacidad de reparación del DNA que sus precursoras sensibles originales (53). La baja actividad biológica del NER demostrada en TCG ha sido atribuida a proteínas específicas testiculares de la familia de HMG-domain y niveles bajos de XPA, ERCC1 o XPF (19,21,22). La relevancia de XPA es la que ha levantado más atención y existen argumentos a favor y en contra en la bibliografía. Estudios realizados con las líneas celulares 833K y GCT27 demostraron presentar niveles bajos de XPA, a la vez que de ERCC1 y XPF. La restauración *in vitro* de XPA restauró la actividad del NER, mientras que la restauración de ERCC1 o XPF tubo menor efecto (19). Recientemente este mismo grupo ha usado la línea 833K como modelo y no ha demostrado que el incremento de XPA se acompañe de incremento en la resistencia a CDDP o radiación ultravioleta (54). En un estudio utilizando muestras de pacientes se observó que la presencia de XPA evaluada por inmunohistoquímica es diferente entre subtipos histológicos siendo más homogénea y más frecuente en histologías más diferenciadas. Además no se objetivaron diferencias entre muestras de tumores refractarios o sensibles ni se encontraron ampliaciones del gen. Por otro lado sí que se objetivó que todas las muestras provenientes de tumores en recaída tras quimioterapia sí teñían para XPA pero no se consiguió inducir su expresión en líneas celulares tratadas con múltiples dosis sub-letales de CDDP ni se consiguió correlacionar los niveles de proteína con sensibilidad a CDDP en las células tratadas y derivadas resistentes (55). Existen menos datos en la literatura con ERCC1, todos reportados en congreso en forma de comunicaciones y todavía no han sido publicados, con resultados positivos al correlacionar expresión con resistencia aunque tendremos que esperar a las publicaciones para conocer más detalles (56,57).

El incremento de la tolerancia al daño inducido por el platino puede darse por una pérdida de función de la vía del MMR. La pérdida de función de esta vía permite un nivel bajo de resistencia a CDDP y CBDCA pero no a oxaliplatino (58). Durante el MMR, el daño inducido en el DNA por el platino es reconocido por las *MutS homologue protein* (MSH)-2 (MSH2), MSH3 y MSH6 (59). En principio las células que entran en procesos de reparación deficientes en varias ocasiones entran finalmente en apoptosis, por este motivo la pérdida del MMR se traduce en una reducción de la apoptosis y en consecuencia resistencia a la droga. Los TCG han demostrado ser estables a nivel de microsatélites en varios estudios que demuestran alrededor de un 6% de inestabilidad en al menos 1 locus de 8 investigados. En contraste con este dato 5 de 11 (45%) muestras de pacientes con enfermedad refractaria mostraron inestabilidad al menos en 2 locus lo que sugiere la hipótesis de que el MMR esté implicado en el fallo para iniciar la apoptosis y consiguiente resistencia al tratamiento (60). Un estudio posterior, realizado también con un bajo número de casos, determinó un porcentaje superior de inestabilidad del 31.4% pero no se consiguió correlacionar con ninguno de los parámetros clínicos evaluados como estadio tumoral, histología o resistencia a quimioterapia (61). El mismo grupo que reportó los primeros resultados positivos han utilizando un panel de 100 controles y 35 tumores resistentes a CDDP. En este trabajo con mayor tamaño muestral demuestran una mayor incidencia de MSI en los tumores resistentes que en los controles que cuantifican en un 26% versus 0% de MSI en 2 o más de los locus analizados (62). El panel de microsatélites utilizado es el mismo que en el anterior estudio que consta de dos mononucleótidos (BAT25 y BAT26) y 6 dinucleótidos (D2S123, D5S346, D17S250, BAT40, BATRII y MSH6). También se hace por primera vez referencia a la correlación entre una mutación en un gen concreto y resistencia en TCG. Se conoce que las mutaciones en BRAF y KRAS son eventos raros en los TCG habiéndose reportado en menos del 10% de los tumores en series analizadas. En este trabajo se confirma que las mutaciones de KRAS se dan en una muy baja frecuencia (2%) pero se objetiva por primera vez una proporción elevada de mutaciones en BRAF V600E en tumores resistentes contra controles que es de 26% versus 1% ( $p < 0.0001$ ) y esta mutación en BRAF presentaba una buena correlación con MSI ( $p = 0.006$ ).

Como ya hemos hecho mención p53 *wild-type* se expresa en TCG a niveles elevados y este fenómeno se ha hipotetizado como una de las razones para explicar la quimiosensibilidad. El interés de estudiar p53 en enfermos refractarios viene por la evidencia de la adquisición de mutaciones en su

gen tras la exposición *in vitro* en una línea de teratocarcinoma (P19) (63). Dos estudios analizan el estado de p53 en muestras de pacientes refractarios. En un primer estudio se detectaron 4 mutaciones en una cohorte de 28 pacientes, tres de ellos eran teratomas maduros y el cuarto una histología somática derivada de la transformación de un teratoma maduro (64). El teratoma, como hablaremos a continuación, es una histología refractaria a quimioterapia y la contribución de p53 es difícil de estimar. En un segundo estudio no se encontraron mutaciones en 18 casos de pacientes refractarios al igual que los niveles de p53 fueron similares a los de un grupo de pacientes con enfermedad sensible (65). Las discrepancias entre ambos estudios vienen dadas por las diferencias importantes entre las dos poblaciones de pacientes estudiadas y en conclusión podemos decir que las mutaciones adquiridas en p53 por si solas no parecen ser las responsables del fenotipo resistente. Un estudio reciente ha objetivado que en líneas celulares de TCGT resistentes a CDDP mantienen niveles de p53 pero a diferencia de en líneas sensibles, esta p53 se encuentra secuestrada formando un complejo con Mdm2 cuando las células se exponen a altas dosis de CDDP. La inhibición de la generación de este complejo mediante inhibidores de la Mdm2 como Nutlin-3, o RNA de interferencia resultó en una hiperactivación de p53 e inducción de apoptosis tanto en células sensibles a CDDP como en las resistentes (66). Futuros trabajos que demuestren el impacto de estas observaciones en clínica están garantizados.

Mecanismos novedosos de tolerancia al daño se han relacionado con que ciertas clases de DNA polimerasas como la beta y la eta pueden realizar un by-pass sobre la lesión inducida por el platino (67,68). Finalmente la tolerancia al platino y otras drogas puede deberse a un descenso en la expresión o pérdida en vías de señal apoptóticas, tanto en la vía mitocondrial como en la asociada al death-receptor, como las mediadas por proteínas como p53, JNK o miembros anti-apoptóticos o pro-apoptóticos de la familia de Bcl-2 (69). Estos mecanismos de apoptosis también son susceptibles de ser alterados y causar resistencia. Este fenómeno puede ser debido a un incremento de factores anti-apoptóticos como Bcl-2, o defectos en proteínas efectoras de la apoptosis como las caspasas (70). La resistencia a etopósido en líneas celulares de TCG se ha atribuido a un aumento de la ratio de la pro-apoptótica Bax sobre Bcl-2 (71). Esta correlación no ha sido demostrada con CDDP en 4 líneas celulares diferentes provenientes de TCG72. Dos estudios adicionales en tejido tumoral han confirmado una ratio elevada de Bax/Bcl-2 en los componentes invasivos pero no se objetivó correlación con la evolución clínica ni con resistencia (36,73). El producto del gen CDKN1 es p21, un potente inhibi-

dor de las kinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y por lo tanto un importante regulador del ciclo celular. Un reciente estudio ha evidenciado que un factor determinante en la resistencia a CDDP en TCGT es la presencia en el citoplasma de niveles elevados de p21. Esto sucede mayoritariamente en el componente de carcinoma embrionario y protegería de la muerte por apoptosis inducida por CDDP vía inhibición de CDK2. La localización en el citoplasma parece ser crítica para evidenciar este efecto ya que la recolocación de p21 en el núcleo inducida tras bloquear AKT eliminó el fenotipo resistente en líneas celulares de TCGT (74).

El conocimiento que hemos adquirido de los mecanismos de resistencia a platino provienen en la mayoría de estudios *in vitro* realizados con líneas celulares bien caracterizadas. En estos estudios observamos que muchas veces no existe un único mecanismo que explique por completo la resistencia. Se están realizando estudios traslacionales y de validación de estos hallazgos pero todavía no pueden sacarse muchas conclusiones por la poca reproducibilidad o número de casos analizados.

## TERATOMA MADURO

El teratoma maduro es clínicamente resistente a los efectos de la quimioterapia a pesar de que no se han identificado diferencias genéticas entre este y otros componentes histológicos invasivos (70). 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 conoce que los teratomas maduros expresan RB, p21 y p27; lo que indica que estas lesiones son capaces de parar el ciclo celular en G1/S. No se ha encontrado relación entre el número de células positivas para p53 e índice apoptótico aunque el estudio se realizó en una serie corta de teratomas. También, a diferencia de otros TCG invasivos, los teratomas presentan una ratio baja Bax/Bcl-2 (36,75). Todos estos hallazgos sugieren que los teratomas responden al daño con CDDP parando el ciclo celular en G1/S en lugar de entrar en apoptosis mediada por Bax, todo esto a consecuencia de la diferenciación somática que presenta esta histología (1).

## CONCLUSIONES

Los TCGT son un modelo fascinante y único para la investigación de mecanismos de resistencia a tratamientos debido a su elevada tasa de curacio-

nes. Entender los mecanismos que hay detrás de su sensibilidad así como de la aparición de resistencia secundaria a CDDP, el agente quimioterápico más utilizado en la actualidad, debería proporcionarnos claves importantes de lo que podría estar pasando en otras enfermedades neoplásicas y ayudarnos a generar estrategias para revertirla o evitar que esta aparezca. No obstante, pocos trabajos se han centrado en estas cuestiones y han utilizado los TCGT como modelo. Como hemos descrito, existen múltiples mecanismos mediante los cuales la célula tumoral puede revertir los efectos del CDDP o incluso impedir que este llegue a nivel del ADN en el núcleo. No hay una única alteración que pueda explicarlo todo, lo que sugiere que múltiples mecanismos se puedan estar dando al mismo tiempo en una misma célula tumoral. Ello nos indica que la naturaleza de la resistencia a CDDP parece ser de naturaleza multifactorial y los esfuerzos para revertir esta resistencia se tendrán que centrar en bloquear más de un mecanismo de resistencia a la vez. Se necesitan esfuerzos conjuntos entre investigadores básicos, translacionales y especialistas médicos encargados de tratar esta patología para generar esta evidencia que nos permita no solo estratificar mejor a nuestros pacientes, sino conseguir incrementar la curación en este grupo de mal pronóstico que son los TCG refractarios al CDDP.

## **BIBLIOGRAFÍA y LECTURAS RECOMENDADAS (\*lectura de interés y \*\* lectura fundamental)**

1. Oosterhuis JW, Looijenga LH: Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nat Rev Cancer* 5:210-22, 2005
- \*2. Wylie C: Germ cells. *Cell* 96:165-74, 1999
- \*3. Woodward PJ: World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of the Urinary System and Male Genital Organs., eds. Eble, J. N., Sature, G., Epstein, J. I. & Sesterhann, I. A., IARC, Lyon, 2004, pp 217-278
4. Rescorla FJ: Pediatric germ cell tumors. *Semin Surg Oncol* 16:144-58, 1999
5. Gobel U, Schneider DT, Calaminus G, et al: Germ-cell tumors in childhood and adolescence. GPOH MAKEI and the MAHO study groups. *Ann Oncol* 11:263-71, 2000
6. Cummings OW, Ulbright TM, Eble JN, et al: Spermatocytic seminoma: an immunohistochemical study. *Hum Pathol* 25:54-9, 1994
7. Chung PW, Bayley AJ, Sweet J, et al: Spermatocytic seminoma: a review. *Eur Urol* 45:495-8, 2004
8. Ulbright TM: Germ cell neoplasms of the testis. *Am J Surg Pathol* 17:1075-91, 1993
9. Bosl GJ, Motzer RJ: Testicular germ-cell cancer. *N Engl J Med* 337:242-53, 1997
10. Piulats JMV, A. Nadal, M. Martinez-Iniesta, M. Figueras, A. Germa, J. R. Capella, G. Condom, E. Garcia-del-Muro, F. X. Villanueva, A.: Development of a human testicular germ cell tumor model in athymic mice., AACR Meeting Abstracts (#649), 2006
- \*11. Castillo-Avila W, Piulats JM, Garcia Del Muro X, et al: 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* 15:3384-95, 2009
12. Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T: Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature* 205:698-9, 1965
13. Rosenberg B, VanCamp L, Trosko JE, et al: Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature* 222:385-6, 1969
- \*\*14. Kelland L: The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 7:573-84, 2007
- \*\*15. Krega S, Beyer J, Souchon R, et al: 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, 2008
- \*16. Kollmannsberger C, Nichols C, Bokemeyer C: Recent advances in management of patients with platinum-refractory testicular germ cell tumors. *Cancer* 106:1217-26, 2006
- \*17. Siddik ZH: Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 22:7265-79, 2003
18. Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, et al: Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol* 59:657-63, 2001
19. Koberle B, Masters JR, Hartley JA, et al: Defective repair of cisplatin-induced DNA damage caused by reduced XPA protein in testicular germ cell tumours. *Curr Biol* 9:273-6, 1999
- \*\*20. Houldsworth J, Korkola JE, Bosl GJ, et al: Biology and genetics of adult male germ cell tumors. *J Clin Oncol* 24:5512-8, 2006
21. Zamble DB, Mikata Y, Eng CH, et al: Testis-specific HMG-domain protein alters the responses of cells to cisplatin. *J Inorg Biochem* 91:451-62, 2002
22. Welsh C, Day R, McGurk C, et al: Reduced levels of XPA, ERCC1 and XPF DNA repair proteins in testis tumor cell lines. *Int J Cancer* 110:352-61, 2004
23. Voorhoeve PM, le Sage C, Schrier M, et al: A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-

- 373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell* 124:1169-81, 2006
24. Gutekunst M, Oren M, Weilbacher A, et al: p53 hypersensitivity is the predominant mechanism of the unique responsiveness of testicular germ cell tumor (TGCT) cells to cisplatin. *PLoS One* 6:e19198, 2011
  25. Schenk PW, Stoop H, Bokemeyer C, et al: Resistance to platinum-containing chemotherapy in testicular germ cell tumors is associated with downregulation of the protein kinase SRPK1. *Neoplasia* 6:297-301, 2004
  - \*26. Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E, et al: The attractive Achilles heel of germ cell tumours: an inherent sensitivity to apoptosis-inducing stimuli. *J Pathol* 200:137-48, 2003
  27. Kelland LR, Mistry P, Abel G, et al: 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* 52:3857-64, 1992
  28. Gately DP, Howell SB: Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *Br J Cancer* 67:1171-6, 1993
  29. Ishida S, Lee J, Thiele DJ, et al: Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:14298-302, 2002
  30. Katano K, Kondo A, Safaei R, et al: Acquisition of resistance to cisplatin is accompanied by changes in the cellular pharmacology of copper. *Cancer Res* 62:6559-65, 2002
  31. Holzer AK, Manorek GH, Howell SB: Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. *Mol Pharmacol* 70:1390-4, 2006
  32. Holzer AK, Howell SB: The internalization and degradation of human copper transporter 1 following cisplatin exposure. *Cancer Res* 66:10944-52, 2006
  33. Safaei R, Holzer AK, Katano K, et al: The role of copper transporters in the development of resistance to Pt drugs. *J Inorg Biochem* 98:1607-13, 2004
  34. Samimi G, Safaei R, Katano K, et al: Increased expression of the copper efflux transporter ATP7A mediates resistance to cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res* 10:4661-9, 2004
  35. Izquierdo MA, Scheffer GL, Flens MJ, et al: Broad distribution of the multidrug resistance-related vault lung resistance protein in normal human tissues and tumors. *Am J Pathol* 148:877-87, 1996
  - \*36. Mayer F, Stoop H, Scheffer GL, et al: Molecular determinants of treatment response in human germ cell tumors. *Clin Cancer Res* 9:767-73, 2003
  37. Zurita AJ, Diestra JE, Condom E, et al: Lung resistance-related protein as a predictor of clinical outcome in advanced testicular germ-cell tumours. *Br J Cancer* 88:879-86, 2003
  38. Kool M, de Haas M, Scheffer GL, et al: 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* 57:3537-47, 1997
  39. Mistry P, Kelland LR, Abel G, et al: The relationships between glutathione, glutathione-S-transferase and cytotoxicity of platinum drugs and melphalan in eight human ovarian carcinoma cell lines. *Br J Cancer* 64:215-20, 1991
  40. Ishikawa T: The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biochem Sci* 17:463-8, 1992
  41. Lewis AD, Hayes JD, Wolf CR: Glutathione and glutathione-dependent enzymes in ovarian adenocarcinoma cell lines derived from a patient before and after the onset of drug resistance: intrinsic differences and cell cycle effects. *Carcinogenesis* 9:1283-7, 1988
  42. Yang P, Ebbert JO, Sun Z, et al: Role of the glutathione metabolic pathway in lung cancer treatment and prognosis: a review. *J Clin Oncol* 24:1761-9, 2006
  43. Sark MW, Timmer-Bosscha H, Meijer C, et al: Cellular basis for differential sensitivity to cisplatin in human germ cell tumour and colon carcinoma cell lines. *Br J Cancer* 71:684-90, 1995
  44. Meijer C, Timmer A, De Vries EG, et al: Role of metallothionein in cisplatin sensitivity of germ-cell tumours. *Int J Cancer* 85:777-81, 2000
  45. Oldenburg J, Kraggerud SM, Brydoy M, et al: Association between long-term neuro-toxicities in testicular cancer survivors and polymorphisms in glutathione-S-transferase-P1 and -M1, a retrospective cross sectional study. *J Transl Med* 5:70, 2007
  46. Oldenburg J, Kraggerud SM, Cvancarova M, et al: Cisplatin-induced long-term hearing impairment is associated with specific glutathione S-transferase genotypes in testicular cancer survivors. *J Clin Oncol* 25:708-14, 2007
  47. Johnson SW, Swiggard PA, Handel LM, et al: Relationship between platinum-DNA adduct formation and removal and cisplatin cytotoxicity in cisplatin-sensitive and -resistant human ovarian cancer cells. *Cancer Res* 54:5911-6, 1994
  48. Ferry KV, Hamilton TC, Johnson SW: Increased nucleotide excision repair in cisplatin-resistant ovarian cancer cells: role of ERCC1-XPF. *Biochem Pharmacol* 60:1305-13, 2000
  49. Chang IY, Kim MH, Kim HB, et al: Small inter-

- fering RNA-induced suppression of ERCC1 enhances sensitivity of human cancer cells to cisplatin. *Biochem Biophys Res Commun* 327:225-33, 2005
50. Dabholkar M, Bostick-Bruton F, Weber C, et al: ERCC1 and ERCC2 expression in malignant tissues from ovarian cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 84:1512-7, 1992
  51. Reed E: ERCC1 and clinical resistance to platinum-based therapy. *Clin Cancer Res* 11:6100-2, 2005
  52. Koberle B, Grimaldi KA, Sunter A, et al: DNA repair capacity and cisplatin sensitivity of human testis tumour cells. *Int J Cancer* 70:551-5, 1997
  53. Koberle B, Payne J, Grimaldi KA, et al: DNA repair in cisplatin-sensitive and resistant human cell lines measured in specific genes by quantitative polymerase chain reaction. *Biochem Pharmacol* 52:1729-34, 1996
  54. Koberle B, Roginskaya V, Zima KS, et al: Elevation of XPA protein level in testis tumor cells without increasing resistance to cisplatin or UV radiation. *Mol Carcinog* 47:580-6, 2008
  55. Honecker F, Mayer F, Stoop H, et al: Xeroderma pigmentosum group a protein and chemotherapy resistance in human germ cell tumors. *Lab Invest* 83:1489-95, 2003
  56. Azambuja: ERCC1 expression is a predictor of clinical outcome in germ cell tumors treated with standard cisplatin based chemotherapy.
  57. Hernandez: Role of XPA, ERCC1, mtTFA on the survival of patients with metastatic germ cell tumors of testis treated with cisplatin.
  58. Fink D, Nebel S, Aebi S, et al: The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. *Cancer Res* 56:4881-6, 1996
  59. Zdraveski ZZ, Mello JA, Farinelli CK, et al: MutS preferentially recognizes cisplatin- over oxaliplatin-modified DNA. *J Biol Chem* 277:1255-60, 2002
  60. Mayer F, Gillis AJ, Dinjens W, et al: Microsatellite instability of germ cell tumors is associated with resistance to systemic treatment. *Cancer Res* 62:2758-60, 2002
  61. Olasz J, Mandoky L, Geczi L, et al: Influence of hMLH1 methylation, mismatch repair deficiency and microsatellite instability on chemoresistance of testicular germ-cell tumors. *Anticancer Res* 25:4319-24, 2005
  - \*62. Honecker F, Wermann H, Mayer F, et al: Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and BRAF mutation in treatment-resistant germ cell tumors. *J Clin Oncol* 27:2129-36, 2009
  63. Lutzker SG, Mathew R, Taller DR: A p53 dose-response relationship for sensitivity to DNA damage in isogenic teratocarcinoma cells. *Oncogene* 20:2982-6, 2001
  64. Houldsworth J, Xiao H, Murty VV, et al: Human male germ cell tumor resistance to cisplatin is linked to TP53 gene mutation. *Oncogene* 16:2345-9, 1998
  65. Kersemaekers AM, Mayer F, Molier M, et al: Role of P53 and MDM2 in treatment response of human germ cell tumors. *J Clin Oncol* 20:1551-61, 2002
  66. Koster R, Timmer-Bosscha H, Bischoff R, et al: 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:e148-2011
  67. Bassett E, Vaisman A, Tropea KA, et al: Frameshifts and deletions during in vitro translesion synthesis past Pt-DNA adducts by DNA polymerases beta and eta. *DNA Repair (Amst)* 1:1003-16, 2002
  68. Albertella MR, Green CM, Lehmann AR, et al: A role for polymerase eta in the cellular tolerance to cisplatin-induced damage. *Cancer Res* 65:9799-806, 2005
  69. Gadducci A, Cosio S, Muraca S, et al: Molecular mechanisms of apoptosis and chemosensitivity to platinum and paclitaxel in ovarian cancer: biological data and clinical implications. *Eur J Gynaecol Oncol* 23:390-6, 2002
  - \*\*70. Mayer F, Honecker F, Looijenga LH, et al: Towards an understanding of the biological basis of response to cisplatin-based chemotherapy in germ-cell tumors. *Ann Oncol* 14:825-32, 2003
  71. Chresta CM, Masters JR, Hickman JA: Hypersensitivity of human testicular tumors to etoposide-induced apoptosis is associated with functional p53 and a high Bax:Bcl-2 ratio. *Cancer Res* 56:1834-41, 1996
  72. Burger H, Nooter K, Boersma AW, et al: Expression of p53, Bcl-2 and Bax in cisplatin-induced apoptosis in testicular germ cell tumour cell lines. *Br J Cancer* 77:1562-7, 1998
  73. Baltaci S, Orhan D, Turkolmez K, et al: P53, bcl-2 and bax immunoreactivity as predictors of response and outcome after chemotherapy for metastatic germ cell testicular tumours. *BJU Int* 87:661-6, 2001
  - \*74. Koster R, di Pietro A, Timmer-Bosscha H, et al: Cytoplasmic p21 expression levels determine cisplatin resistance in human testicular cancer. *J Clin Invest*, 2010; 120:3594-605
  75. Strohmeyer T, Reissmann P, Cordon-Cardo C, et al: Correlation between retinoblastoma gene expression and differentiation in human testicular tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:6662-6, 1991