

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

Alan Arrieira Azambuja

**Expressão de ERCC1, NF- $\kappa$ B e Transglutaminase como  
fatores preditivos de resposta à quimioterapia em pacientes com  
câncer de testículo**

Porto Alegre  
2016

Alan Arrieira Azambuja

**Expressão de ERCC1, NF- $\kappa$ B e Transglutaminase como fatores preditivos de resposta a quimioterapia em pacientes com câncer de testículo**

Tese apresentada como requisito para a obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Dra Fernanda Bueno Morrone

Porto Alegre  
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

**Ficha Catalográfica**

A991e AZAMBUJA, ALAN ARRIEIRA

Expressão de ERCC1, NF-kB e Transglutaminase como fatores preditivos de resposta a quimioterapia em pacientes com câncer de testículo / ALAN ARRIEIRA AZAMBUJA . – 2016.

105 f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Bueno Morrone.

1. câncer de testículo. 2. quimioterapia. 3. resistência a quimioterapia. 4. cisplatina. I. Morrone, Fernanda Bueno. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

---

A Maria Teresinha Arrieira Azambuja

## AGRADECIMENTOS

A escolha de seguir uma carreira acadêmica nasceu da observação na minha infância da capacidade de minha mãe em educar. Com paciência, sabedoria e imensurável amor guiar me na vida. Por tal razão, dedico a ela essa Tese. Sem dúvida, agradeço profundamente a meu pai, a quem também devo tudo, por ser meu exemplo de caráter, organização, educação e persistência nos seus empreendimentos e na vida.

Agradeço profundamente a minha orientadora Fernanda Morrone, determinante na minha escolha do programa de pós-graduação. Por sempre estar entusiasmada e disponível. Por ter todas as qualidades possíveis e além das imagináveis que um Professor tem. Por sua compreensão nos momentos em que estive perdido na pós-graduação, por sempre me estimular em seguir em frente e, por ser visivelmente amorosa em todos os seus passos pessoais e profissionais.

Às pessoas que estiveram me apoiando ou ao meu lado nesse período, Dra Ana Maria Gaiger, Dr. Mario Wagner, Roberta Zorzetti, Bruna Tertuliano Silva, Dr Edgar Chagas Diefenthaeler, Dr Carlos Barrios, Dra Maria Martha Campos, Tiago Kras, Alcenio Roieski, Adriana Boniatti, Claudia Schavinski, Alex Azambuja, Adriana Dusik, André Azambuja, Arthur Azambuja, equipe do Laboratório Patologistas Reunidos e ao Serviço de Oncologia do Hospital São Lucas da PUCRS.

*Par les soirs bleus d'été, j'irai dans les sentiers,  
Picoté par les blés, fouler l'herbe menue.  
Rêveur, j'en sentirai la fraîcheur à mes pieds.  
Je laisserai le vent baigner ma tête nue.*

*Je ne parlerai pas, je ne penserai rien:  
Mais l'amour infini me montera dans l'âme,  
Et j'irai loin, bien loin, comme un bohémien,  
Par la Nature, -- heureux comme avec une femme.*

Arthur Rimbaud

1870

## Resumo

Tumores de células germinativas testiculares (TGCT) estão associados com uma alta taxa de cura, e são muito sensíveis às platinas. Diferentes mecanismos são relacionados a resistência à cisplatina. Identificar pacientes platino resistentes poderia permitir uma melhor seleção do tratamento, evitando toxicidade desnecessária. Neste estudo, revisamos na literatura possíveis marcadores de resposta às platinas, bem como avaliamos o risco de recorrência relacionado a expressão de *nuclear factor kappa-B* (NF-κB), *excision repair cross-complementation group 1* (ERCC1) e transglutaminase 2 (TG2), em pacientes com TGCT, tratados com combinações de platina. Foram analisados 76 pacientes com TGCT tratados com quimioterapia à base de platina 2001 a 2011 no Departamento de Oncologia do HSL/PUCRS. A análise imuno-histoquímica foi realizada e a expressão correlacionada com dados clínicos e laboratoriais. Cinquenta pacientes foram incluídos, idade média do grupo foi de 28,4 anos (18 a 45), 68% histologia não-seminomatosa. Todos os pacientes foram tratados com bleomicina, etoposide e cisplatina (BEP) ou etoposide e cisplatina (EP). A análise multivariada identificou que as expressões positivas de NF-κB e ERCC1 são fatores de risco independentes para maior recorrência de TGCT após a quimioterapia (RR 3.16 e 2.96). Resultados com transglutaminase 2 não mostraram diferença significativa. A expressão de ERCC1 e NF-κB conferem prognóstico pior para recidiva em pacientes com TGCT tratados com quimioterapia baseada em platina. Estes marcadores podem representar fatores que predizem má evolução clínica e resposta a quimioterapia.

**Palavras-chave:** ERCC1; NF- $\kappa$ B; transglutaminase 2, tumor de células germinativas; cisplatina.



## **Abstract**

Tumors of testicular germ cells (TGCT) are associated with a high cure rate, and are very sensitive to platinum based chemotherapy. Different mechanisms are related to resistance to chemotherapy and higher recurrence. We evaluate the risk of recurrence related to expression of nuclear factor kappa-B (NF- $\kappa$ B), excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1) e transglutaminase 2 (TG2), in patients with TGCT treated with platinum combinations. Seventy-six patients were evaluated with TGCT treated with platinum-based chemotherapy 2001 to 2011 in the Department of Oncology of the HSL/PUCRS. Immunohistochemistry analysis was performed and expression correlated with clinical and laboratory data. Fifty patients were included in the group, mean age was 28.4 (18 to 45), 68% non-seminoma histology. All patients were treated with BEP or EP. Multivariate analysis identified that positive expressions of NF- $\kappa$ B and ERCC1 are independent risk factors for higher recurrence TGCT after chemotherapy (RR 3.16 and 2.96). There was no significance in TG2 cases. In conclusion, expression of ERCC1 and NF- $\kappa$ B give much worse prognosis for relapse to patients with TGCT treated with platinum-based chemotherapy. They may represent markers that predict poor clinical outcome and response to chemotherapy.

**Key-words:** ERCC1; NF- $\kappa$ B; transglutaminase 2, germ cell tumors; cisplatin.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química da cisplatina.....	10
Figura 2 - Ligação da Cisplatina ao DNA.....	11
Figura 3 - <i>Excision repair cross-complementation group 1</i> (ERCC1).....	16
Figura 4 - Mecanismos da Transglutaminase 2 .....	17
Figura 5 - Mecanismo da atividade do fator nuclear <i>kappa</i> B (NF- $\kappa$ B) .....	18

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos tumores de testículo.....	3
Tabela 2 - Estratificação de risco conforme a <i>International Germ Cell Cancer Collaborative Group (IGCCCG)</i> .....	5
Tabela 3 - Eventos adversos relacionados à cisplatina.....	13
Tabela 4 - Mecanismos de resistência à cisplatina .....	15

## LISTA DE SIGLAS

AFP - alfa feto proteína

ATP - trifosfato de adenosina

ATPase - enzima do trifosfato de adenosina

BEP - bleomicina, etoposide, cisplatina

beta-hCG - porção beta da gonadotrofina coriônica humana

BRCA - *breast cancer 1*

DNA - *deoxyribonucleic acid*

EP - etoposide, cisplatina

ERCC1 - *Excision repair cross-complementation group 1*

HSL - Hospital São Lucas

IGCCCG - *International Germ Cell Cancer Collaborative Group*

LDH - Desidrogenase láctica

mL - mililitros

mRNA - *ribonucleic acid messenger*

NF-κB - fator nuclear *kappa B*

ng - nanograma

PUCRS - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

RT-PCR - reação da transcriptase reversa

TCGT - tumores de celular germinativas de testículo

TG2- transglutaminase 2

Ui - unidades internacionais

VIP - vimblastina, etoposide, cisplatina

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO I

1 - Introdução .....	2
1.1 - Câncer de testículo .....	2
1.2 - Marcadores tumorais em câncer de testículo .....	6
1.3 - Fatores prognósticos e preditivos .....	8
1.4 - Cisplatina .....	9
1.5 - Resistência à quimioterapia .....	14
2 - Objetivos .....	19
2.1 - Objetivo Geral.....	19
2.2 - Objetivos Secundários .....	19

### CAPÍTULO II

Artigo de Revisão .....	20
-------------------------	----

### CAPÍTULO III

Artigo Original .....	42
-----------------------	----

### CAPÍTULO IV

Considerações Finais .....	67
----------------------------	----

### CAPÍTULO V

1 - Anexo A - Comprovante de submissão - Artigo Original..	73
2 - Anexo B - <i>Case Report</i> .....	74
3 - Anexo C – Carta de aprovação do Projeto de Pesquisa CEUA/PUCRS.....	86

### CAPÍTULO VI

Referências .....	87
-------------------	----

# CAPITULO I

**1 - INTRODUÇÃO**

**2 - OBJETIVOS**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 - Câncer de Testículo

Neoplasias de células germinativas testiculares representam aproximadamente 1% dos tumores malignos do sexo masculino e são responsáveis por 0,1% de mortalidade relacionada ao câncer em homens. A faixa etária de maior incidência corresponde a homens jovens, entre 15 e 35 anos de idade (SIEGEL *et al.*, 2015).

O câncer de testículo representa um dos mais impressionantes grupos de sucesso terapêutico das platinas atingido a partir do seu uso em protocolos na década dos anos de 1970, mesmo com o advento de inúmeros novos fármacos no mercado quimioterápico, permanecendo o esquema de tratamento com potencial curativo em mais de 95% dos casos (DEVITA, 2015). Antes dos anos 70, correspondia a 11% das mortes por câncer e uma sobrevida em 5 anos do diagnóstico de 64% (EINHORN, 1990). Estas taxas de cura da doença são potencialmente alcançadas mesmo na doença metastática. Entretanto, um grupo de pacientes pode apresentar uma evolução desfavorável com pequena ou nenhuma resposta ao tratamento.

Os tumores de células germinativas testiculares (TCGT) representam a grande maioria dos tumores malignos de testículo (90-95%), que são divididos de acordo com os achados histológicos em seminomas e não-seminomas (JUN *et al.*, 2008). Os seminomas são responsáveis por aproximadamente 50% dos cânceres testiculares e surgem mais frequentemente na terceira década de vida. Por outro lado, os tumores de células germinativas não-seminomatosos

compreendem 40% dos cânceres de testículo e ocorrem mais frequentemente na segunda década de vida (WILLIAMSON *et al.*, 2016). Os 10% dos cânceres de testículo restantes são tumores combinados e que normalmente contêm elementos seminomatosos e não-seminomatosos (Tabela 1).

**Tabela 1 - Classificação dos tumores de testículo** (adaptado de ROBBINS & COTRAN, 2014).

### Tumores de células germinativas

Seminoma

Não Seminoma

Carcinoma Embrionário

Coriocarcinoma

Tumor Seio Endodérmico

Teratoma

Teratoma com Transformação Maligna

Misto

### Tumores Espermatocíticos

#### Tumores do cordão sexual

Tumor de células de Sertoli

Tumor de células de Leydig

Tumor da Célula Granulosa

Mistos

### Gonadoblastoma

Com o desenvolvimento e a utilização de quimioterapia baseada em cisplatina e a integração da cirurgia, os tumores de células germinativas tornaram-se um modelo de neoplasia curável, mesmo em estágio avançado (WILLIAMSON *et al.*, 2016). Atualmente, a sobrevida a longo prazo para homens



com tumor de células germinativas avançado é superior a 90% em 5 anos (WILLIAMSON *et al*, 2016).

O *International Germ Cell Consensus* (IGCCG) desenvolveu um sistema de classificação de risco e prognóstico para câncer de testículo (IGCCG, 1997). Neste sistema, os pacientes são separados em prognóstico desfavorável, intermediário e favorável, com base na histologia, sítio primário, sítios de metástases, e elevação de marcadores tumorais séricos (Tabela 2).

Dois esquemas de quimioterapia são eficazes para pacientes com TCGT de prognóstico favorável: quatro ciclos de etoposide e cisplatina (EP) ou três ciclos de bleomicina, etoposide e cisplatina (BEP) (EINHORN, 2002). O esquema padrão para pacientes de prognóstico desfavorável e intermediário é de quatro ciclos de BEP (DEVITA, 2015). Tentativas para melhorar os resultados nestes subgrupos têm focado na intensificação do regime BEP. Pacientes que tiveram recaída após a quimioterapia inicial podem ser potencialmente curados com regimes de segunda linha e, até mesmo, de terceira linha (FELDMAN *et al.*, 2008).

Os agentes derivados do grupo quimioterápico das platinas são empregados em diversos tipos de neoplasias (DEVITA, 2015). São particularmente ativos contra tumores de testículo, ovário, pulmão, bexiga, trato gastrointestinal, cabeça e pescoço, linfomas, constando como fármacos de primeira escolha no tratamento de muitos desses tumores (LEBWOHL *et al.*, 1998). Na maioria desses tumores em algum momento do seu curso pode ocorrer resistência ao tratamento e as respostas clínicas esperadas não são alcançadas (PEREZ, 1998).

**Tabela 2 - Estratificação de risco conforme a *International Germ Cell Cancer Collaborative Group* (IGCCCG, 1997).**

### Seminoma

Grupo de bom prognóstico

Qualquer dos Critérios:

Qualquer local primário

Sem metástases viscerais (exceto pulmonares)

Alfa feto proteína normal

Grupo de risco intermediário

Qualquer dos Critérios:

Qualquer local primário

Sem metástases viscerais (exceto pulmonares)

Alfa feto proteína normal

Qualquer nível de LDH ou beta hCG

### Não Seminoma

Grupo de bom prognóstico

Qualquer dos Critérios:

Primários do testículo ou retroperitônio

Sem metástases viscerais (exceto pulmonares)

Marcadores tumorais em valores normais

Grupo de risco intermediário

Qualquer dos Critérios:

Primário do testículo ou retroperitônio

Sem metástases viscerais (exceto pulmonares)

Alfa feto proteína 1000 - 10.000 ng/mL,

Beta hCG 5000 - 50.000 mUI/mL

LDH 1.5 a 10 vezes valor de limite inferior normal

Grupo de prognóstico ruim

Qualquer dos Critérios:

Primários do mediastino

Metástases viscerais

Alfa feto proteína > 10.000 ng/mL,

Beta hCG > 50.000 mUI/mL

LDH > 10 vezes valor de limite inferior normal

## 1.2 - Marcadores tumorais em câncer de testículo

Três marcadores tumorais séricos possuem papel na avaliação inicial, acompanhamento de resposta ao tratamento e seguimento de homens com tumores de células germinativas: subunidade beta da gonadotropina coriônica humana (beta-hCG), alfa-fetoproteína (AFP), lactato desidrogenase (LDH)

As concentrações séricas de AFP e, ou beta-hCG estão elevadas em 80 a 85% dos homens com tumores de células germinativas (não-seminomatosos) (FELDMAN *et al*, 2008). Em contrapartida, o marcador beta-hCG está elevado em menos de 25% de seminomas, e AFP não está elevada em seminomas puros. Embora estes marcadores possam fornecer provas de apoio para o diagnóstico inicial de um câncer testicular e são úteis para o prognóstico e estratificação de risco, a sua principal utilidade é para monitorar a resposta ao tratamento e detecção de recorrência (NIEDERHUBER, 2013).

A hCG é produzida como molécula intacta de gonadotrofina coriônica humana. Beta-hCG é o marcador tumoral mais frequentemente elevado em câncer testicular (DEVITA, 2015). O valor normal nos homens é menor do que 5 a 10 UI / L. Os níveis séricos de beta-hCG são elevados em 10 a 20% dos tumores não seminomatosos em estágio inicial e em até 40% dos pacientes com doença avançada (MARTEE, 2016). Elevações hCG no soro são tipicamente vistos em tumores como coriocarcinoma embrionário puro ou misto (DEVITA, 2015).

A produção de hCG por tumores de células germinativas testiculares não-seminomatosos varia dependendo do volume de tumor e os subtipos histológicos. Entre os pacientes com seminomas puros, uma elevação dos níveis

séricos de beta-hCG é observada em 15 a 20% dos casos avançados. Um aumento no soro de beta-hCG reflete principalmente o aumento da carga de tumor, mas não necessariamente um maior potencial metastático (DEVITA, *et al*, 2015).

A alfa-fetoproteína é normalmente produzida pelo saco vitelino fetal e outros órgãos, e é essencialmente indetectável no soro em homens jovens ou adultos. Muitos tecidos recuperam a capacidade de produzir esta proteína oncofetal em um processo neoplásico. No entanto, as concentrações séricas de AFP superior a 10.000 mcg/L são encontradas quase exclusivamente em pacientes com tumores não-seminomatosos de células germinativas ou carcinoma hepatocelular (NIEDERHUBER, 2013).

Seminomas não costumam elevar AFP no soro. No entanto, estudos moleculares demonstraram a presença de mRNA da AFP em quantidades mínimas em pacientes com seminoma, e eventuais elevações mínimas (10,4-16 ng/mL). Concentrações elevadas de AFP sérica são consideradas para o diagnóstico de um tumor não seminomatoso ou suspeita de envolvimento metastático hepático (NIEDERHUBER, 2013).

As concentrações de LDH estão elevadas em 40 a 60 % dos homens com tumores de células germinativas testiculares LDH é um marcador tumoral menos sensível e menos específico do que beta-hCG humana ou AFP para homens com tumores de células germinativas não-seminomatosos, mas pode ser o único marcador que se encontra elevado em alguns seminomas (DEVITA, 2015). O grau de elevação da LDH no soro tem valor prognóstico em homens com doença avançada e é incorporado na *Cancer Collaborative Group* (IGCCCG) sistema de estratificação de risco (WILLIAMSON *et al.*, 2016)

Os níveis de marcadores tumorais pré e pós tratamento são valiosos para o estadiamento, mas ainda mais valiosos para a avaliação de prognóstico e taxa de resposta à quimioterapia. A diminuição dos valores pré tratamento de marcador significa uma resposta tumoral adequada, e um aumento dos níveis de marcadores indicando recaída ou a resistência à terapia. A avaliação da resposta à terapia requer o conhecimento das meias-vidas dos marcadores no soro (beta-hCG e LDH até 3 dias e, AFP até 7 dias) (NIEDERHUBER, 2013).

### **1.3 - Fatores Prognósticos e Preditivos**

Um fator prognóstico é uma característica clínica ou biológica, que é objetivamente mensurável e que fornece informações sobre a evolução provável do câncer em um indivíduo não tratado (RAGGI *et al.*, 2015). Marcadores prognósticos são úteis para a identificação de pacientes com câncer que estão em risco de recaída ou não resposta ao tratamento mais recente. Permite assim uma intervenção ou mudança de planejamento precoce do plano terapêutico. Em câncer de testículo os fatores prognósticos estabelecidos são descritos pela *International Germ Cell Cancer Collaborative Group* e apresentados na Tabela 2, marcadores tumorais (beta-hCG, AFP, LDH), presença de metástases viscerais, localização do tumor primário (testículo, retroperitônio, mediastino), sendo todos avaliados no momento do diagnóstico (IGCCCG, 1997).

Em contraste, um fator preditivo é uma característica clínica ou biológica, que fornece informações sobre o provável benefício do tratamento (quer em termos de redução do tumor ou sobrevivência). Tais fatores preditivos podem

ser utilizados para identificar subpopulações de doentes que têm maior probabilidade de se beneficiar de uma determinada terapia (RAGGI *et al.*, 2015).

#### 1.4. Cisplatina

A cisplatina (*cis*-diaminadichloroplatina II) é um dos mais eficazes agentes quimioterápicos para o tratamento do câncer, sendo constituída por um complexo de metal pesado, com dois átomos de cloro e duas moléculas de amônia na posição *cis* (Figura 1) (CHABNER, 2011). Em 1965, durante experimentos sobre os efeitos da eletricidade dipolar sobre o crescimento celular, Rosenberg e colaboradores, pela primeira vez, observaram que a divisão da *Escherichia coli* era inibida pela aproximação a eletrodos de platina (DECONTI, *et al.*, 1973). Após estudos adicionais, estes pesquisadores isolaram um grupamento de metal, definido como cisplatina. Os estudos com esta molécula progrediram para ensaios clínicos, sendo que a cisplatina foi rapidamente aprovada para a terapia do câncer (LEBWOHL, *et al.*, 1998).

Os estudos iniciais de fase I, na década de 70, inicialmente descartaram o uso da cisplatina, considerando os efeitos indesejáveis gastrintestinais e renais (LIPPMAN, *et al.*, 1973). A observação de respostas clínicas bastante satisfatórias no tratamento de neoplasias de testículo e, a diminuição da nefrotoxicidade após hidratação vigorosa, fez ressurgir o interesse por sua aplicabilidade clínica. Desta forma, atualmente, a cisplatina é utilizada no tratamento de vários tumores sólidos (ovário, cérvix, pulmão, cabeça e pescoço) (CHABNER, 2011). Entretanto, mesmo com medidas de hiper-hidratação e com o uso de diuréticos, a nefrotoxicidade causada pela cisplatina não pode ser

totalmente evitada e, a suspensão do uso pode ser a única opção caso haja progressão para insuficiência renal (DE VITA, 2015).

A cisplatina foi o primeiro composto do grupo das platinas aprovado para o tratamento oncológico, sendo que outros análogos foram desenvolvidos posteriormente (carboplatina e oxaliplatina), com propriedades próximas em efeito terapêutico e toxicidade próprias (CHABNER, 2011).

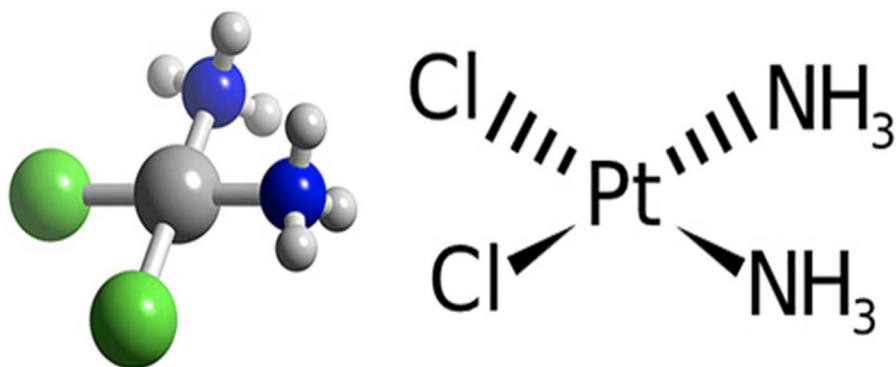


Figura 1. Estrutura química da cisplatina (adaptado de Chabner, *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* e, de <https://www.pymol.org/> acesso em outubro de 2016).

Nos últimos 30 anos foram alcançados vários avanços na compreensão dos mecanismos de ação da cisplatina (DILRUBA, *et al.*, 2016). Sua atividade citotóxica resulta, especialmente, de interações com o DNA (Figura 2). Adutos entre a platina e o DNA inibem processos celulares fundamentais, incluindo replicação, transcrição, tradução e reparo do DNA. Após penetrar na célula e sofrer modificações químicas, a cisplatina liga-se ao DNA genômico e/ou mitocondrial (MARTIN *et al.*, 2008). Alterações conformacionais ocasionadas

pela ligação ao DNA genômico afetam os processos de replicação e transcrição e, provocam mudanças da fita de DNA, que dificultam a ação das enzimas de reparo e o remodelamento da cromatina (DILRUBA *et al.*, 2016). A impossibilidade de reparo da fita de DNA pode levar a célula tumoral à apoptose. Por outro lado, a ligação da cisplatina com o DNA mitocondrial leva à diminuição de ATP e, conseqüentemente, à diminuição da atividade de ATPase e alteração do conteúdo de cálcio. A diminuição da respiração celular pode produzir espécies reativas de oxigênio, resultando em peroxidação lipídica das células (GALLUZZI *et al.*, 2012).

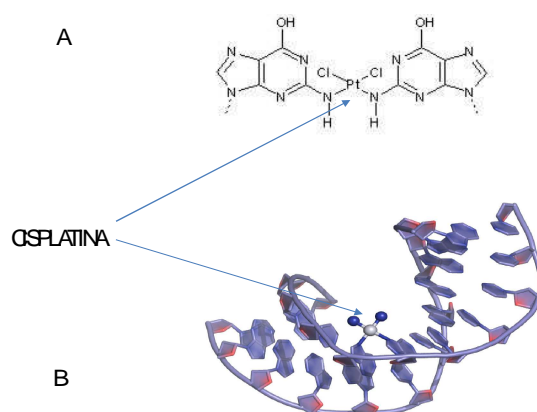


Figura 2. Ligação da Cisplatina ao DNA (A); Visão em 3D (B). (Adaptado de <https://www.pymol.org/> acesso em outubro de 2016).

O câncer de testículo representa um dos mais impressionantes grupos de sucesso terapêutico da cisplatina, mesmo com o advento de inúmeros novos fármacos no mercado quimioterápico, permanecendo o esquema de tratamento com potencial curativo, ainda que metastático, em mais de 90% dos casos, sem



qualquer modificação há mais de 30 anos. A cisplatina é extremamente eficaz contra as neoplasias germinativas, que têm uma capacidade particularmente baixa para reparar danos no DNA induzidos por platinas (RABIK *et al.*, 2007). Entretanto, um grupo de pacientes pode apresentar uma evolução bastante desfavorável e com insensibilidade à cisplatina. As razões pelas quais esses pacientes evoluem de forma desfavorável ainda são desconhecidas e necessitam melhor avaliação (RABIK *et al.*, 2007). A possibilidade de identificar quais são os pacientes platino-resistentes poderia permitir uma melhor seleção e individualização do tratamento no momento da decisão terapêutica, evitando assim a exposição à toxicidade desnecessária.

Efeitos tóxicos da quimioterapia no câncer de testículo são considerados importantes e, em função da grande sobrevida da maioria dos pacientes, representam algumas vezes sequelas permanentes da terapêutica (GIL *et al.*, 2016). Os efeitos adversos mais frequentes correspondem a nefrotoxicidade, náusea, vômitos, neuropatia central e periférica e, mielossupressão (DEVITA, 2015).

Na medida que taxas de curabilidade são alcançadas a preocupação direciona-se às toxicidades a longo prazo dos tratamentos (STRUMBERG *et al.*, 2002). Os eventos adversos da cisplatina ocorrem, em algum grau, em aproximadamente 100% dos pacientes que recebem sua infusão (SPRAUTEN *et al.*, 2012). A tabela 3 apresenta os efeitos colaterais mais comuns.

### **Tabela 3 - Eventos adversos relacionados a cisplatina.**

<b>EVENTOS ADVERSOS</b>	<b>INCIDÊNCIA</b>
<b>Sistema Nervoso</b>	
Neurotoxicidade	10 - 30%
<b>Gastrointestinal</b>	
Náusea / Vômitos	76 - 100%
<b>Hematológico</b>	
Anemia	10 - 40%
Leucopenia	25 - 30%
Trombocitopenia	25 - 30%
<b>Genitourinário</b>	
Nefrotoxicidade	28 - 36%
<b>Hepático</b>	
	> 10%
<b>Otológico</b>	
Ototoxicidade	40 - 60%
Alopécia	-
<b>Hidroeletrolítico</b>	
Hipomagnesemia	*
Hipopotassemia	
Hipofosfatemia	
Hipocalcemia	
Hiperurecemia	
<b>Cardíaco</b>	
Arritmia	*
Insuficiência cardíaca	

\* < 1%; (adaptado de <www.uptodate.com>, acessado em novembro de 2016).

Quando marcadores moleculares relacionados à suscetibilidade e resistência ao quimioterápico são conhecidos, uma melhor seleção de pacientes para o tratamento adequado é possível. Estudos de biologia molecular detectando vias de resistência podem representar um avanço importante no tratamento e evolução de casos de neoplasias de testículo.

### **1.5 - Resistência a Quimioterapia**

A resistência às quimioterapias baseadas em platinas, seja cisplatina, carboplatina ou oxaliplatina, pode ser definida como intrínseca ou adquirida, mediada por diversos fatores, sendo relacionada ou não às células tumorais (VASEY, 2003). Dois tópicos são de especial importância no que diz respeito à resistência: 1) o papel dos transportadores, envolvidos na seletividade de platinas sobre tumores específicos e; 2) a inativação das vias de reparo de DNA, em especial aquelas relacionadas aos genes *BRCA* (RABIK *et al.*, 2007).

Dentre os mecanismos clássicos de resistência à cisplatina, destaca-se: a redução da captação do medicamento, a extrusão da droga para o exterior da célula, ou ambos (STEWART, 2007). Recentemente, foi demonstrado que transportadores envolvidos na homeostase e manutenção dos níveis de cobre celular também estão envolvidos no transporte das platinas (BASU *et al.*, 2016). O Ctr1, um regulador do influxo de cobre, parece estar diretamente relacionado ao transporte de cisplatina e seus análogos, carboplatina e oxaliplatina. Evidências sugerem que os dois transportadores de efluxo de cobre, ATP7A e ATP7B, também regulam o efluxo de cisplatina (MACUS *et al.*, 2007).

Há cinco vias de reparo do DNA reconhecidas para a proteção contra danos: (i) reparo por excisão de nucleotídeos, (ii) reparo do emparelhamento errôneo (*mismatch*) (MMR), (iii) reparo de quebras em posições simétricas nas cadeias do DNA (*double-strand break repair*), (iv) reparo por excisão de base e, (v) reparo direto do DNA. Estudos prévios têm relacionado os dois primeiros sistemas com as vias de resistência às platinas no tratamento oncológico (KANG *et al.*, 2009). Diferentes mecanismos são sugeridos para entendermos a resistência cisplatina, conforme Tabela 4.

**Tabela 4 - Mecanismos de resistência cisplatina** (adaptado de STEWART, 2007).

<b>Mecanismo</b>	<b>Fator Relacionado</b>
Alteração do fluxo / chegada da droga	↑ pressão tecidual ↓ pressão vascular
Redução da absorção da droga	rigidez da membrana celular ↑ esfingomielina ↓ transportadores Cooper CTR1 ↓ de CaCl <sub>2</sub> ↑ de pH extracelular
Aumento do efluxo	↑ transportadores Cu ATP7A,-7B ↑ de pH intracelular
Aumento da detoxificação	↑ gama-glutamyltransferase ↑ glicoproteína p ↑ superóxido dismutase
Aumento da ligação de drogas	↑ bombas de prótons ↑ histonas de metilação
Aumento do reparo do DNA	↑ ERCC1 ↑ XPF ↑ BRCA1 ↑ Topoisomerase II
Diminuição de fatores pró apoptóticos	↓ p53, Bax, Fas, caspases 8,9
Aumento de inibidores de apoptose	↑ survivina ↑ Bcl-2 ↑ Cox-2
Aumento de chaperonas	↑ HSP27, HSP90, HSP70
Fatores de transcrição - relacionados ao ciclo celular	↑ NF-κB ↓ atividade de telomerasas ↑ transglutaminase (TG2 )

A proteína *excision repair cross-complementation group 1* (ERCC1) atua como um componente importante da via de reparo de excisão de nucleotídeos (Figura 3). Estudos em tumores de pulmão, ovário, esôfago, estômago, cabeça-pescoço e gliomas têm demonstrado que a expressão de ERCC1 apresenta

correlação com resposta terapêutica e a sobrevida dos pacientes (POLAT *et al.*, 2015; MENDONZA *et al.*, 2015).

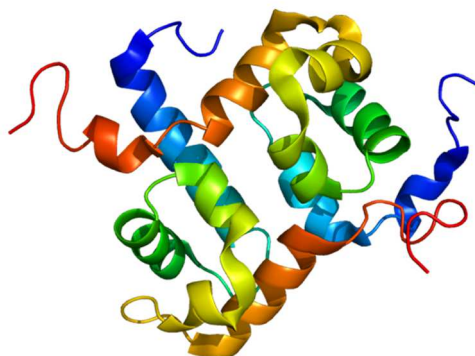


Figura 3 - *Excision repair cross-complementation group 1* (ERCC1) (adaptado de <https://www.pymol.org>).

Estudos demonstraram que a transglutaminase 2 (TG2), uma *trans* peptidase encontrada em vários tecidos, envolvida na regulação da matriz tecidual, proliferação celular, mobilização tecidual, está relacionada com a resistência à quimioterapia, especialmente por platinas (CAO *et al.*, 2008). TG2 está super expressa em diversas neoplasias como mama, ovários, pâncreas, cólon e fortemente relacionada a quimo resistência (HUANG *et al.*, 2015).

A enzima tem sido associada à apoptose, agindo como um promotor ou como um antagonista, por meio de mecanismos que são específicos para diferentes contextos celulares (Figura 5). Em condições fisiológicas, a atividade enzimática intracelular da TG2 2 é regulada negativamente por baixas concentrações de cálcio e nível elevado de trifosfato de guanossina. No entanto, nas últimas fases da apoptose, quando há um maciço influxo intracelular do íon

cálcio, a função enzimática da TG2 é ativada levando a desintegração de proteínas citosólicas e conseqüentemente ao processo de morte celular (CHHABRA, *et al.*, 2009). Uma das causas importantes de resistência à cisplatina refere-se a um funcionamento anormal do mecanismo de apoptose em células tumorais.

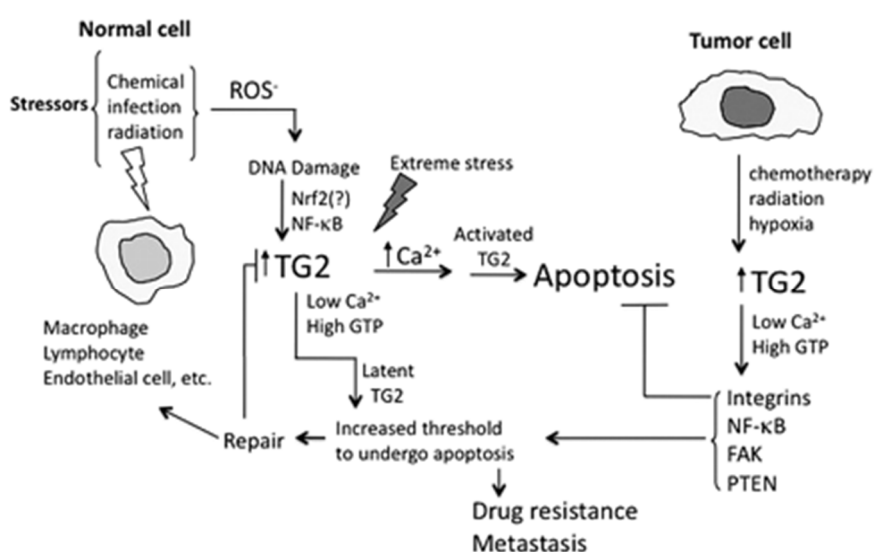


Figura 4 - Mecanismos da Transglutaminase 2 (adaptado de CHHABRA, *et al.*, 2009).

Outra via aparentemente relacionada com a resistência às platinas parece envolver o fator nuclear *kappa* B (NF-κB), fator de transcrição correlacionado na resposta celular a vários estímulos extracelulares de citocinas e estresse celular (Figura 5) (SETHI *et al.*, 2008; LIN *et al.*, 2010). Em células de câncer o NF-κB está ativado e expresso, promovendo invasão tecidual, aumento da sobrevivência celular e o processo metastático. Está correlacionado com pior prognóstico em diversas neoplasias usualmente sensíveis à cisplatina como câncer de cabeça e

pescoço, esôfago, bexiga, ovário e pulmão, sendo seu mecanismo complexo (ZHIPENG *et al*, 2015).

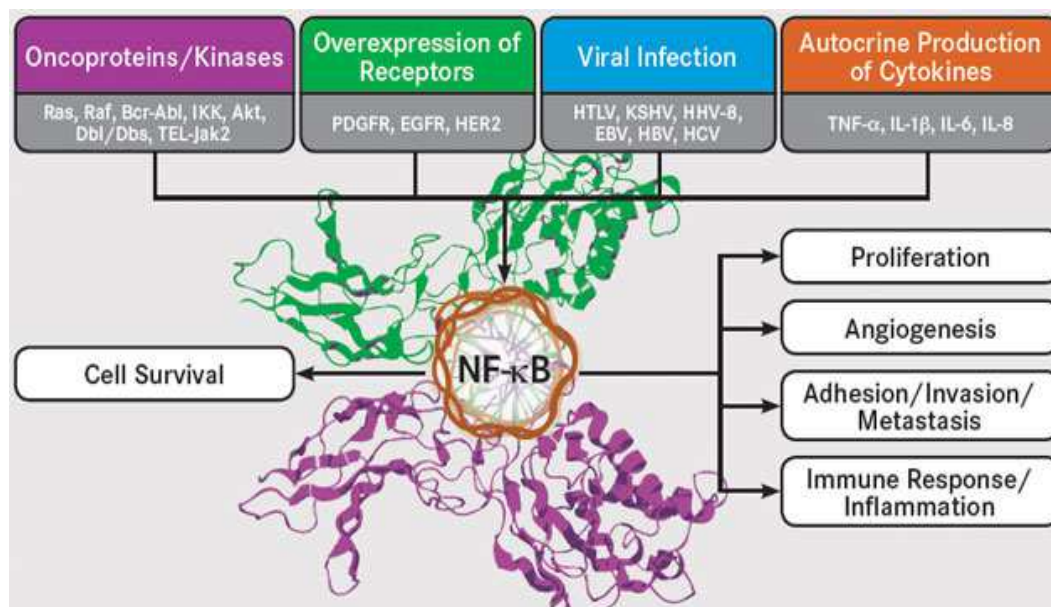


Figura 5 - Mecanismo da atividade do fator nuclear *kappa* B (NF-κB) (adaptado de SETHI *et al.*, 2008).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 - Objetivo Geral

Avaliar a expressão de NF- $\kappa$ B, ERCC1 e Transglutaminase 2 como fatores preditivos de recidiva em pacientes com câncer de testículo submetidos à quimioterapia no Hospital São Lucas da PUCRS.

## **2.2 - Objetivos Secundários**

- a. Realizar revisão sistemática da literatura quanto a novos marcadores de resistência às platinas;
- b. Avaliar a expressão de NF- $\kappa$ B, ERCC1 e TG2 através de imunohistoquímica, em biopsias de tumores de testículo;
- c. Correlacionar os dados de expressão de NF- $\kappa$ B, ERCC1 e TG2 com o prognóstico e a recidiva de pacientes com tumor de testículo, tratados com quimioterapia.



## CAPITULO IV

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um dos grandes avanços da medicina moderna é a possibilidade de tratamento curativo no câncer de testículo metastático. Os principais registros com respostas completas em pacientes, aparecem no final dos anos de 1970, acompanhados de eventos adversos importantes como ototoxicidade, mielossupressão, neurotoxicidade sensitiva, motora e íleo intestinal (EINHORN, 2002). A estratificação de risco dos pacientes, nos anos 80, permitiu a definição de protocolos com adequada seleção para cada caso. Em todos esquemas a inclusão de platina está presente, com variações que incluem protocolos como BEP, EP e VIP (vimblastina, ifofosfamida e cisplatina) (CHABNER *et al.*, 2011). Não há consenso sobre a inclusão de bleomicina, a escola Americana de Oncologia fundamentalmente seguindo as recomendações da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) recomenda na maioria dos casos, independentemente da estratificação de risco (DEVITA, 2015).

A tentativa de reduzir toxicidade relacionada a cisplatina exigiu avaliação e o estudo fase II que avaliava a substituição pela carboplatina evidenciou respostas inferiores a cisplatina (BAJPRIN, *et al.*, 1993). Da mesma forma diversas fármacos buscaram reduzir toxicidade quando usados concomitantemente, sem impactar a resposta antineoplásica, mas nada é recomendado com evidência clínica segura. Estudo prévio, avaliou o papel de frutose-1,6-bifosfato na nefrotoxicidade induzida pela cisplatina, em animais, demonstrando um potencial significativo nefroprotetor da frutose-1,6-bifosfato (AZAMBUJA, *et al.*, 2008). Enfim, tem sido intensa a busca de fatores de redução de toxicidade, induzida por quimioterápicos e provavelmente selecionar quem

são os pacientes que realmente necessitam passar pelo risco de eventos adversos deve ser ponto crítico na indicação de um tratamento.

De fato, os esquemas quimioterápicos contendo platina, BEP e EP, são considerados a primeira linha de escolha no tratamento do câncer de testículo, seja no caráter curativo ou paliativo. Portanto, este estudo foi desenvolvido a fim de avaliar a expressão de marcadores moleculares como fatores preditivos de recidiva em pacientes com câncer de testículo submetidos à quimioterapia com cisplatina.

No presente estudo a tentativa de realizarmos RT-PCR foi considerada inicialmente, mas a metodologia de fixação dos blocos de parafina, no Laboratório de Patologia do HSL, não permitiu a correta extração do material de RNA. Havendo dados seguros de análises publicados com metodologia de imunodeteção optamos por tal razão utilizar essa forma de análise.

O valor preditivo e prognóstico da expressão ERCC1 foi estudado em alguns tumores sólidos, como câncer de ovário, cabeça e pescoço e, fortemente no câncer de pulmão (FRIBOULET, *et al.*, 2013; OLAUSSEN, *et al.*, 2006). Nas publicações prévias as análises são definidas e discutidas, diferentemente, ora por busca da imunodeteção de antígenos da proteína ERCC1 por metodologia de imuno histoquímica, ora por análise de RNA por RT-PCR (FRIBOULET, *et al.*, 2013; OLAUSSEN, *et al.*, 2007)

No presente estudo, a presença de ERCC1 está associada com maior risco de recorrência de câncer de testículo (conforme dados do Artigo Original, submetido para publicação). ERCC1 parece conferir um prognóstico significativamente pior em pacientes com TCGT tratados com quimioterapia baseada em platina. Quando a análise multivariada foi realizada, nenhum dos

fatores de confusão para o resultado, foi capaz de alterar este resultado. Estes resultados corroboram com os dados de Mendonza e colaboradores que sugere ser o ERCC1 preditivo de sensibilidade a platina (MENDOZA *et al*, 2015). A ERCC1 é uma proteína de reparo por excisão de nucleosídeo, que remove adutos-DNA de platina e repara quebras de cadeias do DNA. Os mecanismos pelos quais contribui para uma maior resistência à ação da cisplatina provavelmente envolve mecanismos ainda não conhecidos, refletindo possivelmente uma característica inerente a biologia tumoral (STEWART, 2007).

Em termos de aplicação clínica, nossos resultados sugerem que a avaliação da expressão de ERCC1 pode contribuir como um preditor mais preciso de seleção de pacientes que apresentam maior risco de recorrência, após o tratamento padrão com cisplatina, ou considera-los eventualmente a outro tratamento. Ainda, considerar os riscos de toxicidades possíveis poderá influenciar na escolha de cisplatina para pacientes ERCC1 positivos. Uma análise mais aprofundada em uma coorte maior de pacientes irá confirmar estes resultados. A expressão de ERCC1 parece conferir um prognóstico significativamente pior em pacientes com TGCT tratados com quimioterapia baseada em platina.

No presente estudo não foi possível correlacionar a expressão de NF- $\kappa$ B e TG2 com o risco de recorrência em nossos pacientes tratados com cisplatina. Algumas explicações possíveis para este fato serão postuladas, o nível de complexidade biológica pode ter sido subestimado, o número de pacientes analisados não foi suficiente para analisar tal detecção, os ensaios utilizados para avaliar NF- $\kappa$ B e TG2 podem necessitar adequações ou outras metodologias deveriam ser realizadas. Embora não tenha sido observada associação

estatisticamente significativa de NF- $\kappa$ B e TG2 com a recorrência de TCGT de testículo (conforme dados do Artigo Original, submetido para publicação), no presente estudo, consideramos que estes fatores envolvidos na regulação da sobrevivência celular, devem ser considerados como potenciais agentes envolvidos na resistência à quimioterapia com cisplatina, visto a tendência já previamente definida em outras publicações de aumento do risco de recorrência especialmente em outros tumores (FRIBOULET *et al.*, 2013; OLAUSSEN *et al.*, 2007; KOGA, *et al.*, 2011; POLAT *et al.*, 2015).

Em conclusão, o câncer de testículo trata-se de uma neoplasia muito comum, com uma elevada taxa de cura, mas que quando ocorre recorrência um cenário dramático instala-se, especialmente por considerarmos a idade dos pacientes. Atualmente não existe superioridade de qualquer outro regime de quimioterapia, que não inclua cisplatina, no entanto, uma vez que os pacientes não-sensíveis poderão ser identificados, considera-los para protocolos sem cisplatina poderá ser um fato promissor.

Nosso estudo é o primeiro a avaliar, em pacientes com TCGT de testículo, a expressão de ERCC1, NF- $\kappa$ B e TG2 . Inédito por demonstrar nestes pacientes o aumento do risco de recorrência quando há aumento na expressão de ERCC1 e NF- $\kappa$ B. Cabe salientar que nossos resultados devem ser confirmados em estudo prospectivo, utilizando-se simultaneamente diferentes técnicas de análise, a fim de identificar pacientes que são potencialmente não-sensíveis à quimioterapia cisplatina.

## CAPITULO VI

### REFERÊNCIAS

### REFERÊNCIAS

AZAMBUJA AA, LUNARDELLI A, NUNES FB, *et al.* Effect of fructose-1,6-bisphosphate on the nephrotoxicity induced by cisplatin in rats. *Inflammation*. 2011;34(1):67-71.

BAJPRIN DF, SAROSDY MF, PFISTER DG, *et al.* Randomized trial of etoposide and cisplatin versus etoposide and carboplatin in patients with good-risk germ cell tumors: a multistitutional study. *J Clin Oncol* 1993; 11:598-606.

BASU U, BANIK B, WEN R, *et al.* The Platin-X series: activation, targeting, and delivery. *Dalton Trans* 2016 16;45(33):12992-3004.

CAO L, PETRUSCA DN, SATPATHY M, *et al.* Tissue transglutaminase protects epithelial ovarian cancer cells from cisplatin-induced apoptosis by promoting cell survival signaling. *Carcinogenesis* 2008;29(10):1893-900.

CHABNER BA, LONGO DL. *Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice* (Chabner, *Cancer Chemotherapy and Biotherapy*). Fifth Edition, 2011.

CHHABRA A, VERMA A, MEHTA K. Tissue Transglutaminase Promotes or Suppresses Tumors Depending on Cell Context. *Anticancer Research* 2009;29:1909-20.

DECONTI RC, TOFTNESS BR, LANGE RC, *et al.* Clinical and Pharmacological Studies with *cis*-Diamminodichloroplatinum(II). *Cancer Res* 1973;33:1310-15.

DEVITA Cancer: principles and practice of oncology [CD-ROM]. 10<sup>th</sup> ed. Walters Kluxers Health, 2015.

DILRUBA S, KALAYDA GV. Platinum-based drugs: past, present and future. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016;77(6):1103-24.

EINHORN LH. Curing metastatic testicular cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(7):4592-5.

FELDMAN DR, BOLS GJ, SEINFELD J, *et al.* Medical Treatment of Advanced Testicular Cancer. Jama 2008;299(6):672-84.

FRIBOULET L, OULASSEN KA, PIGNON JP, *et al.* ERCC1 isoform expression and DNA repair in non-small-cell lung cancer. N Engl J Med 2013;368:1101-10.

GIL T, SIDERIS S, AOUN F, *et al.* Testicular germ cell tumor: Short and long-term side effects of treatment among survivors. Mol Clin Oncol. 2016;5(3):258-264.

HUANG L, A-MAN XU, LIU W. Transglutaminase 2 in cancer. Am J Cancer Res 2015;5(9):2756-76.

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 1997;15(2):594-603.

JUN HJ, AHN MJ, KIM HS, *et al.* ERCC1 expression as a predictive marker of squamous cell carcinoma of the head and neck treated with cisplatin-based concurrent chemoradiation. Br J Cancer. 2008 8;99(1):167-72.

KANG CH, JANG BG, KIM DW, *et al.* Differences in the expression profiles of excision repair crosscomplementation group 1, x-ray repair crosscomplementation group 1, and beta III-tubulin between primary non-small cell lung cancer and metastatic lymph nodes and the significance in mid-term survival. J Thorac Oncol. 2009;4(11):1307-12.

KOGA F, YOSHIDA S, TATOKORO M, *et al.* ErbB2 and NF- $\kappa$ B overexpression as predictors of chemoradiation resistance and putative targets to overcome resistance in muscle-invasive bladder cancer. Plos One 2011; 6(11):e27616.



L GALLUZZI, L SENOVILLA, I VITALE, *et al.* Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* 2012; 31:1869-83.

LEBWOHL D, CANETTA R. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *Eur J Cancer* 1998;34:1522–34.

LEBWOHL D, CANETTA R. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *Eur J Cancer*. 1998 Sep;34(10):1522-34.

LI Z, YANG Z, LAPIDUS RG, *et al.* IKK phosphorylation of NF- $\kappa$ B at serine 536 contributes to acquired cisplatin resistance in head and neck squamous cell cancer. *Am J Cancer Res* 2015;5(10):3098-3110.

LIN Y, BAI L, CHEN W, *et al.* The NFkappaB activation pathways, emerging molecular targets for cancer prevention and therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2010;14:45-55.

LIPPMAN AJ, HELSON C, HELSON L, *et al.* Clinical trials of cis-diamminedichloroplatinum (NSC-119875). *Cancer Chemother Rep* 1973;57(2):191-200.

MACUS T, HELEN HW, CHEN, *et al.* The roles of copper transporters in cisplatin resistance platinum-based antitumor agents. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:71–83.

MARTEE L. HENSLEY EDITOR. ASCO-SEP. Alexandria VA, 2016.

MARTIN LP, HAMILTON TC, SCHILDER RJ. Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. *Clin Cancer Res* 2008;14(5):1291-5.

MENDONZA J, MARTÍNEZ J, HERNÁNDEZ C, *et al.* Association between ERCC1 and XPA expression and polymorphism and the response to cisplatin in testicular germ cell tumours. *Br J Cancer* 2013;109:68-75.

National Comprehensive Cancer Network Testicular cancer (version 2.2016)

<<http://www.nccn.org/professionals/>> acessado em novembro de 2016.

NIEDERHUBER JE, ARMITAGE JO, DOROSHOW JH, *et al.* Abeloff Clinical Oncology. Editors. 5th edition. 2013.

OLAUSSEN KA, FOURET P, KROEMER G. ERCC1 specific immunostaining in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2007;357:1559-61.

OLAUSSEN KA, DUNANT A, FOURET P, *et al.* DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin based adjuvant chemotherapy *N Engl J Med* 2006;355:983-91.

PARK MJ, BAEK HW, RHEE YY, *et al.* Transglutaminase 2 expression and its prognostic significance in clear cell renal cancer. *J Pathol Transl Med* 2015;49:37-43.

PEREZ RP. Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. *Eur J Cancer* 1998;34:1535-42.

POLAT G, YILMAZ U, ANAR C, *et al.* Is there relationship between excision repair cross-complementation 1 expression level and response to treatment and prognosis in an advanced stage lung cancer treated with cisplatin-based chemotherapy? *Indian J Cancer* 2015; 52(3):277-280.

RABIK CA, DOLAN ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev* 2007;33:9-23.

RAGGI D, MARIANI L, GIANNATEMPO P, *et al.*: Prognostic reclassification of patients with intermediate-risk metastatic germ cell tumors: Implications for clinical practice, trial design, and molecular interrogation. *Urol Oncol* 2015;33:332.e19-24.

ROBBINS & COTRAN. Pathologic Basis of Disease (Robbins Pathology) 9th Edition. Elsevier, 2014.

SETHI G, SUNG B, AGGARWAL BB. Nuclear factor- $\kappa$ B activation: from bench to bedside. *Exp Biol Med*. 2008;233(1): 21-31.

SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*. 2015 Jan-Feb;65(1):5-29.

SPRAUTEN M, DARRAH TH, PETERSON DR, *et al*. Impact of Long-Term Serum Platinum Concentrations on Neuro- and Ototoxicity in Cisplatin-Treated Survivors of Testicular Cancer. *J Clin Oncol* 2012; 30(3): 300–7.

STEWART D. Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007;63(1):12-31.

STRUMBERG D, BRÜGGE S, KORN MW, *et al*. Evaluation of long-term toxicity in patients after cisplatin-based chemotherapy for non-seminomatous testicular cancer. *Ann Oncol* 2002; 13:229.

Uptodate. Testicular Germ Cell Cancer. <[www.utodate.com](http://www.utodate.com)> acessado em outubro de 2016.

VASEY PA. Resistance to chemotherapy in advanced ovarian cancer: mechanisms and current strategies. *Br J Cancer* 2003;89 Suppl 3:S23–8.

WILLIAMSON SR, DELAHUNT B, MAGI-GALLUZZI C, *et al*. The WHO 2016 Classification of Testicular Germ Cell Tumours: a Review and Update from the ISUP Testis Consultation Panel. *Histopathology*. 2016.

ZHIPENG LI, YANG Z, LAPIDUS R, *et al*. IKK phosphorylation of NF- $\kappa$ B at serine 536 contributes to acquired cisplatin resistance in head and neck squamous cell cancer. *Am J Cancer Res* 2015;5(10):3098-3110.