

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**EFFECTOS GENOTÓXICOS SECUNDARIOS AL TRATAMIENTO ANTINEOPLÁSICO EN  
LINFOCITOS DE SOBREVIVIENTES CON ENFERMEDAD DE HODGKIN.**

**Consuelo Salas Labadía**

2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	2
<b>1. INTRUDUCCION</b> .....	6
1.1 Enfermedad de Hodgkin .....	6
1.2 Citogenética de la enfermedad de Hodgkin .....	10
1.3 Factores pronósticos .....	10
1.4 Tratamiento .....	11
1.4.1. Radioterapia.....	11
1.4.2. Agentes quimioterapéuticos.....	13
1.4.3. Quimioterapia.....	16
1.4.4. Modalidad combinada .....	17
1.4.5. Tratamiento en pacientes con EH en estadio temprano (I-II <sub>A</sub> ) -	17
1.4.6. Tratamiento en pacientes con EH en estadios avanzados	
desfavorables (II <sub>B</sub> -IV) .....	18
1.4.7. Recaídas .....	19
1.5 Consecuencias secundarias al tratamiento .....	21
1.6. Consecuencias genotóxicas del tratamiento antineoplásico	
en linfocitos de sangre periférica .....	23
<b>2. JUSTIFICACION</b> .....	25
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	26
3.1. Objetivo General .....	26
3.2. Objetivos Particulares .....	26
<b>4. HIPOTESIS</b> .....	27
<b>5. MATERIAL Y METODOS</b> .....	28
5.1. Población de estudio .....	28
5.2. Criterios de inclusión .....	29
5.2.1. Para Individuos Sanos .....	29
5.2.2. Para Pacientes EH sin tratamiento .....	29
5.2.3. Para Sobrevivientes EH .....	30
5.3. Criterios de exclusión .....	30
5.4. Citogenética en linfocitos .....	31
5.4.1. Cultivo celular .....	31
5.4.2. Láminas y BG .....	32
5.4.3. Análisis de cromosomas .....	32
5.4.4. Espermatobioscopías .....	32

<b>6. RESULTADOS</b>	34
6.1. Población de estudio	34
6.2. Frecuencia de aneuploidías	41
6.3. Clonas hipodiploides por cromosoma	44
6.4. Hiperdiploidías por cromosoma	48
6.5. Aberraciones cromosómicas estructurales (ACE)	50
<b>7. DISCUSION</b>	51
7.1. Población de estudio	51
7.2. Frecuencia de aneuploidías	51
7.3. Clonas hipodiploides	55
7.4. Aberraciones cromosómicas estructurales (ACE)	59
<b>8. CONCLUSIONES</b>	62
8.1. Comentarios finales	62
<b>Anexo 1</b>	63
<b>Anexo 2</b>	64
<b>9. REFERENCIAS</b>	70

## RESUMEN

**Antecedentes.** Actualmente el 80% de los pacientes con enfermedad de Hodgkin (EH) tienen una sobrevida de 10 años, debido a que los esquemas de quimioterapia son muy efectivos. Entre los esquemas más utilizados esta el MOPP (Mostaza Nitrogenada, Oncovin, Procarbazina, Prednisona), ABVD (Adriamicina, Bleomicina, Vinblastina, Dacarbazina) con o sin radioterapia. Estos agentes son mutágenos que provocan rupturas en el DNA y son inductores de alteraciones cromosómicas y mutaciones. La terapia que no es específica para las células tumorales, también alcanza a las células normales. Por lo anterior, los sobrevivientes a EH son una población de individuos expuestos a agentes mutagénicos que potencialmente pueden tener alteraciones genéticas en las células normales. En México no existen reportes de las consecuencias genotóxicas que puedan tener estos tratamientos en la población expuesta. **Objetivo:** Determinar si el tratamiento MOPP/ABVP con o sin radioterapia, genera a largo plazo alteraciones cromosómicas numéricas en linfocitos de sangre periférica de sobrevivientes a EH. **Metodología.** Población de estudio: Se estudiaron 5 individuos sanos, 10 sobrevivientes a EH tratados con quimioterapia MOPP/AVBP, de los cuales 5 tenían producción de espermatozoides y 5 fueron azoospermicos, y 5 individuos con EH sin tratamiento. Se realizaron cultivos de linfocitos de 48 h, se obtuvieron metafases y cromosomas con bandas GTG. Las laminillas fueron codificadas y se analizaron 1000 metafases por cada individuo.

El análisis cromosómico se realizó en 15 metafases y en cada célula que presentó aneuploidía para identificar la alteración. El cariotipo tanto de los sujetos sanos como de los pacientes fue normal, sin alteraciones constitucionales. **Resultados.** La frecuencia de aneuploidías fue 2.2% para los pacientes (10 pacientes con tratamiento y 5 sin tratamiento) y 2.5% para los sujetos normales. A pesar de que el estudio se diseñó para detectar alteraciones numéricas, al analizar las metafases se encontraron alteraciones estructurales en 9 de los 15 pacientes. **Discusión.** Estos datos indican que el tratamiento aunque contiene agentes aneugénicos, a largo plazo, no incrementa de manera significativa la frecuencia de aneuploidías; sin embargo, las alteraciones estructurales que se presentaron en 9 de los 15 pacientes, muestran que el daño cromosómico que pueden estar induciendo los esquemas quimioterapéuticos es del tipo estructural y no numérico.

## **ABSTRACT**

**Background.** Therapeutic regimens produce a 10-year disease-free survival in 80% of patients with Hodgkin`s disease (HD). HD patients are treated with a variety of chemotherapy regimens such as MOPP (Nitrogen mustard, Oncovin, Procarbazine, Prednisone), ABVD (Doxorubicin, Bleomycin, Vinblastine, Dacarbazine) with or without radiotherapy. Anticancer treatment includes agents known as mutagens and clastogens that attack not only cancer cells, but also normal ones. At present, survivors of HD have been treated with mutagenic agents that probably induce genetic alterations in somatic cells, so it has become increasingly important to evaluate the genotoxic effects of the anticancer agents in the exposed population. **Purpose.** The aim of this study was to determine the frequency of aneuploidies in lymphocytes from HD survivors after chemotherapy (MOPP/ABVP) with or without radiotherapy. **Methods and Materials.** Subjects: 5 healthy donors, 10 HD survivors who were treated by chemotherapy MOPP/ABVP; 5 with spermatozoa and 5 azoospermic and 5 untreated HD patients. Lymphocytes were cultured 48 h and harvested using colcemid; slides were coded and 1000 GTG banded metaphases were analyzed. Complete chromosome analysis was carried out on 15 metaphases and on every cell with aneuploidy in order to identify the numerical alteration.

Karyotypes from healthy donors and HD patients were normal, without constitutional abnormalities. **Results.** The frequency of aneuploidies was 2.2% in HD patients (10 treated with anticancer agents and 5 without treatment) and 2.5% in healthy donors. Structural abnormalities were found in lymphocytes from 9 patients, even when the methodology was not directed to find this type of damage. **Discussion.** Our results suggest that treatment with aneugenic agents does not have long term consequences regarding numerical alterations however, we found that 9 out of 15 patients had structural chromosomal aberrations, which was possibly the main effect of these kinds of compounds.

## 1. INTRODUCCION

### 1.1. Enfermedad de Hodgkin

La enfermedad de Hodgkin (EH) es una neoplasia maligna que afecta al sistema linfoide y representa aproximadamente del 30 al 40% de todos los linfomas malignos (1, 2, 3).

La EH tiene una incidencia de alrededor de 2.4 por cada 100,000 individuos por año con una presentación bimodal con respecto a la edad; en Estados Unidos y países industrializados, el primer pico ocurre antes de los 20 años y el segundo pico después de los 50 años de edad (4, 5, 6).

A nivel mundial, la EH constituye el tercer cáncer más común en edad pediátrica. En México, en el Instituto Nacional de Pediatría, ocupa el cuarto lugar dentro del grupo de las neoplasias malignas (3, 7).

A nivel celular, el linfoma de Hodgkin difiere de otros tumores malignos por la presencia de un tipo de células neoplásicas de 15-45  $\mu\text{m}$  de diámetro llamadas Reed-Sternberg (RS). Este tipo celular constituye una pequeña proporción (2%) de las células que se encuentran en el tejido afectado, lo que las hace difíciles de estudiar (1, 4).

La clasificación de esta enfermedad de acuerdo a su Histología es:

a) Linfoma de Hodgkin con predominancia nodular-linfocítica.

Representa el 5% de los casos con linfoma Hodgkin. A nivel celular tienen una variante de las células RS, llamadas células L&H (células linfocíticas y/o histiocíticas). El inmunofenotipo es una parte importante de la definición de esta entidad; expresan antígenos asociados a células B (CD20) y es negativo para CD30 y CD15 (6, 8).

b) Linfoma de Hodgkin clásico.

Definido por la presencia de las células RS diagnósticas, con un inmunofenotipo CD20-/+ , CD30+ y CD15+. Una característica importante de esta entidad, es la detección en alrededor del 40% de los casos, de proteínas nucleares y de membrana del virus Epstein-Barr (6, 8).

Este se subdivide a su vez en:

1) Esclerosis nodular

Afecta a adolescentes y adultos jóvenes y representa del 50 al 60% de los casos.

Tiene su aparición en ganglios cervicales bajos, supraclaviculares y mediastinales.

## 2) Celularidad mixta

Es común en niños menores de 10 años y constituye del 25 al 35% de los casos.

Generalmente se presenta en estructuras linfoides intra-abdominales y puede haber extensión extranodular.

## 3) Predominancia linfocítica

Representa del 10 al 12% de los casos y es frecuente en hombres jóvenes.

Una característica importante es la destrucción completa o parcial de la arquitectura de los nódulos linfáticos.

## 4) Disminución linfocítica

Rara vez se presenta en niños y representa del 2 al 5% de los casos.

Clínicamente se caracteriza por extenderse a huesos y médula ósea (3, 4, 6, 9).

El uso de diversos procedimientos sistemáticos para poder determinar el grado de extensión de la EH, llevó al desarrollo de la clasificación Ann Harbor, mediante la cual se asignan estadios de la enfermedad basados en el número de sitios con nódulos linfáticos afectados, presencia de enfermedad extranodular y ausencia (A) o historia de síntomas clínicos (B) como: (temperatura por encima de 38°C, sudor nocturno y pérdida de peso sin explicación aparente):

- Estadio I

Participación de una sola región de nódulo linfático o estructura linfoide (I) (bazo, timo, anillo de Waldeyers) o un sitio u órgano extranodular (I<sub>E</sub>).

- Estadio II

Participación de dos o más regiones de nódulos linfáticos del mismo lado del diafragma (II) o localizadas en un órgano o sitio extranodular del mismo lado del diafragma (II<sub>E</sub>).

- Estadio III

Participación de regiones de nódulos linfáticos a ambos lados del diafragma (III), que puede estar acompañado por el bazo (III<sub>S</sub>) o localizadas en sólo un sitio extranodular (III<sub>E</sub>) o con el bazo (III<sub>SE</sub>).

- Estadio IV

Extensión difusa o diseminada con la participación de uno o más órganos o tejidos extranodulares con o sin presencia de nódulos linfáticos afectados (3, 4, 5, 6, 9).

## 1.2. Citogenética de la Enfermedad de Hodgkin

Los cariotipos anormales que se presentan en este tipo de cáncer, son complejos con cambios en la ploidía, pudiéndose presentar células triploides y tetraploides. Se han descrito algunas anormalidades donde participan cromosomas o regiones cromosómicas específicas como trisomías para los cromosomas 3 y 7, deleciones de 1p, 6q, 7q, 21q, entre otras. A nivel molecular, se han encontrado la t(14;18)(q32;q21) y la t(2;5)(p23;q35) (10).

## 1.3. Factores pronósticos

La presencia de diversos factores como la edad del paciente, la madurez física, histología, estadio de la enfermedad y tamaño de la masa tumoral, presencia o ausencia de síntomas sistémicos y respuesta a la terapia pueden influir de manera directa en el establecimiento de una terapia óptima para el tratamiento de la EH. Todas estas características permiten clasificar al individuo, indicando si está en una fase de la enfermedad favorable o desfavorable, lo que lleva a tomar una mejor decisión para poder iniciar la terapia, asegurando mejores oportunidades de supervivencia a largo plazo, en equilibrio con un bajo riesgo de toxicidad causada por los agentes terapéuticos (1, 3, 4, 6, 11).

Actualmente, los métodos terapéuticos utilizados para el tratamiento de la EH, pueden producir una sobrevida libre de enfermedad en un 85 a un 100% de los pacientes en estadio temprano o patología localizada definida por la clasificación Ann Harbor I<sub>A</sub> o II<sub>A</sub> y de un 70 a un 90% en individuos en estadio avanzado (Ann Harbor III o IV) (12, 13, 14).

#### 1.4. Tratamiento

Las modalidades de tratamiento utilizadas para EH se pueden dividir en tres categorías: radiación, quimioterapia y modalidad combinada (radioterapia + quimioterapia).

##### 1.4.1. Radioterapia

Inicialmente, la radioterapia fue el tratamiento más utilizado para el control de la EH. Sin embargo, se empezó a observar que solo era conveniente su utilización para pacientes en estadios tempranos de la enfermedad. Posteriormente, la radiación se combinó con fármacos quimioterapéuticos, especialmente en pacientes en estadios tardíos de la enfermedad y con pronóstico desfavorable (15).

- Dosis: Cuando la radioterapia es la única modalidad de tratamiento, se requieren dosis de aproximadamente 35 a 44 Gy. En combinación con quimioterapia, se necesitan dosis más bajas de radiación: 30 Gy (5, 12, 15).
  
- Campos de irradiación:
  - a) Manto: Para pacientes con EH supra-diafragmática.
  - b) Manto y para-aórtico ± manto esplénico: Conocida también como irradiación linfoide, de manto o para-aórtica (MPA) o nodal sub-total. Para el tratamiento de nódulos linfáticos para-aórticos en adición al campo de manto. El bazo se incluye en pacientes sin previa cirugía y/o esplenectomía.
  - c) Irradiación total nodal o linfoide total: Incluye la mayor parte del tejido linfoide, además del campo pélvico, de manto y para-aórtico.
  - d) Y invertida: En pacientes con EH infra-diafragmática, incluyendo nódulos linfáticos para-aórticos y pélvicos (15).

Es importante mencionar que durante la radioterapia, a los pacientes se les protegen las gónadas con placas de plomo.

#### 1.4.2. Agentes quimioterapéuticos

MOPP (Mostaza Nitrogenada, Oncovin, Procarbazina y Prednisona )

##### a) Mostaza Nitrogenada:

Pertenece al grupo de agentes alquilantes; es un fármaco que provoca daño al DNA e inhibe la replicación del mismo. Este agente puede producir atrofia gonadal, afectando de manera permanente la función reproductiva; se ha observado también un fuerte efecto carcinogénico, mutagénico y teratogénico en células somáticas y germinales (16, 17). Fue el primer agente alquilante utilizado para el tratamiento de cáncer. Su uso continuó en combinación con otros fármacos como vincristina y procarbazina para el tratamiento de EH (18, 19).

##### b) Vincristina (Oncovin):

Alcaloide que se une a la proteína dimérica tubulina, interfiriendo con la polimerización de los microtúbulos o alterando su estructura, lo que provoca un bloqueo en la formación del huso mitótico, por lo que puede generar alteraciones cromosómicas numéricas (18, 20).

c) Procarbazina:

Agente alquilante que inhibe la síntesis de proteínas, DNA y RNA y causa daño cromosómico. Este fármaco es un potente carcinógeno que puede provocar leucemia; a largo plazo, se ha observado también azoospermia y efectos teratogénicos en los individuos tratados con este agente (18, 21). Se considera uno de los tres agentes químicos capaces de causar daño genotóxico a células madre germinales (17, 22, 23).

d) Prednisona:

Aunque no se considera como un fármaco anticancerígeno, tiene un papel importante en el tratamiento de leucemias agudas y EH. Es un corticoesteroide análogo del cortisol, con función anti-inflamatoria e inmuno-moduladora para el cual no se han reportado efectos mutagénicos y/o carcinogénicos (18, 24).

ABVD (Adriamicina, Bleomicina, Vinblastina y Dacarbazina)

a) Adriamicina (Doxorubicina):

Antraciclina ampliamente utilizada como antibiótico anti-tumoral. Este tipo de agente se intercala en el DNA y produce rupturas de cadena sencilla y doble. Se relaciona también

con la formación de radicales libres, responsables de la actividad antitumoral así como de ciertos efectos secundarios como problemas cardiacos y efectos mutagénicos (18, 25).

b) Bleomicina:

Radiomimético que después de unirse al DNA produce rupturas en el mismo, como resultado de la producción de un complejo de radicales libres. Entre las complicaciones que se presentan por el uso de este fármaco están: fibrosis pulmonar que es la más importante; se ha observado que la interacción de este con la vincristina, puede incrementar el riesgo de toxicidad pulmonar (18, 26).

c) Vinblastina:

Al igual que la vincristina, es un alcaloide inhibidor del ensamblaje del huso mitótico, por lo que se puede considerar también como un aneugénico (18, 27).

d) Dacarbazina:

Agente alquilante desarrollado como un inhibidor de la biosíntesis de purinas. A pesar de que se observan efectos tóxicos secundarios graves a nivel de hígado, riñón y sistema nervioso central, aún tiene que ser considerado su potencial teratogénico y carcinogénico (18, 28).

### 1.4.3. Quimioterapia

El desarrollo del régimen MOPP (Mostaza Nitrogenada, Oncovin, Procarbazina, Prednisona) fue la primera terapia sistémica efectiva para el tratamiento de la EH. Esta combinación a altas dosis dadas en 6 a 8 ciclos, produce una supervivencia de 4 a 11 años en 80% de los pacientes. Para pacientes pediátricos, es importante tomar en cuenta los efectos secundarios de este tipo de tratamiento, los cuales pueden reducirse sustituyendo el uso de agentes alquilantes como la mostaza nitrogenada por fármacos como la ciclofosfamida presente en el esquema COPP (Ciclofosfamida, Oncovin, Procarbazina, Prednisona) (4, 5, 29).

La aparición de tratamientos basados en el uso de antraciclinas como ABVD (Adriamicina, Bleomicina, Vinblastina, Dacarbazina) (2 a 6 ciclos) y OPPA (Oncovin, Procarbazina, Prednisona, Adriamicina), redujo de manera importante los efectos tóxicos secundarios producidos por el uso de MOPP (1, 4, 6, 11, 13, 29). Sin embargo, debido a las secuelas cardiopulmonares que se atribuyen a la adriamicina y bleomicina, su uso se limitó a pacientes con presentaciones clínicas favorables y con tratamientos que tuvieran menos ciclos de quimioterapia o se pudieran alternar con otras mezclas con agentes alquilantes como MOPP, COPP o ChIVPP (Clorambucil, Oncovin, Procarbazina, Prednisona) y en pacientes con EH en estadios avanzados y pronóstico desfavorable (12, 13).

#### 1.4.4. Modalidad combinada

El prototipo de quimioterapia combinada es MOPP/ABVD. Esta terapia u otros agentes quimioterapéuticos junto con radioterapia, son muy efectivos en pacientes pediátricos, ya que permiten reducir el campo de irradiación y la dosis, así como utilizar menos ciclos de quimioterapia (menos de 6 ciclos) y se ha observado que con esto disminuye de manera favorable la aparición de secuelas de la terapia (4, 5, 6,13).

#### 1.4.5. Tratamiento en pacientes con EH en estadio temprano (I-II<sub>A</sub>)

Con el tratamiento con radioterapia MPA se puede obtener un control de la enfermedad del 80 al 85%. Sin embargo, debido a que las recaídas eran frecuentes solo con la radioterapia, se empezó a utilizar la modalidad combinada; se consideran tres características importantes para que el paciente sea tratado con quimioterapia/radioterapia:

- a) Pacientes con estadios I o II en los cuales la quimioterapia se utiliza para erradicar enfermedad oculta-infradiafragmática.
- b) Pacientes con pronóstico desfavorable, para quienes la radioterapia como terapia única, es inadecuada.

c) Pacientes pediátricos en los cuales es muy importante reducir la dosis y el campo de radiación, sólo a la zona de nódulos linfáticos afectados (15).

En la mayoría de los estudios, el régimen a seguir, es radioterapia a campos comprometidos que incluye solo los nódulos linfáticos afectados a una dosis de entre 25 y 35 Gy en combinación con 4 a 5 ciclos de agentes quimioterapéuticos: MOPP/ABVD u otras mezclas con agentes alquilantes y antraciclinas o ABVD solo (1, 4, 11).

El grupo SDS (Standford, Dana Farber, St Jude), investigó la eficacia de una novedosa combinación de quimioterapia: 4 ciclos de VAMP (Vinblastina, Adriamicina, Metrotexate, Prednisona) y radioterapia; con esto, se observó una sobrevida libre de enfermedad a 4 años del 94%±3%, lo que sugirió que los pacientes pediátricos, en estadios tempranos de EH, pueden ser tratados de forma exitosa sin el uso de agentes alquilantes o bleomicina (13).

#### 1.4.6. Tratamiento en pacientes con EH en estadios avanzados desfavorables (II<sub>B</sub>-IV)

Las presentaciones desfavorables de la EH se caracterizan por la presencia de síntomas “B”, linfadenopatía periférica o mediastinal en el estadio II y estadios tardíos III y IV (13, 29).

La mayoría de los protocolos de tratamiento, prescriben el uso de 6 ciclos de MOPP o COPP, ABVD, MOPP/ABVD o combinaciones similares. Inicialmente el régimen MOPP era el más utilizado en estadios avanzados, sin embargo, un alto porcentaje de pacientes presentaba efectos secundarios; debido a esto, se probó ABVD y la terapia combinada MOPP/ABVD con la que se obtuvieron porcentajes del 70 al 90% de supervivencia libre de enfermedad, además de reducir los efectos tóxicos del MOPP (4, 6, 29).

Recientemente el grupo GHSG (German Hodgkin Study Group), probó un nuevo régimen de quimioterapia BEACOPP (Bleomicina, Etoposido, Adriamicina + COPP) que en diversos estudios, mostró tener mejores resultados con respecto al uso de COPP/ABVD en estudios a corto plazo (6, 12, 29).

La quimioterapia se administra a intervalos semanales, intercalando agentes por un periodo de 3 a 5 meses. De manera frecuente, se utiliza la radioterapia después de la quimioterapia para reducir el riesgo de recaídas locales (6, 13, 15).

#### 1.4.7. Recaídas

Los pacientes tratados con terapia convencional y que se considera que responden mal al tratamiento son aquellos que:

- Fallan en alcanzar una remisión completa
- Tienen periodos cortos de remisión (12 meses o menos)
- Desarrollan múltiples recaídas

Alrededor del 10 al 20% de los pacientes pediátricos con EH localizada y 30 al 40% en estadios avanzados de la enfermedad, recaen dentro de los primeros 3 años después del diagnóstico (4).

Los pacientes con recaídas limitadas a ciertos nódulos linfáticos y que han recibido un tratamiento con quimioterapia, son buenos candidatos para ser tratados con radioterapia con buenos resultados (15). En el caso de los individuos con recaída después del tratamiento con radioterapia, se logra cura en el 50 al 80% de ellos, después del tratamiento con quimioterapia (4).

Otro tipo de terapia de salvamento para pacientes con recaída localizada, después del tratamiento con quimioterapia es la modalidad combinada, donde la radiación trata los nódulos afectados y la quimioterapia controla el desarrollo de EH en zonas microscópicas ocultas (15).

Durante las últimas 2 décadas, se ha utilizado otra alternativa de tratamiento para pacientes con EH en recaída después del tratamiento inicial que se basa en altas dosis de quimioterapia y radioterapia seguido por un trasplante de células madre hematopoyéticas, lo cual ha sido efectivo en este tipo de pacientes (1).

## 1.5. Consecuencias secundarias al tratamiento

El tratamiento exitoso con quimioterapia, radioterapia o ambos, en pacientes con EH, está asociado con secuelas importantes en una alta proporción de ellos. Estos efectos colaterales al tratamiento, dependen del régimen quimioterapéutico y del número de ciclos utilizado, así como de la dosis total y del campo irradiado.

Entre los efectos secundarios, se incluyen infertilidad, enfermedades cardíacas, disfunciones de la tiroides y desarrollo de cáncer secundario. Tanto las afecciones cardíacas como el cáncer secundario, representan la tercera parte de las muertes entre los pacientes con EH (11, 13).

Alrededor de un 30% de los pacientes tratados con radiación de manto, desarrollan anomalías de la tiroides, principalmente hipotiroidismo, nódulos y en menor proporción cáncer (5, 11, 15). Los efectos cardíacos se observan después del uso de radioterapia a dosis altas (>40Gy) o de quimioterapia con antraciclinas; se ha observado que estos efectos disminuyen con la terapia combinada, donde se reduce la dosis de antraciclinas (11). La función pulmonar se puede ver afectada por el uso de fármacos como la bleomicina y radioterapia de manto (13).

El cáncer secundario es la consecuencia más grave de la terapia anti-neoplásica utilizada en estos individuos, siendo los más comunes: Leucemia aguda (25%), Linfoma no-Hodgkin (17%) y tumores sólidos (58%) (11, 30, 31, 32). La alta incidencia de leucemia aguda no linfoblástica y síndrome mielodisplásico (2 al 6%), se atribuye al uso de quimioterapia con agentes alquilantes e inhibidores de la topoisomerasa II (5, 6, 13, 14, 32, 33, 34, 35). Hay algunos reportes donde se menciona que la esplenectomía en estos pacientes, antes del tratamiento con agentes alquilantes, incrementa también el riesgo de desarrollar leucemia (13, 33).

La aparición de leucemia, alcanza un pico de incidencia entre los 3 y 10 años post-tratamiento (11, 33, 36). Es importante mencionar que la leucemia secundaria se asocia con anormalidades cromosómicas con una participación frecuente de los cromosomas 5, 7 y 17 (11, 34).

Los tumores sólidos son la mayor causa de mortalidad después del tratamiento con radioterapia y tienen una latencia de aproximadamente 10 años; algunos de estos tumores se desarrollan en el margen o dentro del campo irradiado. Los principales tumores son de: mama, pulmón, piel, tiroides, tracto gastrointestinal y tejido conectivo (11, 13, 14, 15).

El riesgo de desarrollar linfoma No-Hodgkin, se incrementa de los 10 primeros años hasta la segunda década después del tratamiento para EH (14). Se ha reportado que la aparición de este tipo de cáncer no está relacionada con un tipo específico de terapia (36).

## 1.6. Consecuencias genotóxicas del tratamiento antineoplásico en linfocitos de sangre periférica.

Cuando se utilizan estos esquemas de tratamiento, la terapia no es específica para las células tumorales también las células normales se ven afectadas lo cual en células somáticas puede tener serias consecuencias, entre ellas la aparición de cáncer secundario como leucemia y diversos tipos de tumores sólidos como ya se mencionó, los cuales pueden originarse por alteraciones cromosómicas inducidas por los agentes administrados.

Existen pocos trabajos sobre el daño a largo plazo en células somáticas que puede provocar el uso de estos fármacos. En 2001 se reportó un estudio realizado en 30 pacientes EH tratados con MOPP/ABV con o sin radioterapia y 15 individuos sanos y se encontró un aumento significativo en el porcentaje de aberraciones cromosómicas estructurales, intercambio de cromátidas hermanas y micronúcleos como resultado de la terapia; daño que persistió 6 meses después de finalizado el tratamiento (37).

En otro estudio, se reportó un paciente con EH tratado con ABVD y radioterapia en el cual se encontraron 21.5% de alteraciones cromosómicas estructurales estables e inestables, las cuales persistieron un año después de la quimioterapia y 6 meses después de la radioterapia (38).

En el estudio más reciente, se estudiaron 49 pacientes con EH antes y después del tratamiento, 20 individuos sanos y 69 pacientes con cáncer sin tratamiento. El estudio se hizo por medio de FISH con sondas para los cromosomas 1, 3 y 4, se analizaron aberraciones cromosómicas estructurales sencillas y complejas y se observó que 2 años después de aplicadas la quimioterapia y la radioterapia, se encuentra un incremento en el número de aberraciones cromosómicas (39).

Es importante hacer notar que ninguno de estos autores estudió la frecuencia de alteraciones cromosómicas numéricas como resultado de la terapia antineoplásica.

## **2. JUSTIFICACION**

La efectividad anticancerígena de los fármacos utilizados en los pacientes con EH es tan alta, que en estos momentos se tiene a nivel mundial una gran población de sobrevivientes potencialmente afectados a nivel genético, como resultado de su exposición a potentes agentes quimioterapéuticos. Se debe hacer notar, que el tratamiento antineoplásico para EH, afecta no solo a células cancerosas sino también a las células normales, lo que puede provocar efectos genotóxicos secundarios a nivel de células somáticas, produciendo anemias y la aparición de cáncer secundario.

Debido a esto, se considera necesario realizar un estudio de las consecuencias genotóxicas de estos tratamientos, dirigiéndolo específicamente a la búsqueda de alteraciones cromosómicas numéricas en linfocitos de sangre periférica de los sobrevivientes a EH. El detectar los tratamientos altamente genotóxicos permitirá asesorar y manejar de manera eficiente y oportuna a los pacientes, así como seleccionar los tratamientos menos nocivos.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GENERAL

- Determinar si el tratamiento MOPP/ABVP, genera alteraciones cromosómicas numéricas en linfocitos de sangre periférica de sobrevivientes a EH.

#### 3.2. OBJETIVOS PARTICULARES

En linfocitos de sangre periférica:

- Comparar la frecuencia de aneuploidías de pacientes con EH sin tratamiento con la de individuos sanos.
- Comparar la frecuencia de aneuploidías de sobrevivientes a EH después del tratamiento antineoplásico, con la de individuos sanos.
- Determinar si existen diferencias en la frecuencia de alteraciones cromosómicas numéricas por cromosoma específico, en pacientes con EH antes y después del tratamiento antineoplásico.
- Comparar la frecuencia de aneuploidías de individuos con EH capaces de producir espermatozoides, con la de individuos con EH azoospermicos.

#### **4. HIPOTESIS**

El tratamiento antineoplásico MOPP/ABVP utilizado para pacientes con enfermedad de Hodgkin induce a largo plazo, alteraciones cromosómicas numéricas en linfocitos de sangre periférica.

## **5. MATERIAL Y METODOS**

### 5.1. Población de estudio.

Se estudió un grupo de 5 individuos sanos y 15 pacientes con EH divididos en tres grupos:

- 5 pacientes con EH sin tratamiento
- 5 pacientes sobrevivientes a EH con espermatozoides, tratados con MOPP/ABVP
- 5 pacientes sobrevivientes a EH azoospermicos, tratados con MOPP/ABVP

De los pacientes estudiados, 8 pertenecen a la clínica de sobrevivientes del servicio de Oncología del Instituto Nacional de Pediatría, 3 al Instituto Nacional de Cancerología, 3 al Hospital General de México y 1 al Centro Médico 20 de Noviembre (ISSSTE).

## 5.2. Criterios de Inclusión.

### 5.2.1. Para Individuos Sanos:

- Edad de 18 años o mayores.
- Que aceptaron participar en el estudio voluntariamente y firmaron carta de consentimiento informado (Anexo 1).
- Que contestaron adecuadamente los cuestionarios (Anexo 2).

### 5.2.2. Para pacientes EH sin tratamiento:

- Se incluyeron los pacientes que se diagnosticaron con EH de acuerdo con los criterios médicos y de laboratorio pertinentes y que no recibieron ningún tipo de terapia antineoplásica.
- Edad de 18 años o mayores.
- Que aceptaron participar en el estudio voluntariamente y firmaron carta de consentimiento informado (Anexo 1).
- Que contestaron adecuadamente los cuestionarios (Anexo 2).

### 5.2.3. Para sobrevivientes EH:

- Se incluyeron en el estudio, pacientes sobrevivientes a EH que tuvieron por lo menos dos años de haber concluido el tratamiento con quimioterapia.
- Edad de 18 años o mayores.
- Que aceptaron participar en el estudio voluntariamente y firmaron carta de consentimiento informado (Anexo 1).
- Que contestaron adecuadamente los cuestionarios (Anexo 2).

### 5.3. Criterios de Exclusión

En los tres grupos de individuos:

- Aquellos que de acuerdo a los cuestionarios estuvieron expuestos a agentes extrínsecos fuera de su terapia anticáncer (exposición ambiental o clínica, enfermedades infecciosas, hábitos personales, etc.)
- Aquellos que por condiciones intrínsecas (otros cánceres) pudieran modificar la frecuencia de alteraciones cromosómicas.

#### 5.4. Citogenética en linfocitos.

De cada individuo se obtuvieron 10 ml de sangre periférica: 2 ml se utilizaron para cultivo de linfocitos y el resto de la sangre se separó por gradientes de densidad y centrifugación y se congeló para formar un banco de células de sobrevivientes con EH.

##### 5.4.1. Cultivo celular

Por duplicado, en 10 ml de medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal de bovino al 10% y 0.2 ml de fitohemaglutinina, se agregó 1 ml de sangre periférica heparinizada.

Todos los cultivos se incubaron a 37°C durante 48 h, después a cada cultivo se le agregaron 0.2 ml de colchicina [1mg/ml] durante 3 h para obtener cromosomas en metafase; se centrifugó durante 10 min a 1500 rpm, se retiró el sobrenadante y se agregaron 10 ml de solución hipotónica (KCl 0.075M) y se incubaron a 37°C durante 25 min. Se agregaron 2 ml de fijador Carnoy (metanol – ácido acético 3:1), se resuspendió, se centrifugó durante 10 min, se quitó sobrenadante y se obtuvo el paquete celular. Finalmente se hicieron 3 lavados con fijador para que las células quedaran limpias.

#### 5.4.2. Láminas y Bandas G

Las preparaciones se hicieron por goteo del material celular en portaobjetos y se obtuvieron bandas GTG mediante el tratamiento con tripsina/EDTA y tinción con Giemsa-Wright.

#### 5.4.3. Análisis de cromosomas

- En todos los casos, las preparaciones fueron codificadas por una persona ajena al estudio.
- Se contaron 1000 metafases por individuo. De éstas, se escogieron 15 para el análisis del patrón de bandeo de todos los cromosomas y regiones subcromosómicas para descartar la presencia de aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales de tipo constitucional.
- Se determinó la frecuencia de aneuploidías:

Se contó el número cromosómico de metafases con adecuada dispersión cromosómica y en células no adyacentes. En todos los casos de células con hipodiploidías e hiperdiploidías, por medio de las bandas GTG se identificó el cromosoma faltante o extra y se registró en una hoja de colección de datos de análisis cromosómico.

- Cuando se observó una metafase con aneuploidía a 1000 aumentos, las metafases que se encontraban dentro del perímetro del objetivo de 10x (100 aumentos), se analizaron también para descartar los artefactos que se hubieran podido presentar durante la obtención de la preparación.
- Para poder determinar a los individuos con presencia o ausencia de clonas hipodiploides para cada uno de los cromosomas analizados, se obtuvieron valores basales, los cuales representan el valor a partir del cual una población celular puede considerarse como anormal. Los valores basales se obtuvieron de la frecuencia de aneuploidías de linfocitos de 5 individuos sanos, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Valor de corte} = \left[ \text{Promedio de aneuploidías} + 2 (\text{Desviaciones Estandar}) \right] \text{ de 5 individuos sanos} \quad (40).$$

#### 5.4.4. Espermatobioscopías

Los datos de las espermatobioscopías que se muestran como parte de los resultados, pertenecen a un trabajo previo de análisis de genotoxicidad en células germinales y que junto con este estudio, conforman un proyecto global de pacientes con EH.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Población de estudio.

Se estudiaron un total de 20 individuos, que incluyen 5 individuos sanos, los cuales tuvieron un rango de edad de 18 a 24 años (Cuadro 1). Los datos obtenidos de los cuestionarios de tamizaje, están descritos en el cuadro 1.

Los valores obtenidos en las espermatobioscopías realizadas en el grupo de individuos sanos, muestran estar dentro de los rangos normales dados por la OMS, excepto para el individuo NL14-03, donde el volumen estuvo por debajo de los rangos normales (Cuadro 2).

Cuadro 1. Características de los individuos sanos

Código del Individuo	Edad a la toma de la muestra (años)	Hábitos personales		
		Tabaco (cigarros /día)	Alcohol (ml /semana)	Cafeína (tazas /semana)
NL8-02	20	2	330-660	–
NL10-02	20	1	–	2
NL11-03	18	–	–	2
NL12-03	21	–	–	17
NL14-03	24	3	–	–

Cuadro 2. Espermatobioscopías de los individuos estudiados

Código del Individuo	Cuenta Espermática 10 <sup>6</sup> /ml	Volumen (ml)	Viscosidad	Licuefacción	pH	Viabilidad (%)	Morfología (% de formas normales)
<b>INDIVIDUOS SANOS</b>							
NL8-02	90	3.4	Normal	Completa	8.5	83	37
NL10-02	209	2.6	Normal	Completa	8.5	82.5	45
NL11-03	236	5	Normal	Completa	8	80.3	61
NL12-03	229	2.7	Normal	Completa	8	77	53
NL14-03	82	0.45	Normal	Completa	8	86	76
<b>PACIENTES EH Pre-Tx</b>							
Pre-Tx35-04	126	1.6	Normal	Completa	8.5	64	15
Pre-Tx39-04	218	0.5	Normal	Completa	8	77	29
Pre-Tx45-04	114	4.3	Normal	Completa	8.5	46	22
Pre-Tx51-04	113	2	Normal	Completa	8.5	80.5	70
Pre-Tx52-04	263	0.9	Normal	Completa	8	58.5	53
<b>PACIENTES EH CON Tx CON ESPERMATOZOIDES</b>							
MOPP5-02	0.55	3.5	Normal	Completa	8.5	ND	ND
MOPP7-02	72	0.5	Moderada	Incompleta	8.5	80.75	41
MOPP12-02	3	4.8	Normal	Completa	8	52	82
MOPP21-02	0.43	2.5	Normal	Incompleta	8.5	12	46
MOPP23-02	7	0.8	Normal	Completa	8	83	35.5
OMS	20-250	2 a 6	nl –gota	Completa	7.2-8	>60	>30

ND, No Determinado

El siguiente grupo estudiado fue el de pacientes EH sin tratamiento; estuvo conformado por 3 pacientes con edades de 20 a 23 años, uno con 16 y uno con 52 años (Cuadro 3), ninguno de ellos con antecedentes importantes con respecto a los cuestionarios de tamizaje.

La densidad espermática, viscosidad, licuefacción y pH están dentro de los valores de la OMS; en cuanto al volumen y al porcentaje de espermatozoides con morfología normal, 3 pacientes tienen valores por debajo de los parámetros normales; para la viabilidad, 2 pacientes están por debajo de los límites de la OMS; 4 de 5 pacientes, tienen alteraciones en la espermatobioscopía y solo el paciente Pre-Tx51-04 tuvo valores normales (Cuadro 2).

Cuadro 3. Características de los pacientes EH Pre-Tratamiento.

Código del Individuo	Edad a la toma de la muestra (años)	Histología/ Estadio de la EH
Pre-Tx35-04	23	CM / IVB
Pre-Tx39-04	20	CM / IVB
Pre-Tx45-04	52	EN / IIB
Pre-Tx51-04	20	CM / -
Pre-Tx52-04	*16	- / IIA

CM, Celularidad Mixta EN, Esclerosis Nodular  
 \* Paciente incluido con consentimiento de los padres.

Los 2 siguientes grupos están representados por los pacientes EH tratados con quimioterapia y/o radioterapia, con producción de espermatozoides y azoospermicos.

En el grupo con espermatozoides se estudiaron 5 pacientes tratados con el mismo esquema quimioterapéutico con diferente número de ciclos, todos recibieron radioterapia supradiafragmática y/o para-aórtica y al momento de realizar el estudio, tuvieron de 13 a 17 años de haber recibido el tratamiento (Cuadro 4a). Los datos obtenidos de los cuestionarios de tamizaje son variables y se presentan en el Cuadro 4b.

Con respecto a las espermátobioscopías, las cuentas espermáticas en 4 de los 5 pacientes están por debajo de los rangos normales; hay valores bajos en el volumen de las muestras en 2 pacientes y la licuefacción fue incompleta en 2 pacientes; éste último parámetro no se vio alterado en ningún individuo de los grupos previos (Cuadro 2).

Los pacientes azoospermicos al momento del estudio, tenían desde 2 hasta 20 años de haber sido tratados. Todos fueron tratados con la misma quimioterapia y número variable de ciclos; solo un paciente recibió únicamente MOPP. La radioterapia se aplicó a 3 de los 5 pacientes con dosis variables (Cuadro 4a). Los datos de los cuestionarios de tamizaje se describen en el Cuadro 4b.

Es importante aclarar que en relación al número de ciclos de quimioterapia que recibieron cada uno de los pacientes, 3 de 5 pacientes con espermatozoides tuvieron menos de 6 ciclos tanto de MOPP como de ABVP y solo 1 de 5 pacientes azoospermicos recibió menos de 6 ciclos de quimioterapia (Cuadro 4a).

Cuadro 4a. Características de los pacientes EH con Tratamiento

Código del paciente	Histología/ Estadio de la EH	Quimioterapia/ Ciclos	Radioterapia/ Gy*	Edad al Inicio del Tx	Edad a la toma de la muestra	Años después del tratamiento
<b>PACIENTES EH CON TX / CON ESPERMATOZOIDES</b>						
MOPP5-02	- / III	MOPP/8 ABVP/5	Supradiaf./35	6 años	20 años	14 años
MOPP7-02	CM / III	MOPP/5 ABVP/4	Supradiaf./42 P. aórtica/25	8 años	21 años	13 años
MOPP12-02	EN / III	MOPP/5 ABVP/4	Supradiaf./60 P.aórtica/20	3 años	20 años	17 años
MOPP21-02	DL / IIIB	MOPP/6 ABVP/6	P.aórtica/30	7 años	20 años	13 años
MOPP23-02	CM / IA	MOPP/5 ABVP/1	Supradiaf./20	5 años	19 años	14 años
Promedio±DE				5.8±1.72	20±0.63	14.2±1.46
<b>PACIENTES EH CON TX / AZOOSPÉRMICOS</b>						
MOPP9-02	CM / IV	MOPP/8 ABVP/8	No	8 años	21 años	13 años
MOPP22-02	- / III	MOPP/4 ABVP/5	Supradiaf./25	9 años	20 años	11 años
MOPP26-03	- / IIIA	MOPP/6 ABVD/6	Si	14 años	16 años	2 años
MOPP41-04	EN / IVB	MOPP/9	No	8 años	24 años	16 años
MOPP43-04	EN / IIIB	MOPP/6 ABVD/6	Supradiaf./25 P.aórtica/21	10 años	30 años	20 años
Promedio±DE				9.8±2.2	22.2±4.6	12.4±6

CM, Celularidad Mixta EN, Esclerosis Nodular DL, Disminución Linfocítica

\* En todos los pacientes se protegieron las gónadas con placas de plomo.

Cuadro 4b. Características de los pacientes EH con Tratamiento

Código del Paciente	Tabaco (cigarros /día)	Hábitos personales Alcohol (ml /semana)	Cafeína (tazas /semana)
<b>Pacientes EH con Tx con espermatozoides</b>			
MOPP5-02	7	115	15
*MOPP7-02	–	–	–
*MOPP12-02	<1	–	–
MOPP21-02	–	<25	–
*MOPP23-02	–	–	6
<b>Pacientes EH con Tx azoospérmicos</b>			
MOPP9-02	–	–	–
*MOPP22-02	<1	125	2
MOPP26-03	–	–	2
MOPP41-04	–	–	–
*MOPP43-04	–	–	2

\* Pacientes con hipotiroidismo secundario a radioterapia, todos son tratados con “eutirox”.

## 6.2. Frecuencia de aneuploidías.

En el cuadro 5 y Gráfica 1 se presentan las frecuencias totales de aneuploidías de los 4 grupos de individuos estudiados; el grupo de pacientes EH tratados con quimioterapia con o sin radioterapia, con producción de espermatozoides, presentó el promedio mas alto de aneuploidías totales:  $3 \pm 1.9$ ; al tomar en cuenta los valores independientes de hipodiploidías e hiperdiploidías, este mismo grupo tuvo las frecuencias mas altas, sin embargo, no hubo diferencias significativas con respecto a los otros grupos mediante la prueba estadística de Kruskal-Wallis. En el grupo de individuos sanos, no se presentaron hiperdiploidías, a diferencia de los otros 3 grupos, en donde en los pacientes EH pretratamiento hubo 1 paciente con hiperdiploidías y en el grupo de pacientes EH tratados, con producción de espermatozoides y azoospermicos, se presentaron en 2 pacientes en cada grupo. Al comparar la suma de las frecuencias totales de aneuploidías de los 2 grupos de pacientes con tratamiento contra la frecuencia de los individuos sanos, no se tuvieron diferencias significativas; lo mismo se presentó al comparar la suma de frecuencias totales de aneuploidías de los 3 grupos de pacientes (un grupo sin tratamiento y 2 con tratamiento) contra el grupo de individuos sanos.

Cuadro 5. Frecuencia de aneuploidías / 1,000 Células

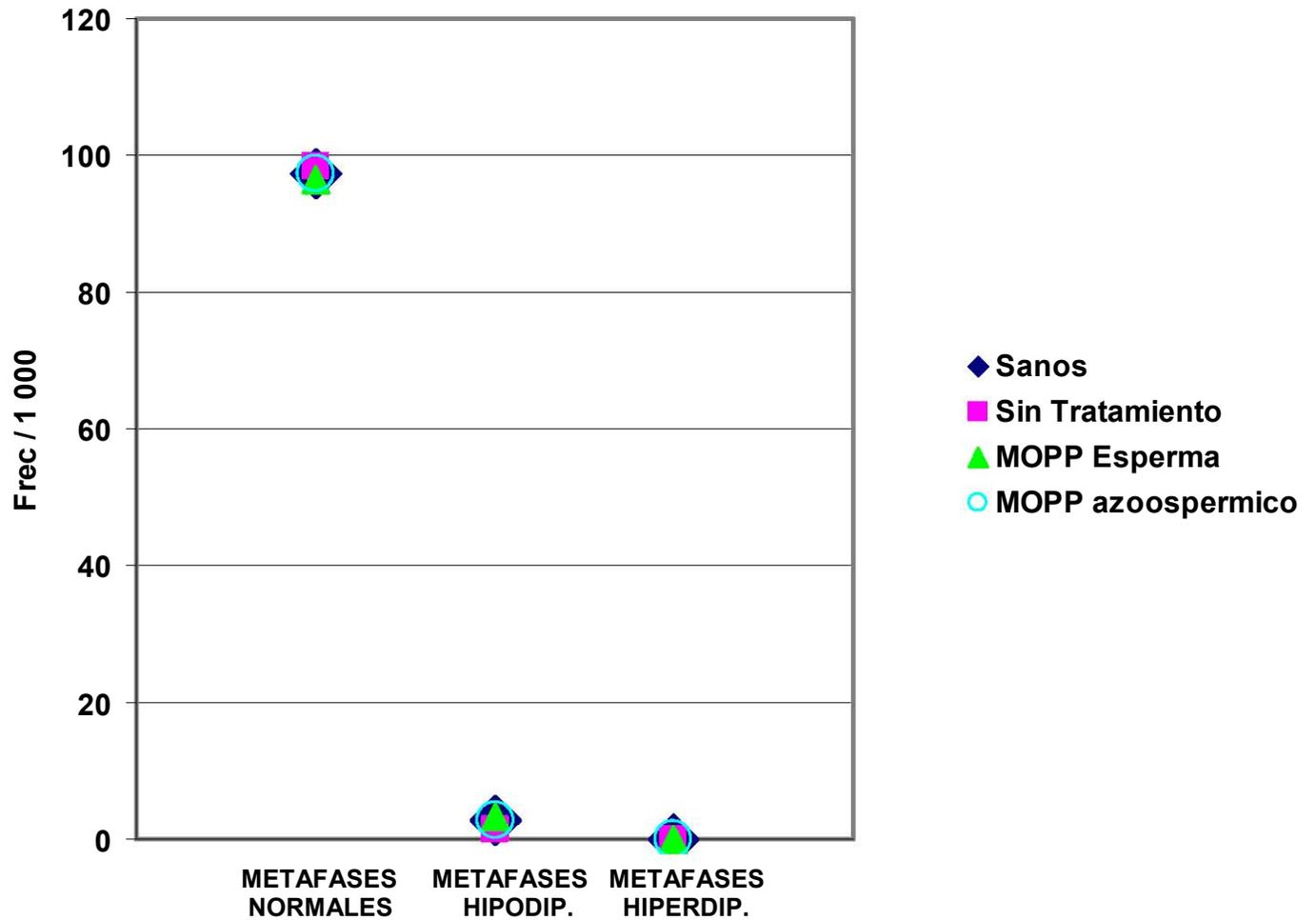
Código del Individuo	Porcentaje De Metafases Normales 46,XY	Porcentaje De Hipodiploidías	Porcentaje De Hiperdiploidías	Porcentaje De Aneuploidías Totales
<b>INDIVIDUOS SANOS</b>				
NL8-02	99.1	0.9	0	0.9
NL10-02	95.3	4.7	0	4.7
NL11-03	97.5	2.5	0	2.5
NL12-03	97.0	3.0	0	3.0
NL14-03	98.8	1.2	0	1.2
Promedio±DE	97.5±1.4	2.5±1.4	0	2.5±1.4
<b>PACIENTES EH PRE-TRATAMIENTO</b>				
Pre-Tx35-04	97.7	2.3	0	2.3
Pre-Tx39-04	98.6	1.4	0	1.4
Pre-Tx45-04	98.6	1.2	0.2	1.4
Pre-Tx51-04	99.8	0.5	0	0.5
Pre-Tx52-04	99.9	0.1	0	0.1
Promedio±DE	98.9±0.8	1.1±0.8	0.04±0.08	1.1±0.8
<b>PACIENTES EH CON Tx/CON ESPERMATOZOIDES</b>				
MOPP5-02	99.1	0.9	0	0.9
MOPP7-02	99.3	0.7	0	0.7
MOPP12-02	95.1	4.7	0.2	4.9
MOPP21-02	95.9	4.0	0.1	4.1
MOPP23-02	95.3	4.7	0	4.7
Promedio±DE	96.9±2	3±2	0.06±0.08	3±2
<b>PACIENTES EH CON Tx/AZOOSPERMICOS</b>				
MOPP9-02	95.8	4.1	0.1	4.2
MOPP22-02	95.8	4.2	0	4.2
MOPP26-03	97.4	2.5	0.1	2.6
MOPP41-04	99.0	1.0	0	1.0
MOPP43-04	99.7	0.3	0	0.3
Promedio±DE	97.5±2	2.4±2	0.04±0.05	2.5±2
Total de Aneuploidías				*2.8±2 **2.2±2

\*Pacientes EH con Tx con espermatozoides + Pacientes EH con Tx azoospermicos (Promedio±DE)

\*\*Pacientes EH sin Tx + Pacientes EH con Tx con espermatozoides + Pacientes EH con Tx y azoospermicos (Promedio±DE)

No hubo diferencia significativa en el porcentaje de aneuploidías entre ninguno de los grupos estudiados.

Gráfica 1. Frecuencia de Aneuploidías / 1,000 células



Gráfica 1. Frecuencia de aneuploidías de cada grupo de individuos estudiado. Cada una de las figuras con diferentes colores, representan: individuos sanos, pacientes EH sin tratamiento y pacientes EH con tratamiento, con producción de espermatozoides o azoospermicos; en el eje de las X, está el tipo de células encontradas y en el eje de las Y, se presenta la frecuencia de cada tipo celular por 1,000 metafases analizadas.

### 6.3. Clonas hipodiploides por cromosoma.

La hipodiploidía fue la alteración numérica que se encontró con mayor frecuencia en todos los grupos estudiados. En el cuadro 6 se muestran las clonas encontradas en cada grupo de pacientes estudiados, a partir de los valores de corte para hipodiploidías, obtenidos de 5 individuos sanos.

De los grupos estudiados, el de pacientes con EH pre-tratamiento, fue el que tuvo el menor número de clonas por cromosoma. Los cromosomas que se perdieron fueron el 7 y el 10 en los pacientes Pre-Tx39-04 y Pre-Tx35-04 respectivamente.

Los pacientes con EH con tratamiento y capaces de producir espermatozoides, perdieron cromosomas de los grupos: A, C-G. En el grupo A, se encontraron clonas hipodiploides para los cromosomas 2 y 3; para el C, los cromosomas 7 y 10, al igual que en los pacientes sin tratamiento; para el grupo D, se perdió con frecuencia el cromosoma 13; el cromosoma 17 del grupo E, fue el que tuvo el mayor número de clonas en 3/5 pacientes; del grupo F, fueron los cromosomas 19 y 20; y por ultimo, del grupo G, el cromosoma 21 fue el que más se perdió.

Para los pacientes EH con tratamiento y azoospermicos, la pérdida de los cromosomas del grupo A y B, generaron clonas para los cromosomas 3 y 5; del grupo C, se perdieron los cromosomas 7, 10, 11 y 12; del grupo E, el cromosoma 17 y del grupo F, los cromosomas 19 y 20.

Dentro de los cromosomas sexuales, en los pacientes azoospermicos, uno presentó clonas para el cromosoma Y, a diferencia de los otros dos grupos, donde ningún paciente tuvo pérdidas frecuentes de este cromosoma. El cromosoma X no estuvo representado en ninguno de los pacientes estudiados.

Es importante resaltar que en los 3 grupos de pacientes, el mayor número de clonas encontradas fue para los cromosomas 7 y 10. Para los pacientes con tratamiento, con espermatozoides y azoospermicos, también los cromosomas 3, 17 y 20 se perdieron con frecuencia. Se observó que hubo ausencia de clonas para los cromosomas 1, 4, 6, 8, 9, 14, 15, 16, 18 y 22.

En los tres grupos de pacientes analizados, se encontraron células con dobles aneuploidías tipo hipodiploidías (Cuadro 7).

Cuadro 6. Clonas hipodiploides / cromosoma

CODIGO DEL INDIVIDUO	CROMOSOMAS																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y	
<b>PACIENTES EH Pre-Tx</b>																									
Pre-Tx35-04										2															
Pre-Tx39-04							1																		
Pre-Tx45-04																									
Pre-Tx51-04																									
Pre-Tx52-04																									
<b>PACIENTES EH CON Tx/ CON ESPERMATOZOIDES</b>																									
MOPP5-02																									
MOPP7-02																									
MOPP12-02			1														3			6	8				
MOPP21-02			1				2			3			5				2								
MOPP23-02		2					1										3		3						
<b>PACIENTES EH CON Tx/ AZOOSPERMICOS</b>																									
MOPP9-02			2	3		1				3										5					8
MOPP22-02			2			2				2		4					2		3						
MOPP26-03										2															
MOPP41-04							1																		
MOPP43-04							1																		
<b>*Valores Basales</b>	1.4	0		2		.5				1.6	2.2	3	3.2				1.4		2.2	4.2	7.2			6	

\* Valor basal: Promedio (Aneuploidías de 5 individuos sanos)+2(DE)

\*\*Grupos Cromosómicos • Grupo A • Grupo C • Grupo E • Grupo G  
 • Grupo B • Grupo D • Grupo F

Cuadro 7. \*Dobles Hipodiploidías

CODIGO DEL INDIVIDUO	DOBLES HIPODIPLOIDIAS (Células 44, XY)					
<b>PACIENTES EH Pre-Tx</b>						
Pre-Tx35-04	-4,-22					
<b>PACIENTES EH CON Tx/ CON ESPERMATOZOIDES</b>						
MOPP12-02	-6,-15	-18,-Y	-8,-20	-20,-21	-21,-22 [2]	
MOPP21-02	-7,-20	-3,-17	-10,-13	-13,-14		
MOPP23-02	,7,-15	-6,-12	-8,-21			
<b>PACIENTES EH CON Tx/AZOOSPERMICOS</b>						
MOPP9-02	-3,-Y	-3,-12	-5,-20			
MOPP22-02	-3,-22	-13,-14	-9,-18	-4,-Y	-21,-22	-7,-15
MOPP26-03	-4,-5					

[ ] Número de células con la misma alteración

\*Los individuos sanos no presentaron este tipo de células

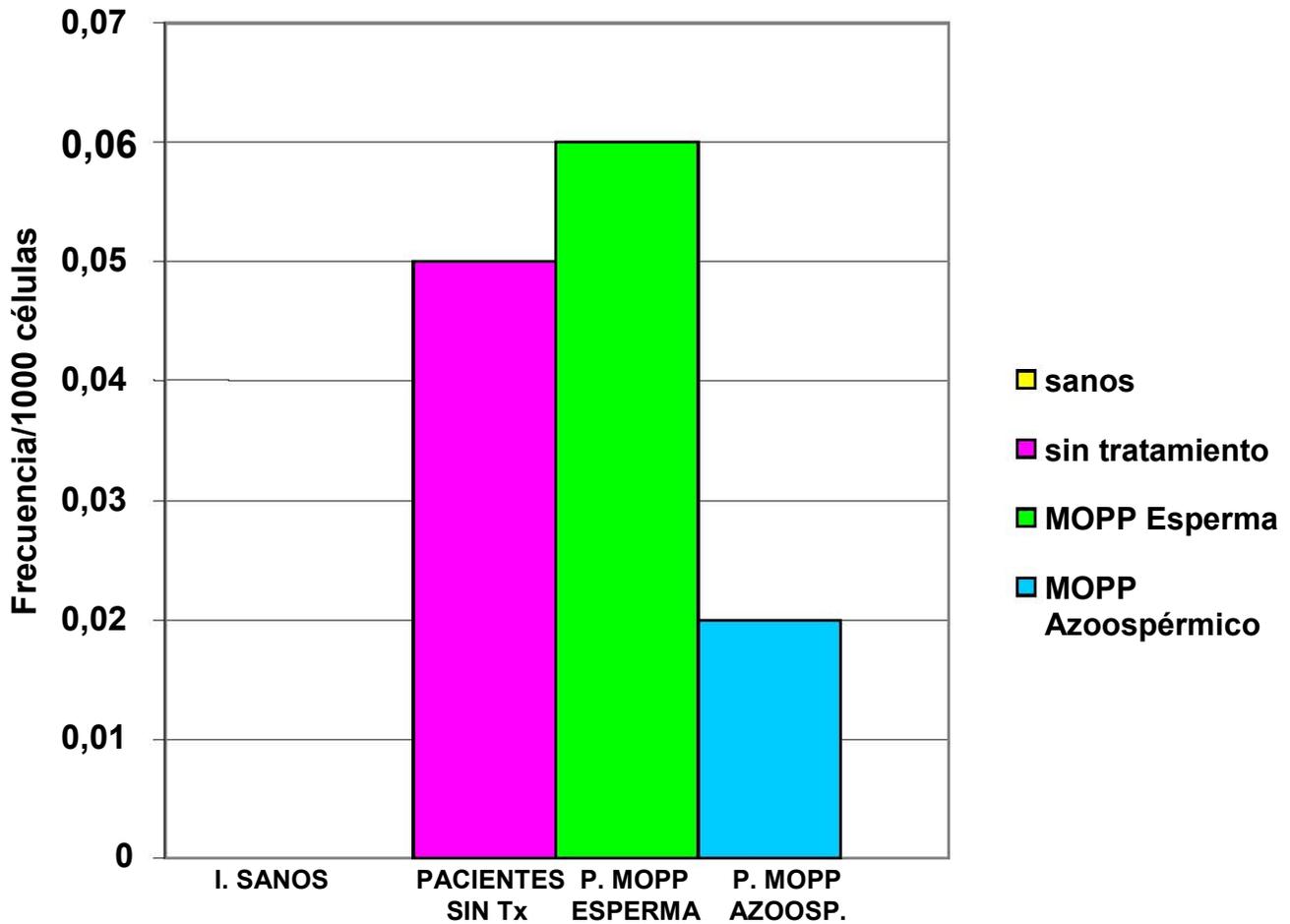
#### 6.4. Hiperdiploidías por cromosoma.

En el cuadro 8 y Gráfica 2 se puede observar que los individuos sanos no tuvieron ninguna célula con ganancia de cromosomas, mientras que en los pacientes con EH pre-tratamiento y en los 2 grupos de pacientes EH con tratamiento, sí se presentaron hiperdiploidías y a pesar de que en ninguno se encontró la existencia de clonas, siempre se trató de células trisómicas únicas y no se tuvieron diferencias significativas entre los 4 grupos estudiados mediante la prueba de  $\chi^2$  de proporciones, resulta importante resaltar que solo los 3 grupos de pacientes las tuvieron, con una ligera predominancia para los pacientes tratados y con espermatozoides.

Cuadro 8. Células con Hiperdiploidías / cromosoma

CODIGO DEL INDIVIDUO	CROMOSOMAS				
	5	9	15	21	Y
<b>PACIENTES EH Pre-Tx</b>					
SIN Tx45-04				1	1
<b>PACIENTES EH CON Tx/ CON ESPERMATOZOIDEOS</b>					
MOPP12-02			1	1	
MOPP21-02	1				
<b>PACIENTES EH CON Tx/AZOOSPERMICOS</b>					
MOPP26-03		1			

Gráfica 2. Frecuencia de hiperdiploidías / 1,000 Células



La gráfica 2 presenta la frecuencia de hiperdiploidías en cada grupo de individuos estudiado. Las barras con diferentes colores representan: individuos sanos, pacientes EH sin tratamiento y pacientes EH con tratamiento, con producción de espermatozoides o azoospermicos; en el eje de las X, está el grupo estudiado y en el eje de las Y, se presenta la frecuencia de células con ganancia de cromosomas por 1,000 metafases analizadas.

## 6.5. Aberraciones cromosómicas estructurales (ACE).

Aunque originalmente el objetivo de este trabajo no fue la detección de aberraciones cromosómicas de tipo estructural, éstas se observaron en los 3 grupos de pacientes estudiados y en ninguno de los individuos sanos.

En el cuadro 9 se presenta el desglose de todas las alteraciones estructurales que se encontraron en 7 de 10 pacientes con EH tratados con MOPP/ABVP. En el grupo de pacientes EH pre-tratamiento, se encontraron pacientes con delección de los cromosomas 7q- en uno y 21q- en otro; ambas alteraciones están reportadas como características de las células EH (10); por lo que consideramos que estas clonas representan células cancerosas, que por no haber recibido tratamiento, se pueden detectar dentro de la población de linfocitos. El grupo con tratamiento y con espermatozoides, fue el que tuvo un mayor número de pacientes con aberraciones estructurales, sin embargo, en el grupo de pacientes azoospermicos, hay mas alteraciones por paciente y en 2 de ellos se encontraron células con múltiples alteraciones de este tipo. Al comparar el número de células con ACE así como las ACE/célula entre los 4 grupos estudiados, sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas por medio de la prueba de  $\chi^2$  de proporciones.

Al tomar en cuenta los datos que se tienen en los cuestionarios de tamizaje tanto de los pacientes EH sin tratamiento como de los pacientes con tratamiento, no se encontró ninguna asociación entre los hábitos personales de cada paciente y la presencia de alteraciones cromosómicas estructurales.

Cuadro 9. Aberraciones cromosómicas estructurales

Código del Paciente	Alteraciones Cromosómicas Estructurales (ACE)					Células con *ACE	**ACE / célula
<b>Individuos Sanos</b>							
NL8-02						0	0
NL10-02						0	0
NL11-03						0	0
NL12-03						0	0
NL14-03						0	0
<b>Pacientes EH Pre-Tx</b>							
Pre-Tx35-04	7q- [3]					3	1
Pre-Tx39-04	21q- [15]					15	1
Pre-Tx45-04						0	0
Pre-Tx51-04						0	0
Pre-Tx52-04						0	0
<b>Pacientes EH con Tx / con espermatozoides</b>							
MOPP5-02						0	0
MOPP7-02	20p+ [1]					1	1
MOPP12-02	1p+, t(2;9)(¿;?) [1]					1	2
MOPP21-02	20p- [1]					1	1
MOPP23-02	+mar(pbe.21 o 22) [1]	+mar(pbe. y) [1]				2	1
<b>Pacientes EH con Tx / azoospermicos</b>							
MOPP9-02						0	0
MOPP22-02	2q+; 12q- [1]	t(1;13)(¿;?) [1]	Múltiples ACE [2]	11q- [1]	+mar (pbe.3) [1]	6	25
MOPP26-02	Múltiples ACE [8]	12q- [1]				9	61
MOPP41-04						0	0
MOPP43-04	+mar (pbe. 21 o 22) [1]					1	1

[ ] Número total de células con la misma alteración

\*Con diferencia estadísticamente significativa entre los 4 grupos ( $p < 0.02$   $\chi^2$  de proporciones)\*\* Con diferencia estadísticamente significativa entre los 4 grupos ( $p < 0.001$   $\chi^2$  de proporciones)

## 7. DISCUSION

### 7.1. Población de estudio

En este trabajo se analizó el efecto de la quimioterapia MOPP/ABVP con o sin radioterapia sobre la frecuencia de aneuploidías en linfocitos de sangre periférica de 10 pacientes con EH con tratamiento, 5 pacientes con EH sin tratamiento y 5 individuos sanos con una edad promedio de 20 años al momento del estudio (excepto un paciente con 16 años y otro con 52 años de edad) (Cuadros 1, 3 y 4a). Los dos grupos de pacientes EH que recibieron terapia anticáncer, tuvieron tratamientos homogéneos, todos recibieron los mismos fármacos y solo 2 pacientes no recibieron radioterapia (Cuadro 4a).

### 7.2. Frecuencia de aneuploidías

A pesar de los altos niveles de remisión que se obtienen con los tratamientos utilizados para los pacientes con EH, los efectos secundarios a dicho tratamiento son muy importantes, ya que tanto la radiación como la quimioterapia pueden producir a largo plazo, daño cromosómico, además de que se presenta un aumento en la aparición de leucemias y tumores sólidos (37, 38, 39). En este caso, el estudio se dirigió a la búsqueda de alteraciones cromosómicas numéricas, resultado del efecto genotóxico del tratamiento, ya que los fármacos administrados a este tipo de pacientes tienen

efectos mutagénicos y aneugénicos (18, 19, 20, 21, 26, 27, 28, 29); además, se tomó en cuenta que no se tienen reportes previos del efecto del esquema MOPP/ABVP con o sin radioterapia sobre el aumento en la frecuencia de aneuploidías, mediante el análisis directo de cromosomas con BG.

En este estudio, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de aneuploidías totales entre ninguno de los 3 grupos de pacientes, ni entre los individuos sanos (Cuadros 5 y 8 y Gráficas 1 y 2). Es importante resaltar que el grupo de pacientes con tratamiento y con producción de espermatozoides, tuvo los valores más altos de hipodiploidías y de hiperdiploidías, siendo diferente a lo esperado, ya que se podría suponer que los pacientes azoospermicos, quienes tienen un mayor daño a nivel de células madre germinales, debían tener una mayor frecuencia de aneuploidías en linfocitos (Cuadros 5 y 8).

Las metafases con ganancia de cromosomas se encontraron en los 3 grupos de pacientes pero en ninguno de los individuos sanos (Cuadro 8 y Gráfica 2); debido a esto sería necesario aumentar el grupo de estudio para observar si existen o no diferencias con respecto a sujetos normales y poder confirmar una relación entre la presencia de hiperdiploidías y el efecto del tratamiento sobre las células de pacientes tratados o con una elevada inestabilidad cromosómica propia de los pacientes con EH (39, 41, 42).

En ninguno de los estudios previos de detección de alteraciones cromosómicas en pacientes con EH tratados con quimioterapia con o sin radioterapia, han sido reportadas ganancias cromosómicas (37, 38, 39, 41).

En los individuos sanos, se tuvo un promedio de hipodiploidías de 2.5%, lo cual es alto en comparación con los valores obtenidos en los pacientes. La presencia de células aneuploides en individuos sanos ha sido reportada previamente en algunos estudios, donde en linfocitos de sangre periférica, se obtuvieron valores de hiperdiploidías de 0.1 a 4.17% y de hipodiploidías de 1.4 a 15.5% y se observó un incremento en las frecuencias con respecto a la edad de los individuos estudiados (42). Estos datos son semejantes a los reportados en otro estudio, donde analizan linfocitos de hombres sanos mediante la metodología de FISH para algunos autosomas y cromosomas sexuales y obtienen valores de hipodiploidías de 8.4% y de hiperdiploidías de 0.3% (43).

Es importante mencionar que un incremento en el número de células con pérdidas cromosómicas tanto en los individuos sanos como en los pacientes, puede deberse a dos causas principales no relacionadas con el efecto genotóxico del tratamiento:

1) problemas de la técnica al contar células rotas; lo cual se minimizó mediante una estricta metodología de criterios de análisis cromosómico. 2) en el caso de pacientes, debido a un incremento en la fragilidad celular, ocasionada por la misma enfermedad (42).

Las diferencias en la frecuencia de aneuploidías que se tienen entre los diferentes pacientes con tratamiento, puede deberse a procesos relacionados con variaciones interindividuales en la absorción y sensibilidad a las fármacos, debido a la expresión polimórfica de genes que afecten de manera directa el metabolismo del agente utilizado y en algunos de ellos a mayor eficiencia en los mecanismos de reparación (39, 44).

### 7.3. Clonas hipodiploides

De los 4 grupos estudiados, incluyendo el grupo de individuos sanos, los pacientes con EH sin tratamiento, tuvieron el menor número de clonas hipodiploides (Cuadro 6).

Tomando en cuenta las clonas hipodiploides obtenidas a partir de los valores basales de los 5 individuos sanos analizados, los cromosomas que se pierden con mayor frecuencia en todos los pacientes, son de diversos grupos cromosómicos que se pierden por azar. Los pacientes con EH sin tratamiento, al igual que los 2 grupos tratados, presentaron con mayor frecuencia, clonas hipodiploides para los cromosomas 7 y 10. Además, los pacientes con tratamiento, tanto con producción de espermatozoides como azoospermicos, tuvieron pérdidas de los cromosomas 3, 17, 19 y 20; en los pacientes tratados y con espermatozoides se presentaron clonas para el 13 y 21 y en los pacientes azoospermicos para el 12 y el cromosoma Y (Cuadro 6).

Es importante hacer notar que los cromosomas 13, 20, 21 y el Y, son los que se pierden mas frecuentemente en todos los grupos de pacientes. (Cuadro 6).

Además del efecto directo que pueden tener tanto los fármacos quimioterapéuticos como la radioterapia en la pérdida cromosómica, es importante tomar en cuenta que existen algunas características intrínsecas de la estructura de los cromosomas que podrían influir directamente en su segregación durante el proceso de división celular, entre las que se encuentran: longitud del cromosoma, posición y tamaño del centrómero, estructura de la cromatina y heterocromatina asociada (45, 46).

Los cromosomas acrocéntricos, se consideran blancos preferentes de agentes inductores de no-disyunción. Esto debido a que portan secuencias homólogas en los brazos cortos (DNA satélite, genes ribosomales: regiones de organizadores nucleolares), que pueden propiciar una mala segregación por una falla al momento de disolver su asociación nucleolar durante la división (47, 48).

Los cromosomas 21 y Y se pierden con frecuencia en los individuos estudiados, existen varios reportes donde estos cromosomas participan incrementando el porcentaje de hipodiploidías; en todos los casos el tamaño es un factor importante (46, 48, 49); otra característica que se puede tomar en cuenta para la pérdida de estos cromosomas, es la densidad génica y se ha reportado que las aneuploidías de cromosomas como el 13, 18, 21, X y del Y que son compatibles con la vida, se relaciona con que son cromosomas con pocos genes (50); con respecto al cromosoma Y, se ha reportado una

relación directa entre la pérdida de este cromosoma y la edad del individuo: ya que a mayor edad, se presenta un incremento en la frecuencia de pérdidas de cromosomas sexuales (51, 52); en todos los individuos analizados, esto no debe ser un factor que modifique los resultados, ya que se trata de un grupo con edades homogéneas (excepto el paciente pre-tx45-04).

Por otro lado, se podría pensar que las aneuploidías encontradas en este trabajo, pueden ser resultado directo del efecto de diversos fármacos, así como de la radioterapia, sobre estructuras cromosómicas y celulares responsables de la segregación cromosómica en los linfocitos estudiados. La acción directa de agentes aneugénicos puede darse por la unión de estos al huso mitótico, a tubulina centriolar y a regiones del centrómero y cinetocoro, afectando la función de los microtúbulos o de los centrosomas, lo que podría provocar la segregación anormal (45, 53, 54, 55), sin embargo, debido a que en este estudio, los pacientes fueron tratados hasta 20 años antes de la colección de la muestra, es poco probable que estos mecanismos directos afecten a los linfocitos que se están estudiando; la única vía por la que se podrían observar estos efectos, sería que estos hubiesen ocurrido en una célula madre hematopoyética que generara de manera continua linfocitos con aneuploidías y de esta manera formara clonas con la misma alteración cromosómica. Las mutaciones en diversos genes relacionados con procesos de división celular, como el gen de tubulina,

topoisomerasa II, mutaciones en proteínas como la pericentrina que induce defectos del huso y en proteínas de cohesión, desregulación de dineína y CENP-E, así como fallas durante el proceso de citocinesis pueden producir como resultado, aneuploidías (55). También existen factores relacionados con el ciclo celular que pueden verse afectados, entre ellos se encuentra la sobreexpresión de ciclina E que provoca una amplificación de centrosomas; la presencia de formas mutantes de p53, relacionadas con modificaciones en los mecanismos de separación de las cromátidas lo que puede también dar como resultado la generación de células aneuploides a largo plazo, sin generar necesariamente clones, por lo que estas mutaciones podrían ser el tipo de mecanismo involucrado en la generación de aneuploidías en los linfocitos de sobrevivientes a EH (45,56).

La radiación es un conocido clastógeno, pero también puede producir aneuploidía. A dosis de 0.5, 1 y 2 Gy se inducen pérdidas cromosómicas y no-disyunción. La posible interacción de la radiación ionizante con el huso puede ser directa, dañando estructuras del cromosoma necesarias para una disyunción normal y alterando la actividad o expresión de la topoisomerasa II o de manera indirecta por medio de los radicales libres que se forman durante la reacción, alterando los puentes disulfuro, importantes para un apropiado ensamblaje del mismo (57,58). Se ha observado que las células expuestas a radiación, pueden presentar mutaciones génicas y aberraciones

cromosómicas, que pueden persistir a través de varias generaciones celulares (más de un año), dando como resultado un aumento en la frecuencia de estas alteraciones en la progenie de células irradiadas, aunque el mecanismo de persistencia de dicha inestabilidad, aún no está totalmente comprendido (58).

#### 7.4. Aberraciones cromosómicas estructurales (ACE)

Durante el análisis cromosómico realizado en este trabajo, además de las aneuploidías, se encontraron alteraciones estructurales. Es importante hacer notar que estas se presentaron en los 3 grupos de pacientes y en ningún individuo sano (Cuadro 9).

Las alteraciones que se encontraron en los pacientes EH sin tratamiento, son las aberraciones propias de la enfermedad (10) y probablemente estas células, irán desapareciendo durante el transcurso del tratamiento, que como se sabe es muy efectivo en este tipo de pacientes. Lo importante para este grupo, sería el análisis cromosómico longitudinal al iniciar la terapia, al terminar y después del tratamiento para tener un seguimiento de las alteraciones que van apareciendo como resultado directo de dicho tratamiento.

En los pacientes con tratamiento y con espermatozoides, 4 de 5 pacientes tuvieron ACE; en dos de ellos (MOPP7-02 y MOPP21-02), hubo alteraciones en el brazo corto del cromosoma 20; un paciente tuvo alteraciones de los cromosomas 1, 2 y 9 y en otro se encontraron marcadores cromosómicos (Cuadro 9).

Los pacientes azoospermicos, presentaron el mayor número de ACE: 2 pacientes tuvieron varias células con múltiples alteraciones de tipo estructural y en uno se encontró un cromosoma marcador (Cuadro 9).

Se ha observado en estudios previos en pacientes tratados para EH que el uso de agentes alquilantes como adriamicina y bleomicina, además de la radioterapia, incrementan de manera significativa la frecuencia de alteraciones estructurales, entre las que se encuentran: translocaciones recíprocas, rupturas, fragmentos céntricos y acéntricos y anillos (27, 37, 38, 39, 41, 59, 60); se han reportado, rearrreglos estructurales para los cromosomas 1 y 2q, así como marcadores cromosómicos (61, 62); es importante hacer notar que varias de estas alteraciones, coinciden con las encontradas en algunos de nuestros pacientes. Algunas alteraciones cromosómicas, como anillos, marcadores y rearrreglos con participación de los cromosomas 1 y 2 han sido reportados en leucemia secundaria al tratamiento antineoplásico en pacientes con EH (61, 62).

Con respecto a las translocaciones, se sabe que son aberraciones cromosómicas estables que pueden ser detectadas muchos años después de la exposición a radiación y quimioterapia; existe un estudio en pacientes con EH donde este tipo de aberraciones, fueron encontradas 12 a 24 años después del tratamiento.

La detección de translocaciones en linfocitos de sangre periférica varios años después de la terapia, sugiere que la radiación y la quimioterapia inducen daño permanente en las células madre de la médula ósea de estos pacientes (60).

Por otro lado, existen estimaciones en años, de la vida media de linfocitos con alteraciones cromosómicas de tipo inestable, la cual puede depender de la dosis de radiación, de los agentes quimioterapéuticos y del periodo de seguimiento; hay estudios en los que pacientes con EH, presentaron estas alteraciones, 16 años después o más de haber alcanzado la remisión. La explicación, es que estos linfocitos se pudieron haber originado de células hematopoyéticas precursoras aberrantes que aportan continuamente a la circulación células alteradas (41). Como consecuencia de todos estos rearrreglos, principalmente de las translocaciones y las deleciones, se puede promover el que oncogenes y genes supresores de tumor queden fuera del control normal de la célula, lo que podría favorecer el desarrollo de cáncer secundario al tratamiento (37, 60).

## 8. CONCLUSIONES

- En este estudio, como resultado del tratamiento antineoplásico, no se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de aneuploidías totales entre cada uno de los grupos estudiados.
- Un dato importante, fue la presencia de células con ganancias cromosómicas y células con alteraciones cromosómicas estructurales, que se encontraron únicamente en los pacientes y no en los individuos sanos y a pesar de que en ninguno de estos pacientes se presentaron aberraciones clonales, su presencia indica una inestabilidad cromosómica inducida por la terapia, que posteriormente podría convertirse en un evento inicial para la aparición de cáncer secundario (41).
- Por otra parte, es importante el hecho de que todos estos pacientes fueron tratados en promedio hace más de 10 años (excepto MOPP26-03), y aún presentan alteraciones cromosómicas que pueden estar relacionadas directamente con el tratamiento, lo que indica que el daño se produjo en las células madre, a partir de las cuales se originaron las poblaciones celulares actualmente estudiadas (60).

### 8.1. Comentarios finales

Esto abre la posibilidad de un seguimiento para el paciente desde el inicio del tratamiento, considerando la gran posibilidad que existe de que presenten sobre todo, aberraciones estructurales que pueden relacionarse posteriormente con el desarrollo de segundas neoplasias. De esta manera, se podrían encontrar marcadores que se asocien con el riesgo incrementado que tienen de presentar cánceres secundarios.

## Anexo 1

### Carta de consentimiento informado

Fecha \_\_\_\_\_

Nombre \_\_\_\_\_

Edad \_\_\_\_\_

1. El que suscribe voluntariamente acepto donar muestra de 10 ml de sangre periférica.
2. Mi participación en este estudio no implica ningún tratamiento médico.
3. Se me ha informado que las muestras donadas se usarán para realizar investigación. Se determinará el número y el tipo de anomalías cromosómicas que se encuentren en las células de las muestras.  
La Dra. Sara Frías Vázquez será la responsable de la investigación y de que las muestras y la información que estoy aportando se manejen de manera confidencial; se responsabiliza de que las muestras se manejen codificadas (sin saber el nombre) y que si se utilizan en futuras investigaciones o publicaciones siempre se mantendrá el anonimato.
4. Entiendo que este estudio puede no tener beneficios directos para mí, pero puede contribuir al conocimiento de los efectos que tiene la exposición a medicamentos para tratar el cáncer.
5. Se me ha informado que se me entregará una copia de esta carta de consentimiento y que en cualquier momento puedo retirarme del estudio sin que esto repercuta en mi atención médica.

Firma y nombre del donador

---

Firma y nombre del testigo

---

Responsable del proyecto

Dra. Sara Frías Vázquez \_\_\_\_\_

## Anexo 2

### Cuestionario de Tamizaje

Fecha\_\_\_\_\_ Nombre del Paciente\_\_\_\_\_

Edad\_\_\_\_\_

1. Fuma? Si\_\_\_\_\_ No\_\_\_\_\_

Cuantos cigarrillos por día en los últimos 6 meses\_\_\_\_\_

Consumo drogas? Si\_\_\_\_\_ No\_\_\_\_\_

Especifique \_\_\_\_\_

2. Ha tenido fiebre de mas de 38°C en los últimos 6 meses?

Si\_\_\_\_\_ No\_\_\_\_\_

3. Que enfermedades ha tenido en los últimos 3 meses\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

4. Tiene vasectomía? Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

5. Ha padecido o se le ha practicado:

a) Testículos no descendidos? Si\_\_\_\_\_ No\_\_\_\_\_

b) Varicocele (venas varicosas en escroto)? Si\_\_\_\_\_ No\_\_\_\_\_

c) Otra enfermedad urinaria o genital? Si\_\_\_\_\_ No\_\_\_\_\_

Especifique\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

d) Alguna enfermedad endócrina u hormonal? Si\_\_\_\_\_ No\_\_\_\_\_

Especifique\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

e) Cancer Si\_\_\_\_\_ No\_\_\_\_\_

Especifique:

Tipo\_\_\_\_\_

Quimioterapia\_\_\_\_\_

Radioterapia\_\_\_\_\_

6. Se ha tomado radiografías, o practicado algún examen que involucre radiación en los últimos 3 meses? Si\_\_\_\_\_ No\_\_\_\_\_

7. Se ha practicado un examen de semen antes? Si\_\_\_\_\_ No\_\_\_\_\_

Especifique la razón \_\_\_\_\_

8. Tiene algún problema de fertilidad? Si\_\_\_\_\_ No\_\_\_\_\_

Especifique\_\_\_\_\_

9. Se le ha hecho una transfusión sanguínea en los últimos 3 meses?

Si\_\_\_\_\_ No\_\_\_\_\_

Criterios de exclusión de acuerdo al cuestionario de tamizaje.

Pregunta

1. Si fuma mas de 10 cigarrillos al día, o consume drogas, se excluye
2. Si es positiva, esperar 3 meses para tomar muestras.
3. Si ha tenido enfermedades virales y/o de transmisión sexual en los últimos 3 meses, esperar para tomar muestra. En caso de SIDA, se excluye
4. Afirmativo, se excluye
5. Afirmativo, se excluye (excepción de los pacientes con EH, pero un EH con cáncer secundario se excluye también).
6. Afirmativo, esperar para tomar muestra.
- 7 y 8. Si se sospecha de alguna enfermedad de origen cromosómico, se excluye.
9. Afirmativo, esperar para tomar muestra.

## Cuestionario principal

Por favor contesta las siguientes preguntas:

1. Fecha

2. Fecha de Nacimiento

3. Peso del paciente \_\_\_\_kgs

4. Talla del paciente \_\_\_\_mts

5. Estado Civil  
 soltero  
 casado  
 unión libre  
 separado  
 divorciado  
 viudo

6. Ha estado en contacto con algún agente químico o radioactivo en los últimos 3 meses?

Si\_\_\_\_\_ No\_\_\_\_\_

Con cuáles agentes ha tenido contacto? \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

7. Fuma regularmente? Si\_\_\_\_\_ No\_\_\_\_\_

Anota el número promedio de cigarrros por día, fumados durante los últimos 5 años:

\_\_\_\_\_

8. Toma bebidas alcohólicas regularmente Si\_\_\_\_\_ No\_\_\_\_\_

Anota la cantidad promedio de bebidas alcohólicas que ha consumido por semana en los últimos 5 años: \_\_\_\_\_

1 vaso de vino= 110 ml  
1 vaso de cerveza= 330 ml  
1 vaso de licor= 35 ml

9. Tomas bebidas que contienen cafeína Si\_\_\_\_\_ No\_\_\_\_\_

10. Ha presentado alguna (s) de las siguientes enfermedades?

Testículos sin descender al nacimiento Si\_\_\_\_\_ No\_\_\_\_\_

Varicocele Si\_\_\_\_\_ No\_\_\_\_\_

Fimosis Si\_\_\_\_\_ No\_\_\_\_\_

Infección de vías urinarias Si\_\_\_\_\_ No\_\_\_\_\_

Enfermedades de transmisión sexual Si\_\_\_\_\_ No\_\_\_\_\_

Paperas Si\_\_\_\_\_ No\_\_\_\_\_

Al presentar paperas, tuvo inflamación dolorosa de los testículos?

Si\_\_\_\_\_ No\_\_\_\_\_

Secreción anormal por el pene Si\_\_\_\_\_ No\_\_\_\_\_

Sensación de ardor al orinar Si\_\_\_\_\_ No\_\_\_\_\_

Dolor severo o hinchazón de los testículos que requirió tratamiento médico

Si\_\_\_\_\_ No\_\_\_\_\_

11. Ha tratado por mas de 12 meses de concebir un hijo?

Si, en los últimos 12 meses\_\_\_\_\_

Si, antes de los últimos 12 meses\_\_\_\_\_

Cuándo? \_\_\_\_\_

No\_\_\_\_\_

12. Durante los últimos 3 meses, cuántas veces ha eyaculado?

\_\_\_\_\_ veces por mes.

13. Además de enfermedad de Hodgkin, qué enfermedades ha padecido?

Diabetes Si\_\_\_\_\_ No\_\_\_\_\_

Trastornos de la tiroides Si\_\_\_\_\_ No\_\_\_\_\_

Hepatitis Si\_\_\_\_\_ No\_\_\_\_\_

Convulsiones / epilepsia Si\_\_\_\_ No\_\_\_\_

14. Ha tomado algún medicamento durante los últimos 3 meses

Si\_\_\_\_ No\_\_\_\_

Menciona que medicamentos	Motivo	Cuántos días
a)_____	_____	_____
b)_____	_____	_____
c)_____	_____	_____
d)_____	_____	_____

15. En los últimos 3 meses se le ha practicado algún estudio radiológico?

Si\_\_\_\_ No\_\_\_\_

Qué tipo de examen \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

16. Algún familiar nació con algún defecto o enfermedad hereditaria?

Si\_\_\_\_ No\_\_\_\_

Cuál? \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

17. Anota la cantidad promedio de bebidas alcohólicas que ha consumido por semana en los últimos 5 años \_\_\_\_\_

1 taza de café= 6 oz.

18. Ha presentado fiebre de mas de 38°C en los últimos 3 meses?

Si\_\_\_\_ No\_\_\_\_

Hace cuanto tiempo se presentó la fiebre \_\_\_\_\_días.

19. Durante los últimos 3 meses, cuántas horas a la semana en promedio, utilizó moto o bicicleta? \_\_\_\_\_horas/semana

20. Durante los últimos 3 meses, cuántas horas al día en promedio, manejó un vehículo de motor? \_\_\_\_\_horas/día

21. Qué tipo de ropa interior utilizó en los últimos 3 meses?

\_\_\_\_\_ boxer

\_\_\_\_\_ pants

\_\_\_\_\_ ninguna

\_\_\_\_\_ otras (especifique)

22. Durante los últimos 3 meses ha usado sauna o baños de tina?

Si\_\_\_\_\_ No\_\_\_\_\_

Cuántas veces al mes? \_\_\_\_\_

Cuánto ha durado en promedio? \_\_\_\_\_

## 9. REFERENCIAS

1. Diehl V, Stein H, Hummel M, Zollinger R y Connors JM (2003). Hodgkin's lymphoma: Biology and treatment strategies for primary, refractory and relapsed disease. *Hematology* 2: 225-247.
2. Santoro A y Viviani S. Hodgkin's disease (1993) en: Cuitkovic E, Droz JP, Armand JP y Khovry S. *Handbook of chemotherapy in clinical oncology*, segunda edición. Rhone-Poulenc Rorer, Scientific Communication International Ltd, París, pp.695-701.
3. Magrath IT, Johnson JF. Lymphoma in children (1993) en: Cuitkovic E, Droz JP, Armand JP y Khovry S. *Handbook of chemotherapy in clinical oncology*, segunda edición. Rhone-Poulenc Rorer, Scientific Communication International Ltd, París, pp.702-715.
4. Hudson MM y Donaldson SS (1997). Hodgkin's disease. *Pediatr Clin North Am* 44: 891-906.
5. Pao WJ y Kun LE (1989). Hodgkin's disease in children. *Hematol/Oncol Clin North Am* 3: 345-363.
6. Yung L y Linch D (2003). Hodgkin's lymphoma. *Lancet* 361: 943-951.
7. Rivera luna R (1994). *Diagnóstico del niño con cáncer*, Mosby/Doyma libros. Madrid, pp.143-149.
8. Harris NL (1999). Hodgkin's lymphoma: classification, diagnosis and grading. *Semin Hematol* 36: 220-232.

9. Mesa J-RC, Espinosa EM, Hernández CP, Losada RB, Plasencia AT y Hernández PR (1999). Enfermedad de Hodgkin: nuevos conceptos clínico-patológicos. Rev Cub Inmun Hemoter 16: 21-29.
10. Harrison CJ (2001). The lymphomas and chronic lymphoid leukaemias en: Rooney DE. Human cytogenetics malignancy and acquired abnormalities, tercera edición. Practical approach, USA pp.101.
11. Thomson AB y Wallace WHB (2002). Treatment of paediatric Hodgkin's disease: a balance of risks. Eur J Cancer 38: 468-477.
12. Connors JM, Noordijk EM y Horning SJ (2001). Hodgkin's lymphoma: basing the treatment on the evidence. Hematology 2: 178-193.
13. Hudson MM y Donaldson SS (1999). Treatment of pediatric Hodgkin's lymphoma. Semin Hematol 36: 313-323.
14. Advani RH y Horning SJ (1999). Treatment of early-stage Hodgkin's disease. Semin Hematol 36: 270-281.
15. Ng AK y Mauch PM (1999). Radiation therapy in Hodgkin's lymphoma. Semin Hematol 36: 290-302.
16. Witt KL y Bishop JB (1996). Mutagenicity of anticancer drugs in mammalian germ cells. Mutat Res 355: 209-234.

17. Frías S. Consecuencias genéticas del tratamiento antineoplásico en células germinales de pacientes con cáncer (2002) en: Rivera Luna R. Oncología pediátrica: conceptos básicos y clínicos. Intersistemas S.A. de C.V. México, pp.279-302.
18. Balis MF, Holcenberg JS y Poplack DG. General principles of chemotherapy (1993) en: Pizzo PA y Poplack DG. Principles and practice of pediatric oncology. Segunda edición. JB Lippincott, Philadelphia, pp. 203-245.
19. Vassal G. Alkylating agents: cyclophosphamide, ifosfamide, melphalan, thiotepa, chlorambucil, busulfan (1993) en: Cuitkovic E, Droz JP, Armand JP y Khovry S. Handbook of chemotherapy in clinical oncology, segunda edición. Rhone-Poulenc Rorer, Scientific Communication International Ltd, París, pp.221-232.
20. Pouillart P. Vincristine (1993) en: Cuitkovic E, Droz JP, Armand JP y Khovry S. Handbook of chemotherapy in clinical oncology, segunda edición. Rhone-Poulenc Rorer, Scientific Communication International Ltd, París, pp.309-311.
21. De Braud F y Bajetta E. Procarbazine (1993) en: Cuitkovic E, Droz JP, Armand JP y Khovry S. Handbook of chemotherapy in clinical oncology, segunda edición. Rhone-Poulenc Rorer, Scientific Communication International Ltd, París, pp.240-241.
22. Witt KL y Bishop JB (1993). Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis. Eur Urol 23: 136-142.

23. Shelby MD, Bishop JB, Mason JM y Tindal KR (1993). Fertility, reproduction, and genetic disease: studies on the mutagenic effects on environmental agents on mammalian germ cells. *Environm Health Persp.* 100: 283-291
24. Lares-Asseff I. Agentes antineoplásicos (2002) en: Rivera-Luna R. *Oncología pediátrica: Conceptos básicos y clínicos*, primera edición. Intersistemas S.A. de C.V., México, pp. 33-62.
25. Muggia FM, Chachoua A y Hoschster M. Doxorubicin (1993) en: Cuitkovic E, Droz JP, Armand JP y Khovry S. *Handbook of chemotherapy in clinical oncology*, segunda edición. Rhone-Poulenc Rorer, Scientific Communication International Ltd, París, pp.277-280.
26. Sikic BI. Bleomycin (1993) en: Cuitkovic E, Droz JP, Armand JP y Khovry S. *Handbook of chemotherapy in clinical oncology*, segunda edición. Rhone-Poulenc Rorer, Scientific Communication International Ltd, París, pp.296-298.
27. Seitz DE y Loehrer PJ. Vinblastine (1993) en: Cuitkovic E, Droz JP, Armand JP y Khovry S. *Handbook of chemotherapy in clinical oncology*, segunda edición. Rhone-Poulenc Rorer, Scientific Communication International Ltd, París, pp.312-314.
28. Chollet P. Dacarbazine (1993) en: Cuitkovic E, Droz JP, Armand JP y Khovry S. *Handbook of chemotherapy in clinical oncology*, segunda edición. Rhone-Poulenc Rorer, Scientific Communication International Ltd, París, pp.236-239.
29. Engert A, Wolf J y Diehl V (1999). Treatment of advanced Hodgkin's lymphoma: standard and experimental approaches. *Semin Hematol* 36: 282-289.

30. Jenkin D, Greenberg M y Fitzgerald A (1996). Second malignant tumours in childhood Hodgkin's disease. *Med Pediatr Oncol* 26: 373-379.
31. Hudson MM, Poquette CA, Lee J, Greenwald CA, Shah A, Luo X, Thompson EI, Williams JA, Kun LE y Crist WM. (1998). Increased mortality after successful treatment for Hodgkin's disease. *J Clin Oncol* 16: 3592-3600.
32. Linch DC, Gosden RG, Tulandi T, Tan S-L y Hancock SL (2000). Hodgkin's lymphoma: choice of therapy and late complications. *Hematology* 3: 205-221.
33. Tura S, Fiacchini M, Zinzani PL, Brusamolino E y Gobbi PG (1993). Splenectomy and the increasing risk of secondary acute leukemia in Hodgkin's disease. *J Clin Oncol* 11:925-930.
34. Gyger M, Forest L, Vuong TE, Perreault C, Lavallee C, Lacombe M, Boileau J y D'Ángelo G (1984). Therapy-induced preleukaemia in patients treated for Hodgkin's lymphoma: clinical and therapeutic relevance of sequential chromosome banding studies. *Br J Haematol* 58: 61-69.
35. Van Leeuwen FE, Klokman WJ, Van't Veer MB, Hagenbeek A, Krol ADG, Vetter UAO, Schaapveld M, van Heerde P, Burgers JMV, Somers R y Aleman BMP (2000). Long-term risk of second malignancy in survivors of Hodgkin's disease treated during adolescence or young adulthood. *J Clin Oncol* 18: 487-497.
36. Abrahamsen AF, Andersen A, Nome O, Jacobsen AB, Holte H, Abrahamsen JF y Kvaloy S (2002). Long-term risk of second malignancy after treatment of Hodgkin's disease: the influence of treatment, age and follow-up time. *Ann Oncol* 13: 1786-1791.

37. Bilban-Jakopin C y Bilban M. (2001). Genotoxic effects of radiotherapy and chemotherapy on circulating lymphocytes in patients with Hodgkin's disease. *Mutat Res* 497: 81-88.
38. Lalic H, Radosevic B y Volavsek C. (2001). High incidence of chromosome aberrations after radio-chemotherapy for Hodgkin's disease: A report of a case and a review of the literature. *Fol Biol* 47: 101-105.
39. M'Kacher R, Girinsky T, Koscielny S, Dossou J, Violot D, Beron-Gillard N, Ribrag V, Bourhis J, Bernheim A, Parmentier C y Carde P (2003). Baseline and treatment-induced chromosomal abnormalities in peripheral blood lymphocytes of Hodgkin's lymphoma patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 57: 321-326.
40. Anastasi J, Le Beau M, Vardiman J y Westbrook C (1990). Detection of numerical chromosomal abnormalities in neoplastic hematopoietic cells by in situ hybridization with a chromosome-specific probe. *Am J Pathol* 136: 131-139.
41. Ryabchenko N, Nasanova V, Antoschina M, Fesenko E, Kondrashova T, Ivanova T, Pavlov V, Ryabikhina N y Terekhova A (2003). Persistence of chromosome aberrations in peripheral lymphocytes from Hodgkin's lymphoma remission patients. *Int J Radiat Biol* 79: 251-257.
42. Cimino MC, Tice RR y Liang JC (1986). Aneuploidy in mammalian cells in vivo. *Mutat Res* 167: 107-122.

43. Eastmond DA y Pinkel D. (1990). Detection of aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence in situ hybridization with chromosome-specific DNA probes. *Mutat Res* 234: 303-318.
44. Leopardi P, Marcon F, Dobrowolny G, Zijno A y Crebelli R (2002). Influence of donor age on vinblastine-induced chromosome malsegregation in cultured peripheral lymphocytes. *Mutagenesis* 17: 83-88.
45. Parry EM, Parry JM, Corso C, Doherty A, Haddad F, Hermine TF, Johnson G, Kayani M, Quick E, Warr T y Williamson J (2002). Detection and characterization of mechanisms of action of aneugenic chemicals. *Mutagenesis* 17: 509-521.
46. Hassold T, Abruzzo M, Adkins K, Griffin D, Merrill M, Millie E, Saker D, Shen J y Zaragoza M (1996). Human aneuploidy: incidence, origin and etiology. *Environ Mol Mut* 28: 167-175.
47. Reis Soares S, Vidal F, Bosch M, Martínez-Pasarell O, Nogué C, Egozcue J y Templado C (2001). Acrocentric chromosome disomy is increased in spermatozoa from fathers of Turner syndrome patients. *Hum Genet* 108: 499-503.
48. Galloway SM y Buckton KE (1978). Aneuploidy and ageing: chromosome studies on a random sample of the population using G-banding. *Cytogenet cell Genet* 20:78-95.
49. Frias S, Ramos S, Molina B, Del Castillo V y Mayén DG (2002). Detection of mosaicism in lymphocytes of parents of free trisomy 21 offspring. *Mutat Res* 520: 25-37.

50. Puerto S, Surralles J, Ramirez MJ, Creus A y Marcos R (2002). Equal induction and persistence of chromosome aberrations involving chromosomes with heterogeneous lengths and gene densities. *Cytogenet Cell Genet* 87: 62-68.
51. Catalán J, Surrallés J, Falck G C.-M., Autio K y Norppa M (2000). Segregation of sex chromosomes in human lymphocytes. *Mutagenesis* 15: 251-255.
52. Carere A, Antoccia A, Cimini D, Crebelli R, Degrassi F, Leopardi P, Marcon F, Sgura A, Tanzarella C y Zijno A (1999). Analysis of chromosome loss and non-disjunction in cytokinesis-blocked lymphocytes of 24 male subjects. *Mutagenesis* 14: 491-496.
53. Elhajouji A, Tibaldi F y Kirsch-Volders M (1997). Indication for thresholds of chromosome non-disjunction versus chromosome lagging induced by spindle inhibitors *in vitro* in human lymphocytes. *Mutagenesis* 12: 133-140.
54. Pathak S, Multani AS, Furlong CL y Sohn SH (2002). Telomere dynamics,aneuploidy,stem cells and cancer (review). *Int J Oncol* 20: 637-641.
55. Pihan GA y Doxsey SJ (1999). The mitotic machinery as a source of genetic instability in cancer. *Semin Cancer Biol* 9: 289-302.
56. Parry JM, Al-Obaidly A, Al-Walhaib M, Kayani M, Nabeel T, Strefford J y Parry EM (2002). Spontaneous and induced aneuploidy, considerations which may influence chromosome malsegregation. *Mutat Res* 504: 119-129.
57. Touil N, Elhajouji A, Thierens H y Kirsch-Volders M (2000). Analysis of chromosome loss and chromosome segregation in cytokinesis-blocked human lymphocytes: non-disjunction is the prevalent mistake in chromosome segregation produced by low dose exposure to ionizing radiation. *Mutagenesis* 15: 1-7.

58. Wright EG (1999). Inherited and inducible chromosomal instability : A fragile bridge between genome integrity mechanisms and tumorigenesis. *J Pathol* 187: 19-27.
59. Aly MS, Othman OE y El Nahas SM (1999). Specific numerical chromosomal aberrations induced by adriamycin. *Environm Mol Mutagen* 33: 161-166.
60. Smith LM, Evans JW, Mori M y Brown JM (1992). The frequency of translocations after treatment for Hodgkin`s disease. *Int J Rad Oncol Biol Phys* 24: 737-742.
61. Papa G, Mauro FR, Anselmo AP, Cimino G, Alimena G, Amadori S, D'Arcangelo E, Giannarelli D, Bosi A, Bellesi G, Fiacchini M, Mazza P, Babini L, Emiliani E, Maurizi Enrici R y Biagini C (1984). Acute leukaemia in patients treated for Hodgkin's disease. *Br J Haematol* 58: 43-52.
62. Rowley JD, Golomb HM y Vardiman JW (1981). Nonrandom chromosome abnormalities in acute leukemia and dysmyelopoietic syndromes in patients with previously treated malignant disease. *Blood* 58: 759-767.