



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

**“DETECCIÓN DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS EN PACIENTES  
CON ENFERMEDAD DE HODGKIN TRATADOS CON  
QUIMIOTERAPIA ABVD POR MEDIO DE M-FISH”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

**MARÍA DEL PILAR NAVARRETE MENESES**



**MÉXICO, D.F.**

**2009**



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.

**JURADO ASIGNADO:**

<b>PRESIDENTE:</b>	Profesor:	Alicia Beatriz Cervantes Peredo
<b>VOCAL:</b>	Profesor:	José Ignacio Páramo Ramírez
<b>SECRETARIO:</b>	Profesor:	Sandra Elena Ramos Ángeles
<b>1er SUPLENTE:</b>	Profesor:	María Elena Bravo Gómez
<b>2° SUPLENTE:</b>	Profesor:	León Patricio Martínez Castilla

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Citogenética, Instituto Nacional de Pediatría

Asesor del tema:

---

**M en C Sandra Elena Ramos Ángeles**

Sustentante:

---

**María del Pilar Navarrete Meneses**

Dedicado a mis padres, Laura y Tomás.  
Los amo

## MUCHAS GRACIAS:

A Dios, por hacerlo posible

A Sergio, el Caballero de mi vida

A Diani, mi hermanita y gran amiga

A Sr T por hacernos tan felices

- A mi familia, por su apoyo y amor.
- A mis amigos, por su alegría y cariño.
- A la UNAM por abrirme las puertas.
- A la M en C Sandra Ramos, por ser una gran maestra y amiga.
- A la Dra Sara Frías, a la M en C Bertha Molina y al Laboratorio de Citogenética (INP) por su confianza y por permitirme ser parte de su excelente equipo de trabajo.
- A la M en C Consuelo Salas por su asesoría.
- A mis profesores Alicia C e Ignacio P por sus consejos y asesoría

Este trabajo forma parte del proyecto de investigación:

“Efectos genotóxicos secundarios al tratamiento  
antineoplásico en supervivientes con Enfermedad de  
Hodgkin” (CONACYT-099)

# ÍNDICE

## 1. MARCO TEÓRICO

Generalidades de la Enfermedad de Hodgkin.....	1
Clasificación.....	2
Diagnóstico.....	4
Estadificación.....	5
Tratamiento.....	6
ABVD/radioterapia.....	8
Consecuencias debidas a la terapia.....	12
FISH multicolor. MFISH.....	13

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... 17

## 3. OBJETIVO..... 18

## 4. HIPÓTESIS..... 18

## 5. DISEÑO EXPERIMENTAL

5.1 Población de estudio.....	19
5.2 Metodología.....	21

## 6. RESULTADOS..... 26

6.1 Frecuencia de aberraciones numéricas y estructurales.....	40
6.2 Frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales por paciente.....	41
6.3 Tipo de alteraciones estructurales encontradas.....	43
6.4 Análisis de alteraciones estructurales (estables e inestables) por cromosoma.....	45
6.5 Análisis estadístico.....	47

<b>7. DISCUSIÓN</b> .....	52
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	66
<b>9. REFERENCIAS</b> .....	67

## **ANEXOS**

I. Combinación de fluorocromos empleados para cada cromosoma en M-FISH.....	78
II. Carta de consentimiento informado.....	79
III. Cuestionario de tamizaje.....	80
IV. Criterios de exclusión de acuerdo al anexo III.....	83
V. Cuestionario general.....	85
VI. Reactivos, material y equipo.....	88
VII. Preparación de soluciones.....	89
VIII. Abreviaturas.....	91



---

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 *Generalidades de la Enfermedad de Hodgkin*

Fue en 1661 cuando Malpighi, basado en observaciones macroscópicas, hizo una primera descripción del linfoma de Hodgkin (LH), sin embargo, fue hasta 1832 que Thomas Hodgkin lo describió clínica y patológicamente **(1,2)**. Años después, en 1898 con Sternberg y en 1902 con Reed, se realizó una descripción histológica y se logró la identificación de una célula específica de la enfermedad: la célula de Reed Sternberg **(1)**.

Actualmente, la Enfermedad de Hodgkin (EH) se define como una neoplasia del tejido linfoide caracterizada generalmente por la presencia de células malignas de Reed Sternberg (RS) **(3)**. Las cuales son células de 15-45µm que presentan núcleos múltiples y gran cantidad de citoplasma, además de estar rodeadas por linfocitos reactivos **(2,4,5)**.

Determinar el origen de las células RS ha resultado difícil ya que se encuentran en bajo porcentaje, sin embargo se ha establecido que estas células monoclonales se derivan del centro germinal de linfocitos B **(5,6)**. Se ha observado que estas células escapan al proceso apoptótico debido a la expresión constitutiva de factores de transcripción como *NFκB*, *STAT3*, *JUNB* y *NOTCH1* **(5,7)**.

Además, se ha reportado que las células RS sobreexpresan *BCL2* y tienen una menor expresión de CD20 en pacientes en que no hubo respuesta al tratamiento. Por lo que se ha considerado que estos marcadores pudieran ayudar a definir la respuesta al tratamiento **(8)**.

---

Por otro lado, se ha reportado que las células de RS generalmente presentan cariotipos hiperploides complejos e inestables. Aunque no se ha definido una alteración característica de la EH se ha observado con mayor frecuencia alteraciones que involucran a los cromosomas: 1,2,5,6,7,11,12,14,17 y 19 **(7,9,10)**.

La EH se ha relacionado con la infección por el virus Epstein-Barr, ya que en 40% de los casos se ha observado evidencia del virus en las células RS **(2,4,5,6)**.

El linfoma de Hodgkin presenta una incidencia mundial de dos a cuatro casos por cada 100 000 individuos al año. Se presenta mayormente en hombres que en mujeres (2:1). Representa alrededor del 5% de los cánceres infantiles y es el tipo de cáncer más común en adolescentes (15 a 19 años) **(11)**.

En países en vías de desarrollo, como México, la EH tiene una distribución bimodal, presentando un primer pico mayor alrededor de los 20 años y un segundo menor alrededor de los 60. Particularmente en el Instituto Nacional de Pediatría, esta enfermedad ocupa el cuarto lugar en incidencia con respecto a otras neoplasias **(1,2)**.

## *1.2 Clasificación*

La REAL (Revised European American Lymphoma) junto con la OMS reconocen dos tipos principales de EH: Enfermedad de Hodgkin clásica (EHc) y Enfermedad de Hodgkin con predominio linfocítico nodular (EHpln) **(11)**.

---

Así mismo, la OMS (1999) ha subdividido la EH clásica en cuatro grupos: esclerosis nodular (EN), celularidad mixta (CM), depleción linfocítica (DL), y EH clásica rica en linfocitos o predominio linfocítico (PL) **(5,11)**. Esta subdivisión se realizó en base a la clasificación histológica de Rye, 1966: **(1,2,3,4)**

- o EH PL: la estructura del ganglio linfático puede estar parcial o totalmente destruida, raramente se encuentran células RS. Habitualmente se presenta en niños y adultos jóvenes como enfermedad localizada.
- o EH CM: el ganglio linfático está infiltrado, existen abundantes células RS y hay focos de fibrosis y necrosis. Esta variedad es la más frecuente y se presenta en jóvenes.
- o EH EN: afecta ganglios cervicales y mediastínicos, las células de RS generalmente adoptan morfología lacunar. Afecta mayormente a mujeres.
- o EH DL: Es la variante más agresiva. Presenta abundantes células de RS y escasos linfocitos. Es más frecuente en adultos y ancianos, generalmente está diseminado e infiltra huesos y médula ósea.

En el año 2008 la OMS estableció una variante más, el linfoma de células B largas/linfoma de Hodgkin clásico, que se caracteriza por presentar rasgos de ambas enfermedades por lo que los pacientes que lo presentan no pueden ser clasificados en una o en otra y deben ser incluidos en esta categoría **(12)**.

No se ha demostrado que esta clasificación o sus variantes tengan un impacto pronóstico en la supervivencia ni en la respuesta al tratamiento **(2)**.

---

### *1.3 Diagnóstico*

Cuando existe sospecha diagnóstica de EH, inicialmente se realiza radiografía de tórax, biometría hemática y biopsia ganglionar **(2,3,13)**. Posteriormente se realiza tomografía computarizada y/o resonancia magnética nuclear para obtener información adicional acerca de las infiltraciones ganglionares. La laparotomía puede ser utilizada para la estadificación de la enfermedad pero, no se ha demostrado un beneficio adicional para la sobrevida **(14,15)**.

Adicionalmente, el diagnóstico de EH se ha visto beneficiado por el uso de la tomografía de emisión de positrones (PET), la cual se basa en la detección de alteraciones metabólicas presentes en las células cancerígenas a partir del consumo de 18-fluorodeoxyglucosa (FDG-PET). El consumo de FDG está estrechamente relacionado con la capacidad de las células de proliferar ya que éstas requieren de glucosa como fuente de carbono para la síntesis de lípidos, aminoácidos y ácidos nucleicos. En los casos en que se ha usado, FDG-PET ha resultado altamente útil y ha mostrado ser muy sensible **(6,16,17)**. Además de que se ha propuesto que mediante este método se tenga un control de la enfermedad tal, que se logre una terapia individualizada basada en la respuesta que cada paciente presente **(18)**.

---

## 1.4 Estadificación

Se basa en el sistema diseñado en Ann Arbor (1971), descrito a continuación en la Tabla 1(1,2,3,4,15).

Tabla 1. *Sistema de estadificación Ann Arbor modificado*

ETAPA	Áreas involucradas (presencia de infiltración)
I	Una sola región linfática (I) o sólo un órgano extralinfático (I <sub>E</sub> ).
II	Dos o más regiones linfáticas en el mismo lado del diafragma (II) o un órgano extralinfático y una o más regiones linfáticas en el mismo lado del diafragma (II <sub>E</sub> )
III	Regiones linfáticas en ambos lados del diafragma (III) que puede estar acompañada por infiltración: extralinfática (III <sub>E</sub> ), de bazo (III <sub>S</sub> ) o de ambos (III <sub>ES</sub> )
IV	Uno o más órganos extralinfáticos o tejidos, asociados o no, a infiltración a ganglios linfáticos. Enfermedad diseminada o difusa.

Esta clasificación se complementa con los sufijos A y B:

A: ausencia de síntomas.

B: presencia de al menos uno de los siguientes síntomas: pérdida de peso inexplicable >, fiebres recurrentes >38° C y sudores nocturnos recurrentes.

La estadificación de la enfermedad resulta de gran importancia debido a que la etapa en la que se encuentre el paciente es el factor pronóstico más importante, además de que representa la base para establecer el tipo de tratamiento (6).

---

Además de la estadificación existen otros factores pronósticos: sexo, edad, nivel de hemoglobina, cuenta total de células sanguíneas, cuenta linfocítica y albúmina sérica. Estos factores podrían ser determinantes para que se logre una total remisión de la enfermedad, reflejando una exitosa respuesta al tratamiento empleado **(15)**.

### *1.5 Tratamiento*

Desde la década de los sesenta, el tratamiento para la EH ha evolucionado de tal manera que dejó ser una enfermedad fatal para ser uno de los cánceres más curables **(19,20)**. Gracias a los resultados que se han obtenido en cuanto a la búsqueda de un tratamiento adecuado, esta enfermedad actualmente es curable en el 85%-95% de los casos **(3,6,15,19,20)**.

En general, se utiliza radioterapia para pacientes en estadíos tempranos de la enfermedad y para los casos en que la enfermedad es más avanzada se utiliza quimioterapia o una combinación de radioterapia/quimioterapia **(1-4,19-21)**.

Han surgido distintos esquemas de quimioterapia con los que se han observado respuestas favorables en cuanto a supervivencia, sin embargo, la toxicidad de las distintas terapias ha representado un reto importante.

El primer esquema que logró altos porcentajes de remisión completa fue el régimen diseñado por De Vita Jr. y cols.(1975), MOPP (mecloretamina, vincristina -oncovin-, procarbazona y prednisona) **(1,14,20)**.

---

Posteriormente en los años setenta, con el objetivo de mejorar la incidencia de remisión completa y de disminuir la toxicidad, se empleó el esquema ABVD (adriamicina, bleomicina, vinblastina y dacarbazina), desarrollado por Bonadonna **(14,20,22)**.

Inicialmente sólo se recurrió al uso de esta terapia en casos en que MOPP había fallado, más tarde se estableció que, no solamente ABVD podría usarse como terapia de rescate, sino que podría ser un reemplazo de MOPP ya que ofrecía mejores resultados **(4,6,14,15,22,23,24)**.

Existen diversos estudios que han tenido como objetivo comparar la terapia MOPP con ABVD en términos tanto de efectividad como de efectos adversos generados. En estos estudios también se ha analizado la terapia híbrida (MOPP/ABV) y la terapia secuencial (MOPP-ABVD) **(3,14,15,19,20,24)**.

El uso de MOPP ha sido relacionado con una mayor incidencia de complicaciones secundarias al tratamiento, algunas de estas son: toxicidad pulmonar y hematológica, azoospermia u oligospermia, y segundas neoplasias **(4,20,21,25,26,27)**.

Con ambos esquemas se ha obtenido una tasa alta de supervivencia (80%-90%), sin embargo, ya que MOPP ha mostrado mayor toxicidad, se ha establecido que ABVD debe ser considerado el régimen estándar para el tratamiento de la EH y debe ser el esquema contra el cual se evalúen nuevos tratamientos **(24)**.

Por otro lado, se ha evaluado la eficiencia y toxicidad de la terapia combinada (radioterapia/quimioterapia) y se ha observado que ofrece un mayor control de la enfermedad pero aumenta el riesgo de segundos cánceres, riesgo relacionado con las áreas irradiadas y con las dosis de radiación **(6,21,26-28)**.

---

Como consecuencias de la terapia se han reportado principalmente leucemias, linfomas no Hodgkin y tumores sólidos, ya que se ha visto que es frecuente que los sobrevivientes a EH desarrollen alguno de estos tipos de cáncer **(20,21,26,27,29,30)**.

Es importante mencionar que a pesar del riesgo adicional que implica la radioterapia en términos de toxicidad, los efectos de ABVD/radioterapia han resultado menos tóxicos que MOPP/radioterapia **(14,15,19,22)**.

Además de los esquemas ABVD y MOPP, recientemente han surgido otras combinaciones de fármacos antineoplásicos con el intento de reducir los efectos tóxicos, ejemplos de estos esquemas son: BEACOPP (bleomicina, etopósido, adriamicina, ciclofosfamida, vincristina –oncovin-, procarbazona y prednisona); STANFORD V (mecloretamina, adriamicina, vinblastina, vincristina, bleomicina, etopósido, prednisona y factor estimulante de colonias de granulocitos); VAPEC-B (vincristina, adriamicina, prednisona, etopósido, ciclofosfamida y bleomicina); y CIVP/EVA (clorambucilo, vinblastina, procarbazona y prednisona); estos esquemas han logrado respuestas favorables en la cura de la EH y han mostrado menor toxicidad a corto plazo, sin embargo, aún no hay estudios que muestren la posible toxicidad a largo plazo, razón por la cual ABVD continúa siendo el régimen estándar **(15,19,20,23,24)**.

### *1.6 Esquema ABVD/radioterapia*

- Radioterapia

Es una modalidad de tratamiento local del cáncer basada en la administración de radiación ionizante (rayos X o rayos gamma) a los tejidos malignos para producir lesión biológica.



---

La radiación ionizante genera radicales libres y especies reactivas de oxígeno que lesionan el DNA. Las rupturas de doble cadena (DSB) del DNA son la lesión crítica que causa la muerte celular del tejido maligno. De manera ideal, la radiación debería destruir el tejido canceroso irradiado, sin embargo, también pueden verse afectadas células de tejido normal vecino, razón por la cual la radioterapia produce secuelas a largo plazo. Se ha mostrado que este tipo de tratamiento es mutágeno, carcinógeno, teratógeno y además, incrementa el riesgo de desarrollar segundas leucemias y tumores sólidos **(31,32)**.

Para el tratamiento de pacientes con EH en estadios avanzados, se administra una dosis de radioterapia de 20-30 Gy (Gray: absorción de 1J de energía por kg de tejido) en combinación con quimioterapia **(2, 4,21,31)**.

- Quimioterapia:

Tratamiento farmacológico capaz de destruir masa tumoral mediante la administración de sustancias que impiden la reproducción celular **(34)**. El tratamiento para la EH consta de administración de varios fármacos por lo que se denomina quimioterapia de combinación (poliquimioterapia). Las sustancias que componen el esquema ABVD se describen a continuación:

- Adriamicina/ Doxorubicina

Este agente es un antibiótico antracíclico producido por el hongo *Streptomyces peucetius varcaesius*. Inhibe la síntesis de DNA y RNA mediante la intercalación entre las bases de DNA. Las antraciclina son inhibidores de la topoisomerasa II por lo que provocan rupturas de cadena doble o sencilla. El metabolismo de este fármaco produce radicales libres que dan lugar a la peroxidación de lípidos de la membrana celular. La adriamicina es considerada mutágeno, y por consiguiente, carcinógeno.

---

El uso de doxorubicina está asociado principalmente a cardiotoxicidad. Otros efectos observados son mielosupresión, alopecia, náusea, vómitos y contracturas en la piel **(19,24,32-36)**.

- o Bleomicina

Este antibiótico antitumoral se deriva del *Streptomyces verticillus* y su mecanismo de acción se basa en la fragmentación del DNA mediante la producción de complejos catalíticos bleomicina/ hierro que al interactuar con el oxígeno forman radicales libres. Produce rupturas en las cadenas del DNA, las células se acumulan en fase G2 del ciclo celular. La toxicidad que genera es principalmente a nivel pulmonar, por lo que se han reportado pacientes con neumonía como complicación secundaria al tratamiento con ABVD **(16,24,32-36)**.

- o Vinblastina.

Este fármaco es un alcaloide derivado de la vinca (*Catharanthus roseus*). Ejerce su acción citotóxica principalmente durante la mitosis, ya que al unirse a la tubulina inhibe la polimerización de los microtúbulos del huso mitótico. La toxicidad de la vinblastina es principalmente mielosupresión aunque también puede ser neurotóxico **(32-36)**.

- o Dacarbazina (Dimetil-Triazeno-Imidazol-Carboxamida, DTIC).

Es un alquitriazeno que al ser metabolizado en el hígado se activa y actúa como agente metilante e inhibe principalmente la síntesis de purinas. Puede ejercer su acción en cualquier fase del ciclo celular. En combinación con adriamicina tiene un efecto sinérgico. Produce mielosupresión moderada pero las secuelas más importantes son náusea y vómito intensos (Fig. 1a y 1b) **(32-35)**.

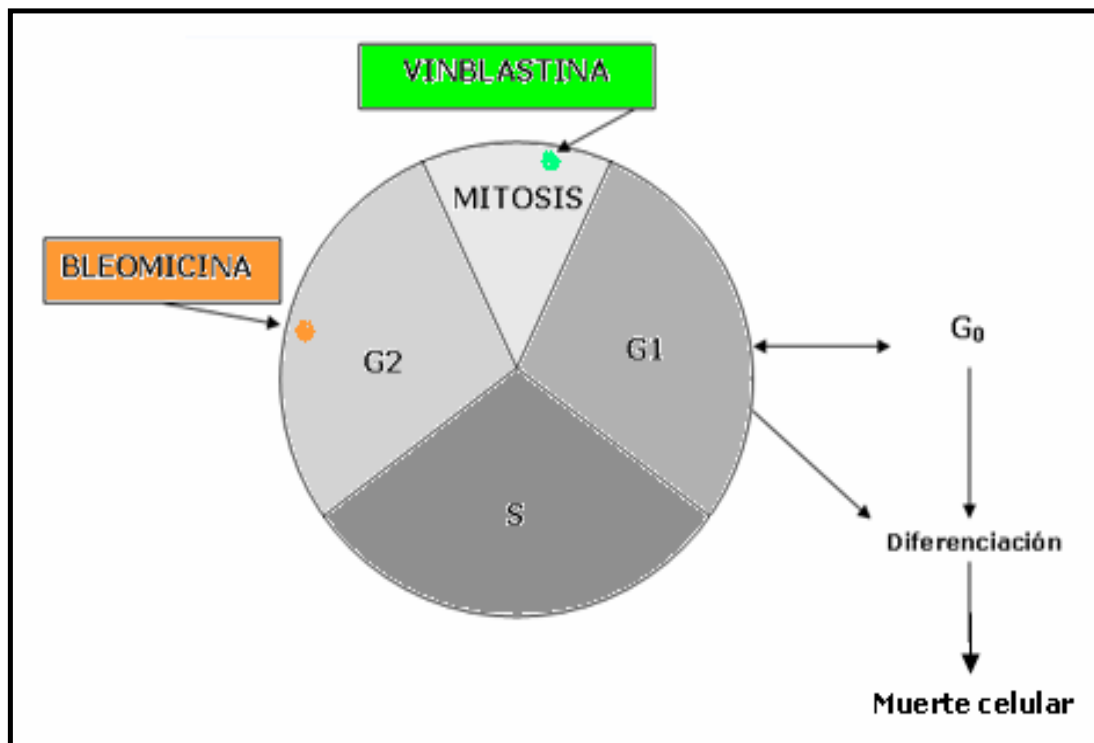


Fig 1a. Puntos de acción de los fármacos vinblastina y bleomicina

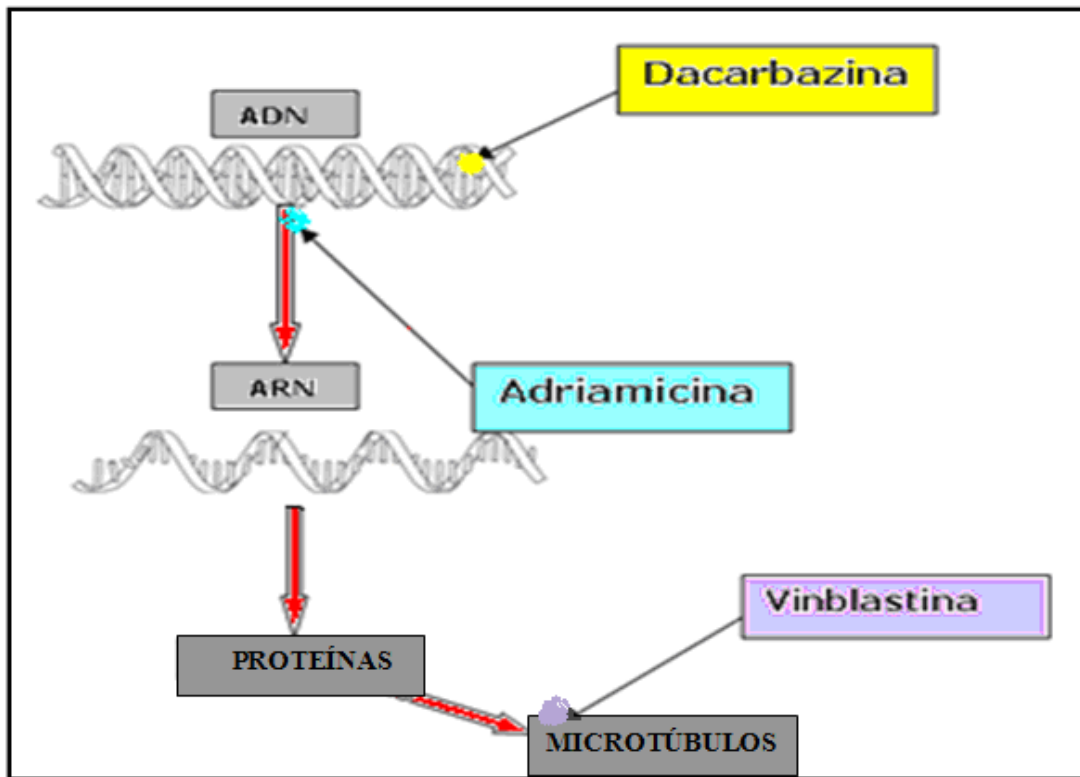


Fig 1b. Puntos de acción de los fármacos dacarbazina, adriamicina y vinblastina.

---

## 1.7 Consecuencias del tratamiento

La combinación de los agentes descritos ha resultado muy efectiva para el tratamiento del linfoma de Hodgkin, sin embargo no solamente las células malignas se ven afectadas por la acción de los fármacos, también las células normales pueden ser blanco de la genotoxicidad de la terapia **(32,36,)**. El reto más grande actualmente es mejorar el tratamiento para la EH de manera que se obtengan altos índices de cura y que se reduzcan al máximo los efectos adversos **(15)**.

El daño causado en células somáticas podría dar lugar a segundas neoplasias como leucemia, Linfoma no Hodgkin y tumores sólidos, ya que como se mencionó estas enfermedades son comunes en los sobrevivientes a EH **(21,26,27,29,30,37)**; el daño en células germinales podría comprometer la vida reproductiva del paciente **(25)**. Por esta razón los efectos de ABVD deben evaluarse en células somáticas y germinales para tener un conocimiento más certero de los efectos adversos de la quimioterapia y poder ofrecer un mejor pronóstico para el paciente, que se refleje en una mejor calidad de vida.

La genotoxicidad de la terapia ABVD/radioterapia podría manifestarse y evaluarse con la presencia de alteraciones cromosómicas en células somáticas dado que las células que sobrevivan, lo harán siempre y cuando reparen el posible daño causado por la terapia. Sin embargo, si este proceso de reparación es inadecuado o insuficiente podrían originarse aberraciones cromosómicas **(38)**, tanto numéricas (aneuploidías o euploidías), como estructurales (deleciones, duplicaciones, inversiones, inserciones, rupturas, translocaciones, anillos y/o marcadores) **(39,40)**; pudiendo dar lugar a inestabilidad cromosómica y esto a su vez podría traducirse en cáncer.

---

Detectar estas aberraciones en linfocitos de sangre periférica es de gran importancia ya que son un indicador del efecto nocivo de la terapia **(41,42)**.

Para detectar si la terapia induce este tipo de alteraciones se podrían analizar células en metafase con metodologías como el bandeo cromosómico; ésta es una técnica de citogenética clásica que ha sido establecida como estándar desde 1970 por su simplicidad y su buena resolución; sin embargo, por bandeo resulta difícil analizar los rearrreglos complejos e identificar el origen de cromosomas marcadores **(43,44)**. Por esta razón, resulta favorable el uso de la Hibridación *in situ* con Fluorescencia (FISH) para el monitoreo de alteraciones cromosómicas.

### *1.8 FISH Multicolor. M-FISH*

La FISH es una técnica de citogenética molecular introducida durante los años noventa que permite la detección de secuencias de nucleótidos específicas en cromosomas metafásicos, en células en interfase o sobre segmentos de tejidos **(45,46)**.

Esta técnica se basa en las propiedades de desnaturalización y renaturalización del DNA. Se utilizan fragmentos específicos de DNA marcados con fluorocromos (sondas) que bajo condiciones apropiadas, por complementariedad de bases forman híbridos con el DNA de la muestra, posteriormente los híbridos formados pueden ser detectados por medio de microscopios de fluorescencia **(47)**.

Las sondas pueden hibridar regiones teloméricas, subteloméricas, centroméricas, locus específicas (LSI) o bien, pueden mediante la combinación de una gran cantidad de sondas marcar o pintar un cromosoma completo (whole chromosome painting, WCP) **(43,46)**.

---

Para lograr un monitoreo del cariotipo completo y no sólo de ciertas regiones de algunos cromosomas, a finales de los años noventa se diseñaron técnicas de cariotipo multicolor SKY (cariotipo espectral) y M-FISH (Multiplex FISH). Estas técnicas permiten la detección y diferenciación de cada par de cromosomas homólogos, asignando un color específico a cada uno mediante el uso de sondas de tinción completa marcadas con diferentes fluorocromos en diferentes combinaciones **(47,48)**. La asignación de un color a cada par homólogo es posible gracias a un software especializado que al detectar determinadas combinaciones de fluorocromos proporciona un color específico perceptible al ojo humano.

En la técnica de SKY se excitan simultáneamente todos los fluorocromos y mediante un interferómetro se analiza el perfil de fluorescencia en cada píxel de la imagen.

En el caso de M-FISH, se excitan y detectan por separado cada uno de los fluorocromos mediante diferentes filtros y posteriormente se realiza el análisis por superposición de imágenes **(43,44,48,40,50)**. (Fig. 2a y 2b)

La técnica de M-FISH utiliza 52 sondas marcadas con cinco distintos fluorocromos, que logran distinguir a cada par de los 22 autosomas y a los cromosomas X y Y mediante un color específico. Estos fluorocromos son: Spectrum Green™, Spectrum Aqua™, Spectrum Gold™, Spectrum FRed™, Spectrum Red™ (Anexo I) **(48,50,51)**.

M-FISH ofrece la posibilidad de monitorear el cariotipo completo de cada célula lo que permite detectar cualquier alteración en los 46 cromosomas, sin necesidad de que una alteración se repita en varias células para ser detectada **(43,44,47)**.

Esta metodología resulta muy efectiva ya que en el análisis del cariotipo se pueden identificar rearrreglos complejos de una manera más certera y en una sola hibridación, por ello M-FISH es la técnica ideal para monitorear las alteraciones cromosómicas inducidas por la terapia ABVD/radioterapia en células somáticas.

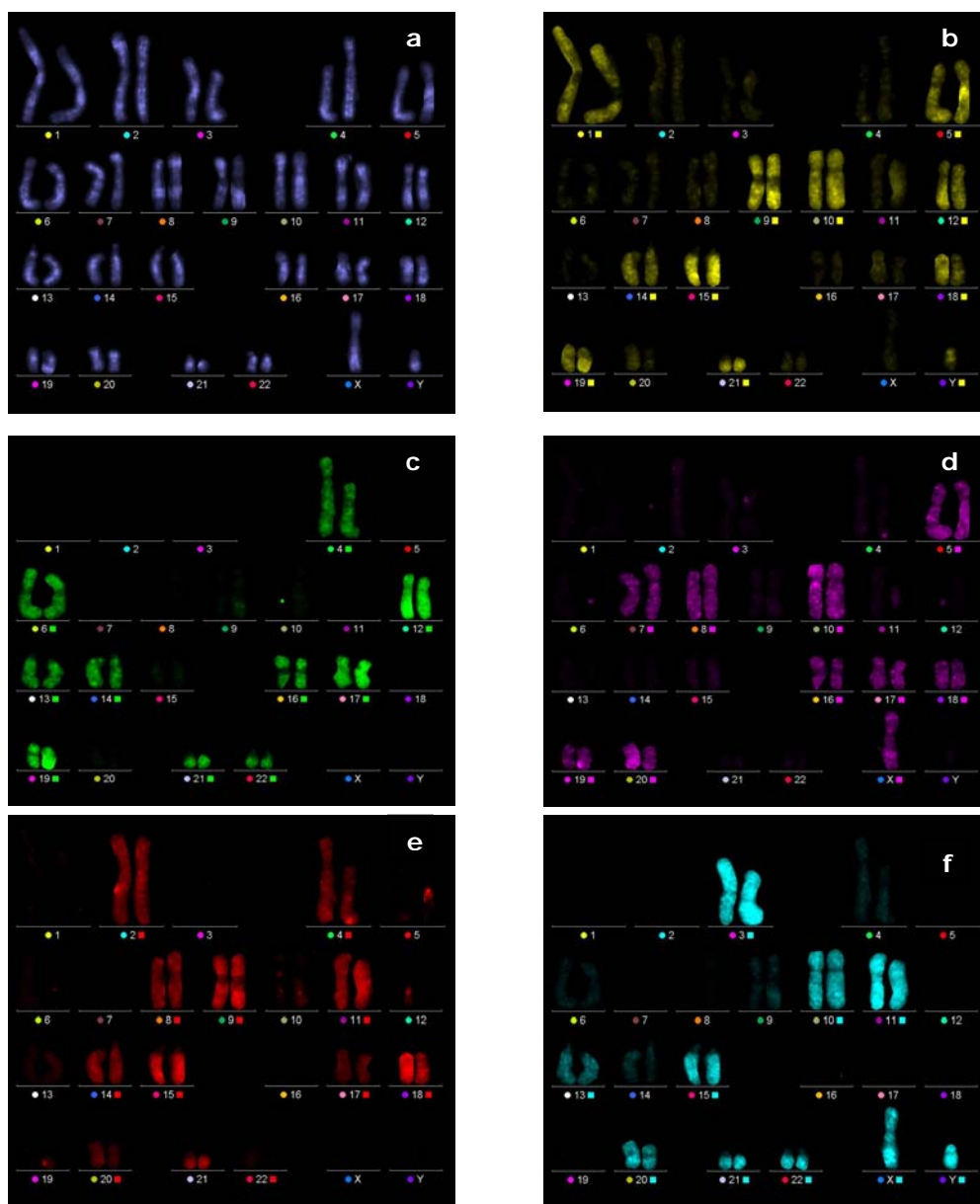


Fig 2a. Imágenes de M-FISH con filtros individuales de un cariotipo normal. a. Contratación con DAPI (6-diamino-2-fenilindol); b. Spectrum Gold™; c. Spectrum Green™; d. Spectrum FRed™; e. Spectrum Red™; f. SpectrumAqua™

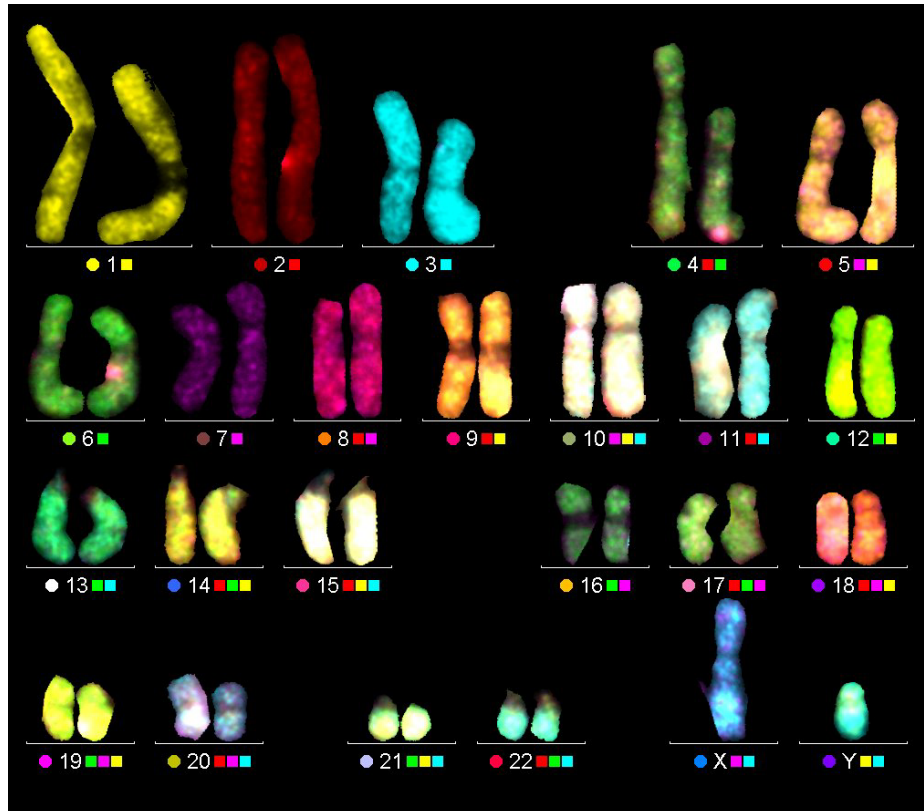


Fig 2b. Imagen de M-FISH de un cariotipo normal. Superposición de las imágenes individuales.



---

## **2.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

A partir de su descripción en 1832 por Thomas Hodgkin, la Enfermedad de Hodgkin ha pasado de ser una enfermedad fatal a ser uno de los cánceres más curables.

El tratamiento de esta neoplasia del tejido linfoide ha evolucionado de tal forma que la tasa de supervivencia es de 85%-95%. El régimen estándar que se ha establecido es el esquema quimioterapéutico ABVD (adriamicina, bleomicina, vinblastina, dacarbazina) y radioterapia para pacientes en estadios avanzados. Los resultados observados han sido favorables con el uso de este esquema en cuanto a remisión completa de la enfermedad, y se ha visto que tiene una menor toxicidad comparado con otros esquemas empleados como MOPP (mecloretamina, vincristina, procarbazona y prednisona), sin embargo no se ha evaluado profundamente si el uso de ABVD/radioterapia tiene un efecto genotóxico en células somáticas y germinales de pacientes sobrevivientes.

Es importante determinar si el esquema ABVD induce alteraciones cromosómicas en células somáticas ya que actualmente, no solamente se desea que el tratamiento sea efectivo para erradicar la enfermedad, sino que además la toxicidad generada sea la menor posible y con ello se incremente la calidad de vida del paciente sobreviviente a la EH.

---

### **3.-OBJETIVO**

Detectar alteraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica de 5 pacientes con Enfermedad de Hodgkin tratados con la terapia antineoplásica ABVD/radioterapia por medio de la técnica de M- FISH.

Determinar si hay daño cromosómico antes, durante y/o después del tratamiento para conocer el daño basal y el inducido por el tratamiento.

### **4.-HIPÓTESIS**

La terapia ABVD/radioterapia induce alteraciones cromosómicas en células madre de linfocitos de sangre periférica.

---

## **5. DISEÑO EXPERIMENTAL**

Se analizaron linfocitos de sangre periférica de pacientes con Enfermedad de Hodgkin así como de sujetos sanos (grupo control) mediante la técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia-multiplex (M-FISH), para determinar la posible genotoxicidad del esquema de quimioterapia ABVD.

### *5.1 Población de Estudio.*

Se estudiaron los siguientes grupos de individuos:

I. Grupo de cinco pacientes con EH (mayores de 18 años, hombres o mujeres) en tres tiempos de muestreo;

Ia. Antes de tratamiento

Ib. Durante tratamiento

Ic. Después de tratamiento

II. Grupo de dos pacientes (uno femenino y otro masculino) con un sólo tiempo de muestreo: después de tratamiento.

III. Grupo control (NL) conformado por cinco sujetos sanos (hombres, mayores de 18 años).

A todos los individuos se les solicitó firmar una carta de consentimiento informado (Anexo II) y que respondieran dos cuestionarios (Anexo III y V).

Los pacientes incluidos fueron canalizados de las siguientes instituciones: cinco pacientes referidos del Instituto Nacional de Cancerología (Departamento de Hematología) y dos pacientes del Hospital General de México (Departamento de Oncología).

---

- CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Para los pacientes EH con tratamiento ABVD:

Ia. Se consideraron antes de tratamiento: Pacientes diagnosticados con EH de acuerdo con los criterios médicos y de laboratorio pertinentes y que no recibieran ningún tipo de terapia antineoplásica.

Ib. Durante tratamiento: El tratamiento debió ser ABVD/radioterapia, la muestra sanguínea se tomó durante el tercer o cuarto ciclo de quimioterapia.

Ic. Después de tratamiento: Uno o dos años después de terminar su terapia se colectó la tercera muestra.

II. Todos los pacientes debieron tener 18 años o más.

III. Que aceptaran participar en el estudio voluntariamente y firmaran una carta de consentimiento informado (Anexo II).

IV. Que contestaran adecuadamente los cuestionarios de tamizaje (Anexo III) y general (Anexo V).

- Individuos sanos

i. Que tuvieran 18 años o más.

ii. Que aceptaran participar voluntariamente y firmaran carta de consentimiento informado (Anexo II).

iii. Que contestaran adecuadamente los cuestionarios de tamizaje y general (Anexo III y V).

- CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Ver criterios de exclusión de acuerdo al cuestionario de tamizaje en el Anexo IV.

- CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

1. Pacientes que recibieran otro tipo de tratamiento antineoplásico además de ABVD o que no fuera ABVD.

- 
2. En el caso de las muestras de seguimiento, pacientes que no donaran alguna de las muestras, o bien que por otras razones no se contara con alguna de las muestras.
  3. Pacientes que no desearon continuar con el estudio.
  4. Pacientes que por la evolución de la enfermedad no pudieron donar las muestras de seguimiento.

## *5.2 Metodología (Anexo VI y VII)*

Se analizaron cinco muestras de sangre periférica de pacientes antes, cinco durante y cinco después de tratamiento (1 año post-tratamiento), y dos muestras de individuos después de dos años de tratamiento para determinar la frecuencia de alteraciones cromosómicas. (Total de muestras=17)

- Cultivo Celular

Cada muestra fue tomada con una jeringa de 3ml con aguja de 22x32 estéril con 0.1ml de heparina de 5,000 u y se sembraron 4 cultivos primarios de la siguiente manera: En un tubo de centrifuga se sembraron 0.5ml de sangre periférica con 5ml de medio de cultivo de McCoy 5a, 0.005ml de antibiótico (penicilina/estreptomicina) y 0.1ml de fitohemaglutinina para estimular la proliferación de linfocitos T.

Los cultivos se incubaron a 37° C y a las 48 horas se les agregó 0.02ml de colchicina (0.1mg/ml) para detener a las células en metafase, transcurridas tres horas, los tubos se centrifugaron a 1500rpm durante 10min, se retiró el sobrenadante, se agregaron 10ml de solución hipotónica (KCl 0.075M) precalentada a 37° y se incubaron durante 25 min. Se realizó la prefijación agregando 1ml de fijador Carnoy (Metanol absoluto/Ácido acético glacial 3:1), se homogenizó y se centrifugó a 1500rpm durante 10min, se retiró el sobrenadante y se agregó fijador Carnoy (8ml aproximadamente). Se hicieron mínimo tres lavados con fijador Carnoy.

---

- Elaboración de laminillas.

El paquete celular se resuspendió en 0.5- 1.0 ml de fijador. En un portaobjetos previamente limpio y desengrasado se colocaron de dos a tres gotas de fijador Carnoy, inmediatamente se agregó una gota del paquete celular resuspendido. Se expuso la laminilla a vapor de agua estéril por pocos segundos para obtener metafases de buena calidad.

Se observó al microscopio (10x) y se delimitó la zona en la que se encontraba una mayor densidad de metafases.

Las laminillas fueron elaboradas de uno a tres días antes a la hibridación.

- Pretratamiento para M-FISH

-Para la maduración de laminillas, se introdujeron en solución salina de citratos (2XSSC) a 37°C durante 30 minutos.

Se deshidrataron con etanoles graduales de 70, 80 y 100% durante dos minutos en cada solución.

-Digestión con pepsina y fijación.

Se preparó una solución de pepsina (49.5ml de agua destilada + 0.5ml de HCl) precalentada a 37°C, a esta solución se le agregó una alícuota de 250µl de pepsina (20mg/ml)

Los portaobjetos se sumergieron en la solución de pepsina y se incubaron durante 3-8 minutos dependiendo de la cantidad de citoplasma de cada muestra.

Se realizó un lavado introduciendo los portaobjetos en solución salina de fosfatos (PBS 1X) a temperatura ambiente durante 3min. En caso de que el material todavía presentara restos de citoplasma se sumergieron nuevamente en la solución de pepsina durante al menos dos minutos más.

---

Se aplicaron 100µl de solución de postfijación (formaldehído/PBS 1X) a cada portaobjetos, se colocaron cubreobjetos de 24 x 50 mm<sup>2</sup> y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Se retiraron con cuidado los cubreobjetos y nuevamente se lavaron las laminillas con PBS 1X a temperatura ambiente durante 3 minutos.

Se deshidrataron las laminillas con etanoles de concentración creciente (70, 80, 100%) durante dos minutos en cada uno.

Posteriormente se dejaron secar a temperatura ambiente durante 5-10 min.

- Codesnaturalización e Hibridación.

Toda esta parte del procedimiento se realizó en oscuridad debido a que las sondas de M-FISH son de tinción directa (fluorocromos conjugados directamente con la sonda).

A cada portaobjetos se le aplicaron 10 µl de la mezcla comercial de sondas para M-FISH (Spectra Visión<sup>TM</sup>) previamente descongelada y resuspendida, posteriormente se colocó un cubreobjetos de 22x22 mm<sup>2</sup>.

La codesnaturalización se realizó en el Hybrite (Vysis) a 74°C durante 3.5 minutos y se colocó cemento iris en el borde de los cubreobjetos para sellar y mantener las condiciones adecuadas de hibridación. Las laminillas se incubaron a 37°C en cámara húmeda y oscura durante 24 horas.

- Lavados Post Hibridación

Se retiraron los cubreobjetos y las laminillas se introdujeron en una solución de lavado (0.4XSSC/0.3% Igepal) precalentada en baño maría a 73°C durante tres minutos. Posteriormente se colocaron en una segunda solución (2XSSC/0.1% Igepal) a temperatura ambiente durante 1 min y se dejaron secar en posición vertical.

---

- Contratinción.

Se realizó con 10µl de DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol) diluido en medio de montaje para fluorescencia Vectashield (Vector, Labs. Inc.), y se colocaron cubreobjetos de 24X50mm<sup>2</sup>.

- Captura de imágenes y análisis.

Cada muestra se observó al microscopio (Axio Imager Z1, ZEISS) con el filtro para contratinción DAPI, y se tomaron imágenes con los filtros sencillos para cada uno de los fluorocromos.

Se capturaron en promedio 70 metafases por muestra y de cada célula se construyó el cariotipo por medio del software ISIS (Zeiss). La identificación de las alteraciones se basó en el espectro de hibridación de cada cromosoma (Anexo I)

- Análisis de metafases

El número de metafases analizadas en cada caso dependió del índice mitótico de cada muestra ya que la proliferación celular suele verse afectada por la EH así como por la terapia y se va recuperando después de ésta. En general, aunque se obtuvieron mayor número de metafases en las muestras post-tratamiento, el número de células a analizar fue aproximadamente 100 en todos los casos.

Para el análisis de los resultados se consideraron normales aquellas metafases que tuvieran: Cariotipos 46,XX o 46,XY sin ningún tipo de alteración; se incluyeron también los cariotipos que tuvieran de 43-45 cromosomas sin ninguna alteración estructural ya que es posible atribuir la pérdida de cromosomas a la técnica con la que se realizan las laminillas. El criterio para considerar la presencia de una línea celular aneuploide fue encontrar al menos tres células con el mismo cariotipo en la misma muestra pero en ninguna de las muestras analizadas se presentó esta situación.



---

Se consideraron como células anormales aquellas que presentaran:  
a) cualquier tipo de alteración estructural (inestables ó estables), con estas alteraciones se obtuvieron las frecuencias para determinar las aberraciones más comunes o representativas de cada tiempo de muestreo. Entre las alteraciones inestables se observaron: rupturas cromatídicas y rupturas cromosómicas. Las alteraciones estructurales que se detectaron fueron: deleciones, inserciones, inversiones, duplicaciones, translocaciones, dicéntricos, tricéntricos, rearrreglos complejos y cromosomas en anillo. En algunos casos se incluyeron las metafases con número hipodiploide siempre y cuando presentaran algún tipo de alteración estructural.

Debido a que las rupturas cromosómicas y cromatídicas son alteraciones inestables, carecen de centrómero, y por lo tanto se pierden en las divisiones celulares subsecuentes, se realizó un análisis alterno en el que no se incluyeron en la frecuencia total de alteraciones.

También se consideraron anormales las células que presentaran:

b) alteraciones numéricas, aunque únicamente se consideraron las ganancias (de cromosomas o de set completo) ya que, como se mencionó anteriormente, para considerar células con pérdidas se buscaron al menos tres células con la misma pérdida.

- Análisis estadístico

Por medio del programa SPSS se realizaron las pruebas estadísticas:

a) Kruskal Wallis, para la comparación intergrupala (muestras control, antes de tratamiento, durante tratamiento y después de tratamiento).

b) U- Mann Whitney (para el análisis entre pares de grupos)

Estas pruebas se usaron para determinar la existencia de diferencias entre los grupos estudiados, para ambos se consideró una  $p < 0.05$ .

## **6.RESULTADOS**

Se incluyeron en el estudio siete pacientes con EH y cinco sujetos sanos como control. En la Tabla 2a se describen las características de cada paciente en cuanto a la edad, ciclos de quimioterapia, estadio de EH y el tiempo en que se obtuvo cada muestra. En la Tabla 2b se hace referencia a los individuos que conformaron el grupo control.

**Tabla 2a. Descripción de los pacientes con EH**

<b>Código del Paciente</b>	<b>Sexo</b>	<b>Edad (años)</b>	<b>Ciclos de Qx</b>	<b>Tipo de EH</b>	<b>Estadio</b>	<b>Tiempos de muestreo</b>	<b>Vigilancia post-tratamiento (III)</b>
66	M	18	6	CM	IIB	I, II, III	1año
109	M	33	8	CM	IIIA	I, II, III	1año
111	M	22	8	CM	IB	I, II, III	1año
118	F	25	6	EN	IIB	I, II, III	1año
122	M	28	6	CM	IIB	I, II, III	1año
130	F	45	6	CM	IIIB	III	2años
128	M	18	6	CM	IIB	III	2años

\***Sexo:** M (masculino), F (femenino); \***Edad:** (se refiere a la edad en que fueron diagnosticados con EH); \***Tipo de EH:** CM (celularidad mixta), EN (esclerosis nodular); \***Tiempos de muestreo:** I (antes de tratamiento), II (durante el tercer o cuarto ciclo de quimioterapia), III (de uno a dos años después de tratamiento).

\***Vigilancia post-tratamiento:** tiempo transcurrido para la toma de la muestra III. Todos los pacientes recibieron **radioterapia** en dosis de 30 a 40 Gy.

Procedencia: Hospital General de México (Pacientes 109 y 128); Instituto Nacional de Cancerología (Pacientes 66, 111, 118, 122, 130).

**Tabla 2b. Descripción de los sujetos control (NL)**

<b>Código</b>	<b>Edad (años)</b>	<b>Sexo</b>
NL-31	23	M
NL-32	24	M
NL-34	20	M
NL-35	27	M
NL-36	24	M

\***Código:** NL (usado para individuos sanos, control); \***Edad:** edad en la que donaron la muestra; \***Sexo:** (M) masculino.

Las toxicomanías de los pacientes y de los sujetos control incluidos en el estudio se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3. Toxicomanías de los pacientes**

Paciente	Tabaco/día	Bebidas alcohólicas	Bebidas con cafeína	Drogas	Medicamentos	Expos. a agentes químicos
66	3 cigarros	1 cerveza (330ml) / mes	1 taza / día	no	Aspirina (ocasional)	no
109	20 cigarros	110ml / año	3 tazas / día	no	Naproxeno Ampicilina	no
111	4 cigarros (suspendido)	Hasta embriaguez/ 2 semanas al mes. (Suspendida)	Ocasional coca cola 355ml	no	no	Insecticida Gramosol
118	No	no	2 tazas / semana	no	no	no
122	16 cigarros	110ml / semana	no	no	no	no
128	no	Social	1 taza / semana	no	no	no
130	no	no	1 taza café / día 600ml coca cola / 8 días	no	no	no
NL-31	no	no	no	no	no	no
NL-32	3 cigarros	no	10 taza/semana	no	no	no
NL-34	no	no	2 taza/ semana	no	no	no
NL-35	1 cigarro	no	8 taza/semana	no	no	no
NL-36	3 cigarros	no	Menos de 1/ taza semana	no	no	no

---

En la Tabla 4 se muestran los resultados obtenidos de las muestras analizadas. Se presentan las fórmulas cromosómicas de las metafases alteradas, el total de metafases analizadas, el número de metafases normales y el número de metafases alteradas. Así mismo, se incluye la frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales (ACE), calculada con el número total de alteraciones estructurales (estables e inestables) y la frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales estables (ACE estables), en las que se descartaron las rupturas (inestables).

También se incluye el número de alteraciones numéricas encontradas, pero éste número hace referencia únicamente a las ganancias (de cromosoma o bien, de set completo).

**Tabla 4. Descripción de cariotipos alterados encontrados en pacientes y en individuos sanos (NL)**

INDIVIDUO	CARIOTIPOS ALTERADOS	
<b>66-I</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 46,XY,t(1;7)(q10;p10)</li> <li>- 46,XY,inv(7)(p12;q12)</li> <li>- 46,XY chtb 2</li> </ul>	Total de metafases analizadas: 54 Metafases normales: 51 Metafases altereadas: 3 (5.6%) #alteraciones: 3 #alteraciones numéricas: 0 #alteraciones estructurales: 3 #rupturas: 1 Frecuencia ACE: 0.055 Frecuencia ACE estables: 0.037
<b>66-II</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 46,XY,del(7)(q11)</li> <li>- 45,XY,-10 chrb 8</li> <li>- 46,XY chrb 14</li> </ul>	Total de metafases analizadas: 68 Metafases normales: 65 Metafases altereadas: 3 (4.4%) #alteraciones: 3 #alteraciones numéricas: 0 #alteraciones estructurales: 3 #rupturas: 2 Frecuencia ACE: 0.044 Frecuencia ACE estables: 0.015
<b>66-III</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 45,XY,t(1;3),dic(2;11),t(3;9)</li> <li>- 46,XY,del(6p)</li> <li>- 46,XY,del(8p)</li> <li>- 46,XY,del(12)(p11)</li> <li>- 92,XXYY</li> <li>- 46,XY,t(5;10)</li> <li>- 47,XY,+17</li> <li>- 46,XY,del(6q) chtb 4qter, chtb 1q</li> <li>- 46,XY chtb 9</li> <li>- 46,XY chtb 9</li> <li>- 45,XY,-19 chtb 7</li> <li>- 46,XY chrb 6</li> <li>- 46,XY chtb 4, chtb 4, chrb 5, chrb 13</li> </ul>	Total de metafases analizadas: 62 Metafases normales: 49 Metafases altereadas: 13 (20.9%) #alteraciones: 20 #alteraciones numéricas: 2 #alteraciones estructurales: 18 #rupturas: 10 Frecuencia ACE: 0.29 Frecuencia ACE estables: 0.129

<p><b>118-I</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 46,XX,del(14)(q13),der(18)t(14;18)(q13;p13)</li> <li>- 46,XX,del(18q)</li> <li>- 46,XX,dup(7p)</li> <li>- 45,XX,dic(5;9),dup(13q)</li> <li>- 46,XX,del(11q)</li> <li>- 45,XX,rob(14)</li> <li>- 46,XX,dup(7p),dup(12q)</li> <li>- 46,XX,del(18p)</li> <li>- 45,XX,-11,del(17)(q21.3)</li> <li>- 46,XX chrb 3, chtb 6</li> <li>- 46,XX chrb X</li> <li>- 46,XX chtb Xq</li> </ul>	<p>Total de metafases analizadas: 75  Metafases normales: 63  Metafases altereadas: 12 (16%)  #alteraciones: 16  #alteraciones numéricas: 0  #alteraciones estructurales: 16  #rupturas: 4  Frecuencia ACE: 0.213  Frecuencia ACE estables: 0.16</p>
<p><b>118-II</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 46,XX,del(5)(p11)</li> <li>- 47,XX,+3</li> <li>- 46,XX,del(11q)</li> <li>- 47,XX,+4</li> <li>- 42,X,t(X;6),ins(1;6),t(3;9),der(4)t(4;5),-6,-7,del(7),del(8),t(12;13),-14,der(15)t(14;15),t(18;20),der(19)t(14;19),-21 chrb 11</li> <li>- 46,XX,del(10p)</li> <li>- 45,XX,del(1)(q21),-16</li> <li>- 46,XX,dup(7p) chtb 8q</li> <li>- 46,XX,inv(2),del(12p)</li> <li>- 46,XX chtb 9q</li> <li>- 46,XX chrb 17(p10)</li> <li>- 46,XX chtb 4p, chtb 16q</li> <li>- 46,XX chtb 5q</li> <li>- 45,XX,-22 chtb 17</li> </ul>	<p>Total de metafases analizadas: 98  Metafases normales: 84  Metafases altereadas: 14 (14.3%)  #alteraciones: 27  #alteraciones numéricas: 2  #alteraciones estructurales: 25  #rupturas: 8  Frecuencia ACE: 0.255  Frecuencia ACE estables: 0.173</p>

<p><b>118-III</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 46,XX,t(1;5),t(3;11),ace(18)</li> <li>- 44,XX,dic(2;3),der(4)t(4;14),der(14)t(14;18), der(18)t(1;18),-18,ace(3),ace(3),ace(4;18) chrb der(3)</li> <li>- 43,del(X),dic(1;7)(p31.2?:p23),dic(3;8)(p11.2;p22), t(4;13),del(5p),der(6)t(1;6)(p32;q23.1),del(9q),der(15)t(15;18), der(18)t(X;6;18),del(20),der(21)t(9;19;21),-22,ace(3;8),ace(15;22) chrb dic(1;7)(1q), chrb 4</li> <li>- 46,del(Xq),t(X;13),der(16)t(X;16)</li> <li>- 43,X,dic(X;3),dic(1;17)t(1;5;17),t(4;20), t(5;12),dic(10;13),ace(X),ace(1),ace(10;13)</li> <li>- 46,XX,t(5;10)</li> <li>- 45,XX,dic(4;7),del(9)(q31) chrb 4q</li> <li>- 37,ins(X;5),-1,t(4;16),del(5q),-7,-8,-10,der(15)t(5;15qter),-19,-19,-20,-20</li> <li>- 45,XX,t(3;4),-16</li> <li>- 43,XX,der(3)t(3;8),-8,del(11),-16,-19</li> <li>- 44,X,del(Xq),-15,-20</li> <li>- 46,XX,der(18)t(18;21) chrb 17</li> <li>- 43,XX,-7,-11,der(15)t(15;22),-22</li> <li>- 43,XX,-10,der(15qterh+),-16,-20</li> <li>- 45,XX,dic(5;10),ace(5;10)</li> <li>- 44,XX,dic(1;9),der(1)t(1;14),del(2),inv(2),dic(3;6)t(3;6;10), der(7)t(7;14;20),t(8;22),der(10)t(6;10),t(11;12),der(14)t(2;14), del(14),der(16)t(6;16),der(20)t(7;20),ace(1),ace(2),ace(3),ace(9) chrb 5q, chrb 15q</li> <li>- 46,XX,t(2;9),t(6;8)</li> <li>- 45,XX,der(8)t(8;20),dic(16;20),der(19)t(8;19)</li> </ul>	<p>Total de metafases analizadas: 56  Metafases normales: 38  Metafases altereadas: 18 (32.1%)  #alteraciones: 70  #alteraciones numéricas: 0  #alteraciones estructurales: 70  #rupturas: 7  Frecuencia ACE: 1.25  Frecuencia ACE estables: 1.125</p>
<p><b>111-I</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 46,XY,del(11q)</li> <li>- 46,XY,del(17p)</li> <li>- 46,XY,del(12p)</li> <li>- 47,XY,+18</li> <li>- 46,XY chtb 4p</li> <li>- 46,XY chtb 4q, chtb 5q</li> </ul>	<p>Total de metafases analizadas: 82  Metafases normales: 76  Metafases altereadas: 6 (7.3%)  #alteraciones: 7  #alteraciones numéricas: 1  #alteraciones estructurales: 6  #rupturas: 3  Frecuencia ACE: 0.073  Frecuencia ACE estables: 0.037</p>

<p><b>111-II</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 46,XY,del(17p)</li> <li>- 46,XY,del(6)(p12),der(11)t(6;11)(p10;p15)</li> <li>- 45,XY,dic(2;6),der(7)t(2;7),ace(6) chrb 11</li> <li>- 46,XY,del(4p)</li> <li>- 46,XY chtb 10q</li> <li>- 46,XY chrb 6</li> <li>- 46,XY chtb 14</li> <li>- 46,XY chrb 10</li> <li>- 46,XY chrb 16</li> </ul>	<p>Total de metafases analizadas: 63  Metafases normales: 54  Metafases altereadas: 9(14.3%)  #alteraciones: 12  #alteraciones numéricas: 0  #alteraciones estructurales: 12  #rupturas: 6  Frecuencia ACE: 0.19  Frecuencia ACE estables: 0.095</p>
<p><b>111-III</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 46,XY,t(6;10)</li> <li>- 39,XY,der(2)t(2;4),-3,-4,-10,-12,-14,-18,-18</li> <li>- 44,XY,rob(21;22),-15</li> <li>- 46,XY,t(9;17)</li> <li>- 92,XXYY</li> <li>- 47,XXY</li> <li>- 45,XY,del(3)(p2),-19</li> <li>- 46,XY,der(5)t(5;7) chtb der(5)</li> <li>- 42,XY,del(1),-4,-8,-12,-17</li> </ul>	<p>Total de metafases analizadas:  102  Metafases normales: 93  Metafases altereadas: 9(8.8%)  #alteraciones: 10  #alteraciones numéricas: 2  #alteraciones estructurales: 8  #rupturas: 1  Frecuencia ACE: 0.078  Frecuencia ACE estables: 0.069</p>



<p><b>109-I</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 47,XXY chrb 11</li> <li>- 46,XY,t(9; 10)(q; q)</li> <li>- 46,XY,del(5q),der(19)t(5; 19)</li> <li>- 45,XY,-2,der(5)t(1; 5)</li> <li>- 46,XY,t(3; 14)(p24; q22)</li> <li>- 46,XY,del(11q)</li> <li>- 46,XY,del(17p)</li> <li>- 46,XY chrb 9</li> <li>- 46,XY chrb 10</li> </ul>	<p>Total de metafases analizadas: 70          Metafases normales: 61          Metafases altereadas: 9 (12.9%)          #alteraciones: 9          #alteraciones numéricas: 1          #alteraciones estructurales: 8          #rupturas: 3          Frecuencia ACE: 0.114          Frecuencia ACE estables: 0.071</p>
<p><b>109-II</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 48,XY,+3,+7</li> <li>- 47,XY,der(4)t(1; 4)(q32; q35),+5,t(17; 18)</li> <li>- 44,Y,del(X)(q21?),inv(12)(p12; q11),-19,-21</li> <li>- 43,Y,dic(X; 6?),-10,-22</li> <li>- 41,Y,dic(X; 20)t(X; 19; 20),trc(1; 3; 8)t(1; 3; 8; 13),inv(2),del(3p),dic(4; 17),del(10)(p10),t(11; 18),-13,ace(1),ace(3) chrb 12</li> <li>- 46,X,t(Y; 14)</li> <li>- 46,XY,del(5q)</li> <li>- 46,XY,del(2p)</li> <li>- 46,XY,del(15q)</li> <li>- 43,Y,dic(X; 21),tcr(1; 10; 13),der(7)t(1; 7)(p22; p12),der(7)t(X; 7),t(8; 10),t(8; 18),der(11)t(10; 11),</li> <li>- 44,XY,dup(10q),-14,-15</li> <li>- 45,XY,-18 chrb 20</li> <li>- 45,X chtb 2q</li> <li>- 46,XY chtb 2q</li> <li>- 46,XY chrb 11</li> </ul>	<p>Total de metafases analizadas: 79          Metafases normales: 64          Metafases altereadas: 15(19%)          #alteraciones: 36          #alteraciones numéricas: 3          #alteraciones estructurales: 33          #rupturas: 5          Frecuencia ACE: 0.418          Frecuencia ACE estables: 0.354</p>

<p><b>109-III</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 46,XY,t(2;15)</li> <li>- 38,XY,t(2;17),t(14;22),-6,-8,-11,-12,-13,-14,-18,-22</li> <li>- 43,XY,t(2;11),dic(4;11),der(6)t(6;15),-7,-15,ace(11)</li> <li>- 46,XY,del(4q)</li> <li>- 49,XY,+1,+2,+6,+9,-22</li> <li>- 46,XY,t(10;14)</li> <li>- 46,XY,t(1;11)</li> <li>- 42,XY,der(11)t(11;18),-17,-18,-21,-22</li> <li>- 45,XY,-3,dup(4),t(8;18),+r(14),-22</li> <li>- 42,Y,der(X)t(X;18),t(1;10),dic(5;7),t(6;13),del(8),der(8)t(X;8),del(11),-14,-15,-20,ace(7) chtb 17</li> <li>- 45,XY,dic(4;20),ace(4;20)</li> <li>- 45,XY,dic(1;3),der(10)t(1;10),der(14)t(3;14)</li> <li>- 44,XY,der(3)t(3;4),der(4)t(4;14),-14,-16</li> <li>- 45,XY,dic(9;9),ace(9)</li> <li>- 45,XY,dic(1;3),del(8),der(11)t(8;11)</li> <li>- 45,XY,der(2)t(2;5),dic(5;21),ace(2)</li> <li>- 46,XY chrb 4</li> <li>- 46,XY chtb 20</li> <li>- 46,XY chrb 17(p10) [2]</li> <li>- 45,XY,-13 chrb 21</li> <li>- 46,XY chtb 4q</li> <li>- 45,XY,-17 chrb 17(p10)</li> <li>- 46,XY chtb 19</li> <li>- 46,XY chtb 1p</li> <li>- 46,XY chrb 9p</li> <li>- 46,XY chtb 1q</li> <li>- 42,XY,-9,-12-17,-22 chrb 3</li> <li>- 46,XY chtb 5q</li> <li>- 45,XY,-17 chrb 8</li> </ul>	<p>Total de metafases analizadas: 82  Metafases normales: 52  Metafases altereadas: 30(36.6%)  #alteraciones: 51  #alteraciones numéricas: 5  #alteraciones estructurales: 46  #rupturas: 15  Frecuencia ACE: 0.561  Frecuencia ACE estables: 0.378</p>
-----------------------	--	---

<p><b>122-I</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 47,XY,+21</li> <li>- 46,XY,del(5p)</li> <li>- 46,XY,ace(3),chtb 17q</li> <li>- 46,XY chtb 11</li> <li>- 46,XY chrb 21</li> </ul>	<p>Total de metafases analizadas: 71  Metafases normales: 66  Metafases altereadas: 5(7%)  #alteraciones: 5  #alteraciones numéricas: 1  #alteraciones estructurales: 4  #rupturas: 3  Frecuencia ACE: 0.056  Frecuencia ACE estables: 0.014</p>
<p><b>122-II</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 45,XY,del(4q),-12</li> <li>- 92,XXYY</li> <li>- 47,XY,+19</li> <li>- 46,XY,del(5p)</li> <li>- 43,XY,del(5p),del(8p),-11,-18,-22</li> <li>- 46,XY,del(13)</li> <li>- 46,XY chtb 5q</li> </ul>	<p>Total de metafases analizadas: 84  Metafases normales: 77  Metafases altereadas: 7(8.3%)  #alteraciones: 8  #alteraciones numéricas: 2  #alteraciones estructurales: 6  #rupturas: 1  Frecuencia ACE: 0.071  Frecuencia ACE estables: 0.059</p>
<p><b>122-III</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 46,XY,del(2)</li> <li>- 43,XY,dic(1;4),t(1;4;6),der(2)t(2;20),t(5;19),del(6q),dic(7;12),  der(8)t(1;8;12),der(17)t(X;17;20),der(19)t(5;19),-20,ace(1;6),ace(2),ace(7),ace(17)</li> <li>- 40,der(X)t(X;4),der(Y)t(Y;9),dic(1;12)t(1;3;12),trc(1;13;21)t(X;1;2;6;13;21),  der(2)t(2;3),der(2)t(2;3;9;13),der(3)del(3)(p13)del(3)(q21),dic(3;5),dic(4;7)t(1;4;7),  del(5)(q32),der(6)t(6;14),der(6)t(6;11),del(7)(q33),trc(8;10;19),der(9)t(9;20;22),  der(9)t(8;9;16),der(11)t(8;11;15),del(11)(q22),der(12)t(9;12),dic(13;15),  dic(15;16)t(2;3;6;15;16),der(16)r(15;16),der(19)t(15;19),+der(19)del(19)(p12),  der(20)t(12;20),der(21)t(11;21),ace(X),ace(X;1),ace(5),ace(9;12;13),ace(9;20),  ace(13),ace(19) chrb 20, chrb 20, chrb 21</li> </ul>	<p>Total de metafases analizadas: 64  Metafases normales: 39  Metafases altereadas: 25(39.0%)  #alteraciones: 174  #alteraciones numéricas: 6  #alteraciones estructurales: 168  #rupturas: 15  Frecuencia ACE: 2.63  Frecuencia ACE estables: 2.39</p>

<p><b>continúa 122-III</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 40,XY,der(1)t(1;8),dic(1;9)t(1;3;9),del(2)(q12),dic(3;8)t(3;8;12),dic(4;18),der(4)t(4;11),-5,del(5)(q32),der(6)t(6;11)(q25;?),del(6)(q22),der(10)t(3;10),der(11)t(9;11),der(11)t(2;10;11),der(12)t(8;12),dic(12;15),dic(13;14),der(15)t(11;15),der(18)t(9;18),ace(1),ace(14) chrb(X)</li> <li>- 45,XY,der(3)t(3;12),-12,der(20)t(12;20) chtb 6p</li> <li>- 41,XY,-4,t(5;6),t(8;10),-13,ins(13;15),-19,-21,-22</li> <li>- 42,XY,dic(3;7),dic(4;13)t(4;12;13),der(6)t(6;13),t(9;16)(q10;p10),der(11)t(6;11)(p21;q13),dic(11;12),dic(12;18),der(14)t(11;14),ace(3;7),ace(4),ace(12;18) chrb19</li> <li>- 46,XY,t(1;7)(q32;q11)</li> <li>- 42,XY,t(1;11),der(4)t(4;15),-7,-9,-10,-15</li> <li>- 46,der(1)t(1;7)(p36;p15),t(4;7),t(16;18)</li> <li>- 46,XY,del(1q),der(11)t(1;11)</li> <li>- 46,XY,t(10;18)</li> <li>- 51,XY,+8,+9,+13,t(13;18),+15,+17</li> <li>- 46,XY,t(7;9),t(10;20),t(9;11),der(11)t(11;15)</li> <li>- 46,XY,t(1;12)</li> <li>- 43,XY,t(2;7),-3,-7,-9</li> <li>- 38,X,der(Y)t(Y;14),der(1)t(1;4;11;20),dic(2;17)t(2;9;17),der(3)t(2;3;6;9;11),trc(3;2;8),dic(4;20)t(4;14;20),ins(4;11),del(5)(p13),dic(6;10),trc(8;12;19),t(9;16)(q21;q12),dic(9;19)t(4;5;9;19),t(10;17),der(11)t(2;11),der(13)t(9;13),der(13)t(10;13),del(14)(q21),der(14)t(4;14),del(18)(q21),der(20)t(1;20),ace(2;3),ace(2;11),ace(4;5),ace(5;19),ace(8;12),ace(11),ace(17) chrb Y, chrb 5q</li> <li>- 43,XY,dic(4;12),dic(5;12),der(10)t(9;10),t(11;14),der(17)t(17;18),del(18q),-21,ace(5),ace(14) chrb 5, chrb 6, chrb 9, chrb 18</li> <li>- 46,XY,t(2;15)</li> <li>- 46,XY,dup(21)</li> <li>- 43,X,dic(4;13),t(7;12),dic(18;19),ace(4)</li> <li>- 42,XY,dic(1;14)t(1;6;14),der(3)t(3;8),dic(8;15)(q10;q10),del(8q),-10,-13,ace(1;13),ace(3) chrb 3, chrb der(3)t(3;8)</li> <li>- 46,XY,del(17)(q10)</li> <li>- 45,XY,del(10),-15,der(17)t(15;17)</li> <li>- 46,XY chtb 4</li> </ul>	<p>Total de metafases analizadas: 64  Metafases normales: 39  Metafases altereadas: 25(39.0%)  #alteraciones: 174  #alteraciones numéricas: 6  #alteraciones estructurales: 168  #rupturas: 15  Frecuencia ACE: 2.63  Frecuencia ACE: estables: 2.39</p>
------------------------------------	---	--

<p><b>128-III</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 44,XY,trc(3;4;14),ace(3),ace(14)</li> <li>- 46,XY,t(3;19),del(8)</li> <li>- 45,XXY,dic(9;11)t(9;11;22),tas(9;16)(qter;pter),del(22q), ace(9), ace(16)</li> <li>- 45,XY,dic(10;14),ace(10;14)</li> <li>- 45,XY,dic(14;18)(q10;q10)</li> <li>- 44,XY,dic(2;14)(q10;q32),der(3)t(3;11),der(5)t(5;7),del(7)(p13;q2?), dic(7;15),t(9;10),der(11)t(5;11),der(20)t(7;20), ace(11), chrb Y</li> <li>- 43,Y,t(X;4),dic(1;12),ins(2;17),dic(10;17),del(11)(q23),der(16)t(1;16;12),dic(16;17), der(20)t(11;20), ace(17), chtb 5</li> <li>- 46,XY,t(1;4)(p13;q32),t(6;8)</li> <li>- 46,XY,t(11;13)</li> <li>- 44,XY,del(9)(q22),dic(11;16),rob(13;14),der(14)t(11;14),der(16)t(9;16)(q32;q21), ace(11;16)</li> <li>- 43,XY,dic(2;21),dic(8;9),dic(10;15),der(15)t(8;15),der(19)t(2;19),ace(9), ace(10;15)</li> <li>- 44,XY,t(2;14),der(5)t(5;14),trc(6;12;10),der(9)t(9;12),del(21q), ace(5;6), ace(6;12)</li> <li>- 46,Y,t(X;5),t(7;20)</li> <li>- 46,XY,t(4;20)</li> <li>- 46,XY,t(12;18)</li> <li>- 46,XY chtb 3p</li> <li>- 46,XY chrb13</li> <li>- 46,XY chtb 9p</li> </ul>	<p>Total de metafases analizadas: 65  Metafases normales: 47  Metafases altereadas: 18(27.7%)  #alteraciones: 55  #alteraciones numéricas: 0  #alteraciones estructurales: 55  #rupturas: 5  Frecuencia ACE: 0.846  Frecuencia ACE: estables: 0.769</p>
-----------------------	---	---

<p><b>130-III</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 44,XX,dic(1;3),t(1;4)(p22;p15?),der(2)t(2;12;5),der(2)t(2;18),der(3)t(3;12),der(5)t(5;12),der(6)t(3;6;19),der(11)t(6;11),der(12)t(2;12),der(13)t(13;19),der(16)t(3;16),der(18)t(16;18),-19,ace(1)</li> <li>- 45,XX,t(2;12),dic(3;8)</li> <li>- 42,XX,der(4)t(4;11),dic(4;11),dic(5;17)t(5;12;17),der(6)t(6;20),dic(9;13),del(12)(p11),dic(16;20),ace(5),ace(17)</li> <li>- 43,X,der(X)t(X;8),dic(1;13),dic(2;6),dic(3;9)t(3;9;14;5),der(5)t(5;15),der(8)t(5;8),der(14)t(9;14),del(15)(q24),ace(2;6),ace(5;13),ace(9)</li> <li>- 46,XX,t(2;10)</li> <li>- 45,XX,dic(3;7),t(10;17),dup(15),ace(3;7),ace(3) chrb 1p</li> <li>- 44,X,-13,der(16)t(13;16) chrb 1</li> <li>- 46,XX,t(1;13)</li> <li>- 46,X,t(X;13)</li> <li>- 46,XX,der(9)t(9;20),ace(20)</li> <li>- 45,XX,t(1;6)(p31.1;q21),dic(9;10),del(12)(q22),t(13;18) chtb 8</li> <li>- 46,XX chtb 11</li> <li>- 45,XX,-21 chtb 14</li> </ul>	<p>Total de metafases analizadas: 68  Metafases normales: 47  Metafases altereadas: 21 (30.9%)  #alteraciones: 72  #alteraciones numéricas: 0  #alteraciones estructurales: 72  #rupturas: 7  Frecuencia ACE: 1.06  Frecuencia ACE: estables: 0.956</p>
<p><b>NL- 31</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 46,XY,del(1)(p22)</li> <li>- 46,XY,der(2)t(2;13)</li> </ul>	<p>Total de metafases analizadas: 95  Metafases normales: 93  Metafases altereadas: 2 (2.1%)  #alteraciones: 2  #alteraciones numéricas: 0  #alteraciones estructurales: 2  #rupturas: 0  Frecuencia ACE: 0.021  Frecuencia ACE: estables: 0.021</p>
<p><b>NL- 32</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 45,XY,-17 chtb 15</li> <li>- 46,XY chtb 14</li> <li>- 45,XY,dic(5;10)</li> </ul>	<p>Total de metafases analizadas: 99  Metafases normales: 96  Metafases altereadas: 3 (3.03%)  #alteraciones: 3  #alteraciones numéricas: 0  #alteraciones estructurales: 3  #rupturas: 2  Frecuencia ACE: 0.030  Frecuencia ACE : estables: 0.010</p>

<b>NL- 34</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 47,XY,+8</li> <li>- 46,XY chrb 3</li> </ul>	Total de metafases analizadas: 107 Metafases normales: 105 Metafases altereadas: 2 #alteraciones: 2 #alteraciones numéricas: 1 #alteraciones estructurales: 1 #rupturas: 1 Frecuencia ACE: 0.009 Frecuencia ACE: estables: 0.0
<b>NL- 35</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 45,XY,-22 chrb X</li> <li>- 40,XY,-3,-5,-9,-11,-21,-21,del(1)</li> </ul>	Total de metafases analizadas: 93 Metafases normales: 91 Metafases altereadas: 2 #alteraciones: 2 #alteraciones numéricas: 0 #alteraciones estructurales: 2 #rupturas: 1 Frecuencia ACE: 0.021 Frecuencia ACE: estables: 0.010
<b>NL- 36</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 44,XY,-3,-7 chtb 12q</li> <li>- 46,XY chtb 9</li> <li>- 47,XY,+8</li> </ul>	Total de metafases analizadas: 95 Metafases normales: 92 Metafases altereadas: 3 #alteraciones: 3 #alteraciones numéricas: 1 #alteraciones estructurales: 2 #rupturas: 2 Frecuencia ACE: 0.021 Frecuencia ACE: estables: 0.0

Nomenclatura según el ISCN 2005 **(40)** (ver Anexo VIII), NL: Individuos normales (sanos). Grupo control  
 ACE: alteraciones cromosómicas estructurales

Con la información contenida en la Tabla 4 se realizaron los siguientes análisis:

1. Frecuencia de aberraciones numéricas y estructurales
2. Frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales por paciente en cada tiempo de muestreo.
3. Frecuencia de cada tipo de alteración observada en los distintos tiempos de muestreo.
4. Análisis de aberraciones cromosómicas estructurales por cromosoma.

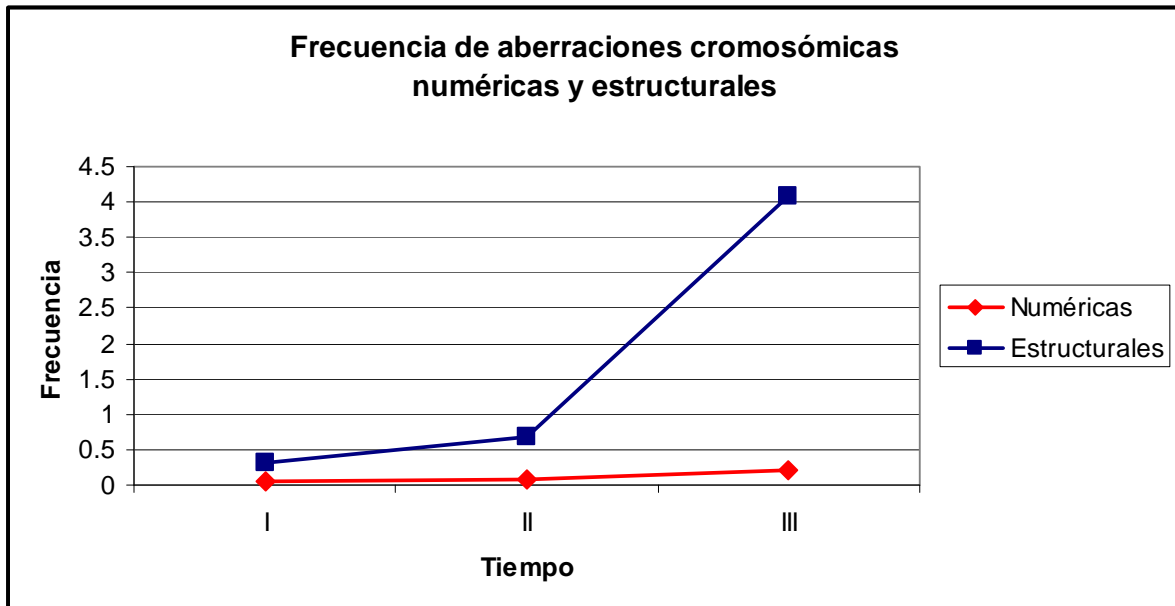
### 6.1. Frecuencia de aberraciones numéricas y estructurales

En la siguiente tabla se muestra el total de aberraciones numéricas y estructurales en cada tiempo de muestreo. Se consideraron todas las muestras (se incluyen 128 y 130).

**Tabla 5. Frecuencia de aberraciones numéricas y estructurales.**

Tiempo de muestreo	Frecuencia de aberraciones NUMÉRICAS	Frecuencia de aberraciones ESTRUCTURALES
I	0.04	0.319
II	0.082	0.684
III	0.2068	4.091

Gráfica 1. Frecuencia de aberraciones numéricas y estructurales.



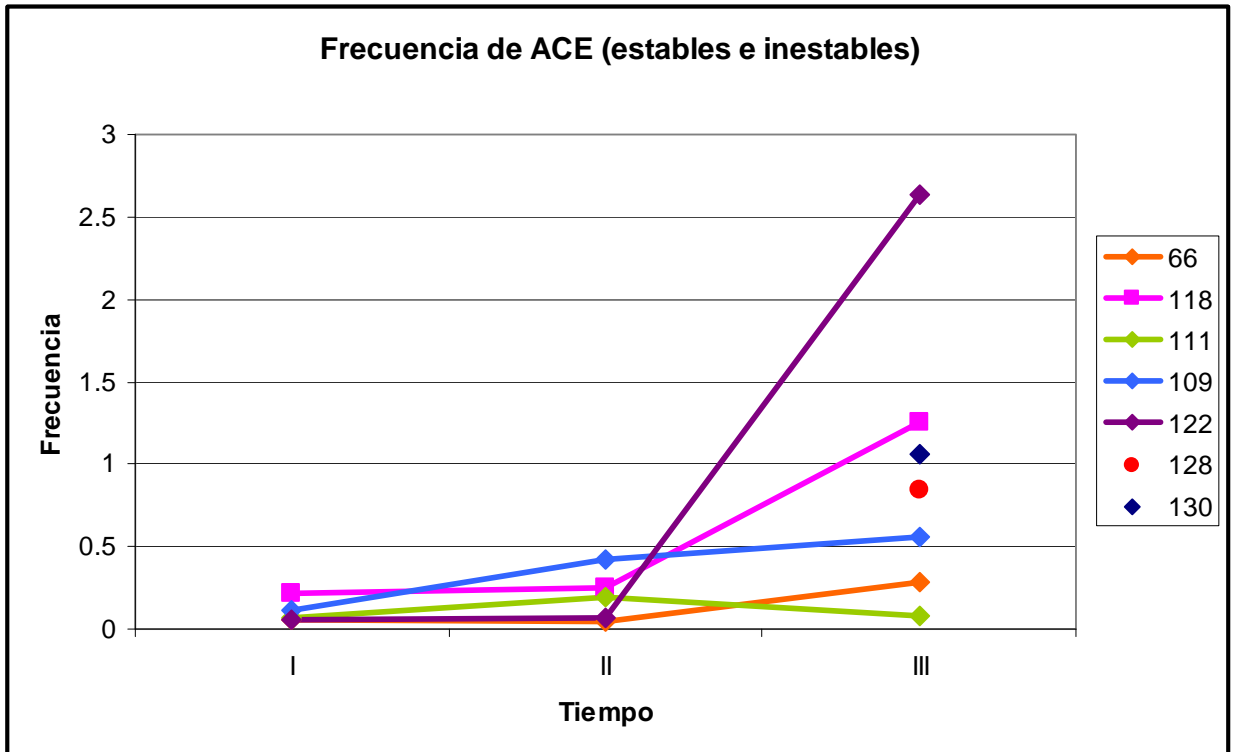
En la Gráfica 1 se muestran los datos contenidos en la Tabla 5. Para esta gráfica se consideraron todos los pacientes. En cuanto a las aberraciones numéricas, solamente se consideraron las ganancias, ya que las pérdidas únicamente serían consideradas si se encontraban tres células con la misma pérdida pero en ningún caso sucedió esto.

Es posible observar que ambos tipos de aberraciones aumentan con la terapia, sin embargo es mucho más importante la contribución de las alteraciones estructurales, de hecho en el muestreo post tratamiento (tiempo III) las alteraciones estructurales presentan una frecuencia 20 veces mayor que las numéricas. Además de que la frecuencia máxima de las alteraciones numéricas (tiempo III) quedó por debajo de la frecuencia mínima que mostraron las alteraciones estructurales (tiempo I). Por esta razón el análisis se enfocó en las aberraciones cromosómicas estructurales (ACE).



## 6.2. Frecuencias de aberraciones cromosómicas estructurales (ACE) por paciente

Gráfica 2a. Frecuencia de ACE (estables e inestables)

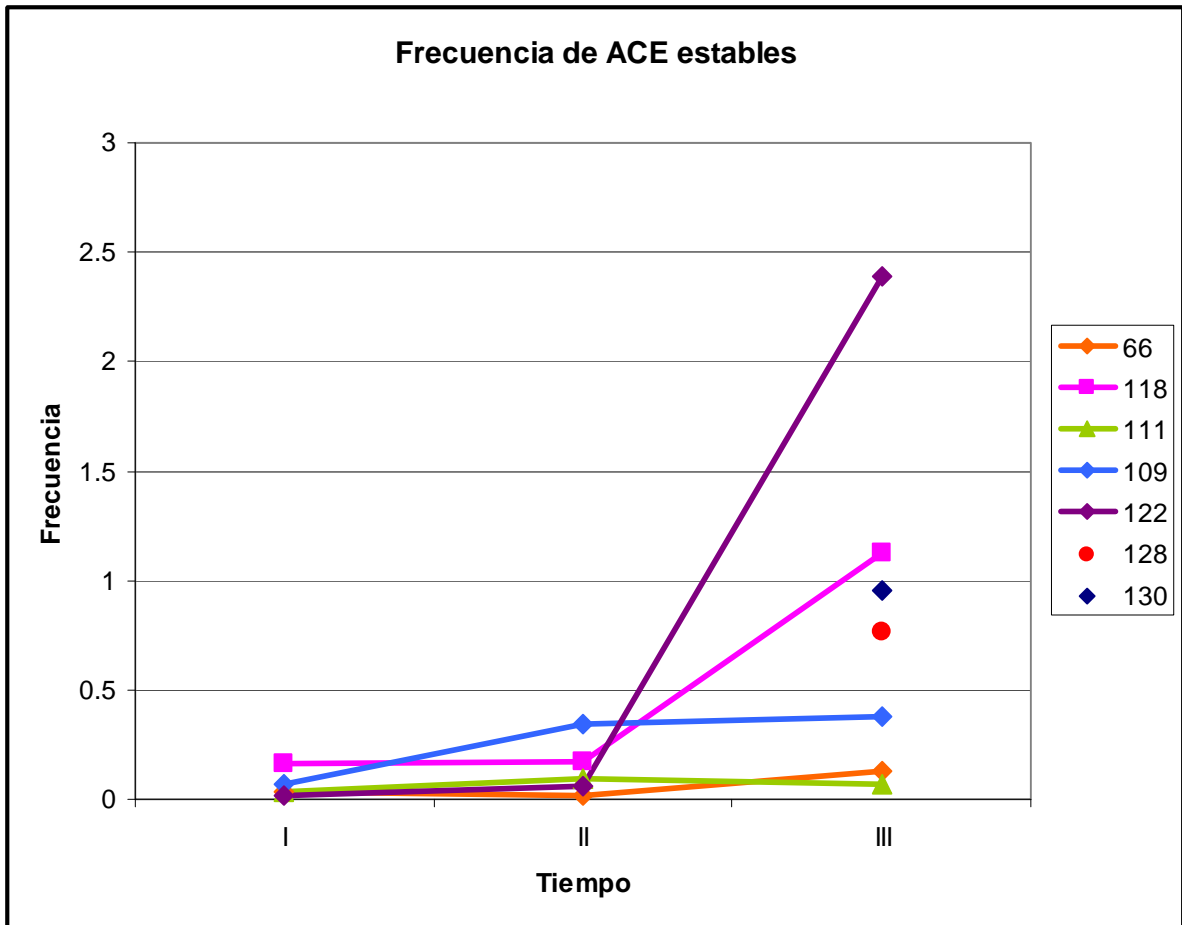


En la Gráfica 2a, se presentan las frecuencias de aberraciones cromosómicas estructurales (ACE) totales, se incluyeron tanto las estables como las inestables (rupturas). Se observa que en 4/5 pacientes con EH, la frecuencia de ACE aumentó después de tratamiento en comparación con el muestreo durante tratamiento.

Los pacientes 118 y 122 son los que se presentaron un aumento importante.

En todos los pacientes la frecuencia de ACE totales fue mayor después del tratamiento que antes del mismo. Cabe señalar que el aumento de ACE en el paciente 111 durante tratamiento (II) se debió principalmente a rupturas (aberraciones inestables).

Gráfica 2.b. Frecuencia de ACE estables



La Gráfica 2b muestra la frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales estables, las inestables (rupturas cromosómicas y cromatídicas) fueron excluidas. Se puede observar que en tres de los pacientes con EH (66, 118 y 122) la frecuencia de ACE estables aumentó después del tratamiento; en el paciente 109 también hubo un aumento pero fue menos importante. Por otro lado, en el paciente 111 la frecuencia disminuyó, sin embargo esta disminución fue menos abrupta que cuando se consideraron las rupturas (Gráfica 2a). Se puede observar de manera general que en las muestras de todos los pacientes, se encontró que la frecuencia de ACE estables fue mayor después de tratamiento que antes del mismo.

### 6.3. Tipo de alteraciones estructurales encontradas.

Para evaluar la frecuencia de los diferentes tipos de alteración en cada tiempo de muestreo se consideraron todas las muestras excepto las de los pacientes 128 y 130 ya que de éstos únicamente se contó con la muestra III.

**Tabla 6. Número de alteraciones estructurales observadas por cada individuo**

	t	inv	del	dic	dup	ins	cx	r	chtb	chrb
66-I	1	1							1	
118-I	2		5	1	4				3	1
111-I			3						3	
109-I	4		2							3
122-I			1						2	1
<b>TOTAL</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>11</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>9</b>	<b>5</b>
66-II			1							2
118-II	7		7		1				6	2
111-II	2		3	1					2	4
109-II	9	1	6	3	1		3		2	3
122-II			5						1	
<b>TOTAL</b>	<b>18</b>	<b>1</b>	<b>22</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>11</b>	<b>11</b>
66-III	3		4	1					7	3
118-III	30	1	11	9	1	1	5			7
111-III	5		2						1	
109-III	19		4	7	1			1	7	8
122-III	57		19	15	1	2	24	1	2	13
<b>TOTAL</b>	<b>114</b>	<b>1</b>	<b>40</b>	<b>32</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>29</b>	<b>2</b>	<b>17</b>	<b>31</b>
128-III	23		5	11	1		4		3	2
130-III	36		7	13			4		3	4
NL-32				1					2	
NL-35			1							1
NL-36									2	
NL-31	1		1							
NL-34										1
<b>TOTAL</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>2</b>

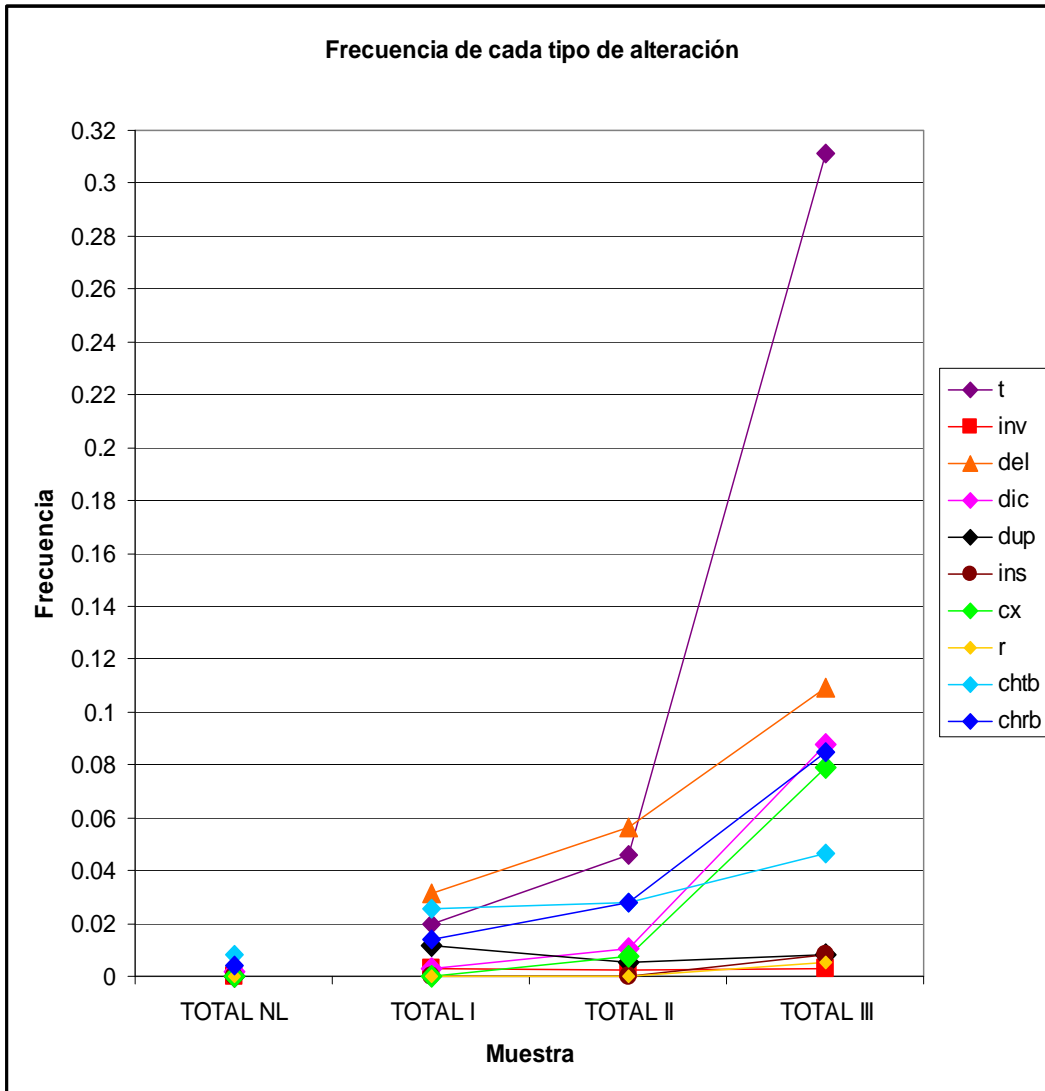
t: translocaciones; inv: inversiones; del: deleciones; dic: dicéntricos; dup: duplicaciones; ins: inserciones; cx: rearrreglos complejos; r: anillos; chtb: rupturas cromatídicas; chrb: rupturas cromosómicas

**Tabla 7. Frecuencia de alteraciones estructurales observadas en cada grupo de individuos**

	t	inv	del	dic	dup	ins	cx	r	chtb	chrb
<b>TOTAL I</b>	0.0199	0.0028	0.0313	0.0028	0.0114	0	0	0	0.0256	0.0142
<b>TOTAL II</b>	0.0459	0.0026	0.0561	0.0102	0.0051	0	0.0077	0	0.0281	0.0281
<b>TOTAL III</b>	0.312	0.0027	0.1093	0.0874	0.0082	0.0082	0.0792	0.0055	0.0464	0.0847
<b>TOTAL NL</b>	0.0020	0	0.0040	0.0020	0	0	0	0	0.0080	0.0040

t: translocaciones; inv: inversiones; del: deleciones; dic: dicéntricos; dup: duplicaciones; ins: inserciones; cx: rearrreglos complejos; r: anillos; chtb: rupturas cromatídicas; chrb: rupturas cromosómicas

Gráfica 3. Frecuencia de cada tipo de alteración estructural en sujetos normales y pacientes (antes, durante y después de tratamiento)

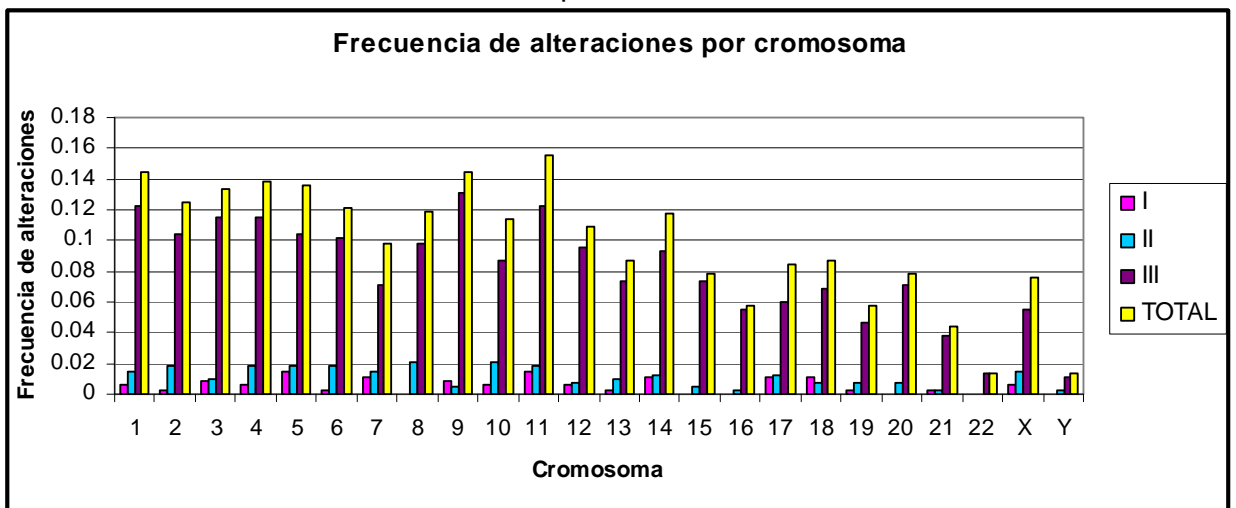


La Gráfica 3, muestra los datos de la frecuencia según el tipo de alteración observada. Todas las alteraciones se presentaron con mayor frecuencia en los pacientes con EH que en los sujetos control (normales). En las muestras antes de tratamiento no se observaron inserciones, anillos, dicéntricos ni rearrreglos complejos. En las muestras de los pacientes con EH durante y después de tratamiento se encontraron todos los tipos de alteración excepto anillos, que fueron exclusivos de las muestras post-tratamiento. Se observa un aumento abrupto de translocaciones, deleciones, dicéntricos y rearrreglos complejos después del tratamiento. Las alteraciones no estables de tipo rupturas (cromosómicas y cromatídicas) también aumentaron después del tratamiento, de ambas las cromosómicas fueron las que presentaron un mayor incremento.

#### 6.4 .Análisis de ACE (estables e inestables) por cromosoma

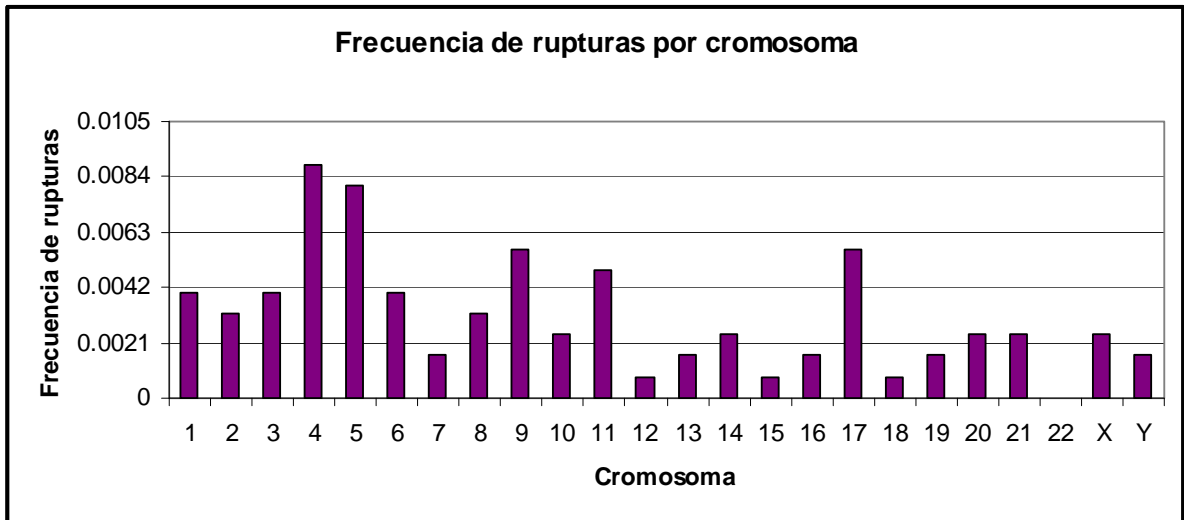
El análisis de alteraciones en cada cromosoma se realizó con los datos obtenidos de las muestras de todos los pacientes (se incluyen 128 y 130) en cada tiempo de muestreo (I, II y III) con el fin de identificar si algún cromosoma se relaciona específicamente con algún tipo de alteración o rearrreglo.

Gráfica 4a. Frecuencia total de alteraciones observadas por cromosoma en cada tiempo de muestreo



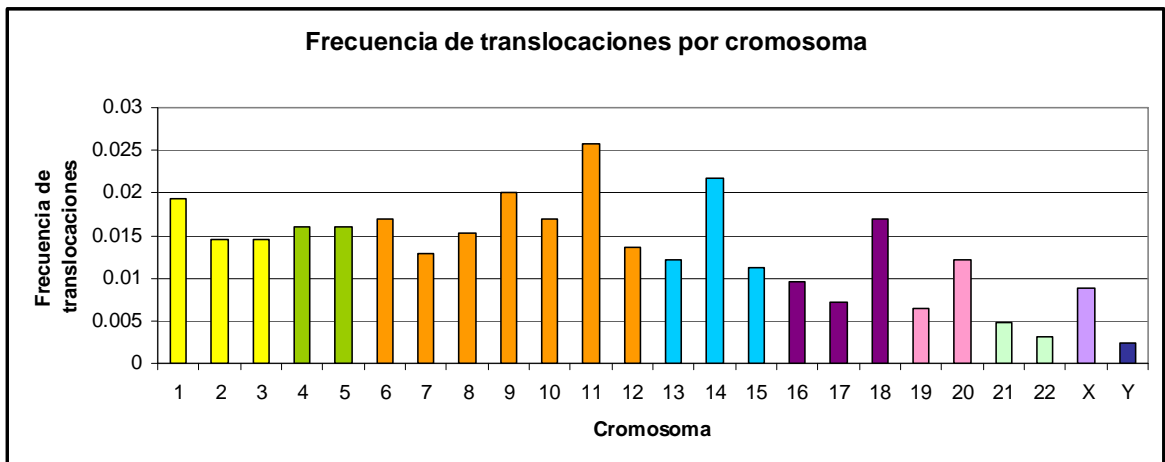
En todos los cromosomas la frecuencia de aberraciones fue mayor después de tratamiento con respecto a las muestras antes y durante. Los cromosomas involucrados con mayor frecuencia a lo largo de todo el estudio fueron 11, 9, 1, 4 y 5 (se enlistan de mayor a menor frecuencia). En el muestreo previo al tratamiento se presentó una mayor frecuencia de aberraciones en los cromosomas 5 y 11. Durante el tratamiento se observó mayor participación de los cromosomas 8 y 10 en alteraciones. Se observa una participación importante de los cromosomas 9, 11 y 1 después del tratamiento. Es importante señalar que el cromosoma 11 se mantuvo con una alta frecuencia de alteraciones durante los tres tiempos de muestreo.

Gráfica 4b. Frecuencia total de rupturas observadas por cromosoma



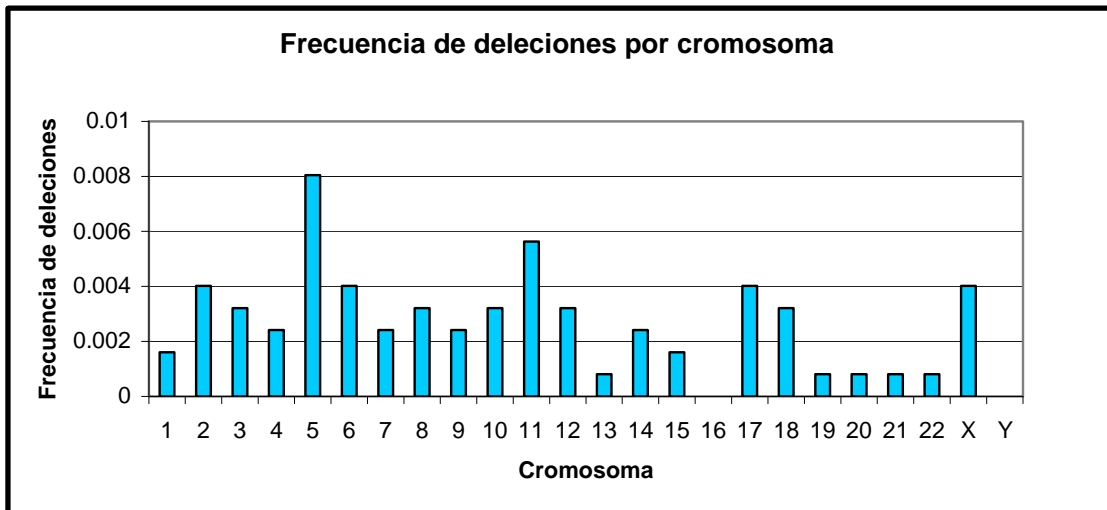
Se observa que los cromosomas que participaron con mayor frecuencia en rupturas fueron 4, 5, 9 y 17 (se enlistan de mayor a menor frecuencia). Puede observarse que en el 22 no se encontraron rupturas.

Gráfica 4c. Frecuencia total de translocaciones observadas por cromosoma



Los cromosomas con mayor participación en translocaciones fueron 11, 14, 9 y 1 (se nombran según la frecuencia con la que se involucraron en la alteración). Las translocaciones más observadas fueron  $t(1;7)$ ,  $t(6;11)$  y  $t(9;16)$  aunque en ninguna muestra constituyeron clonas

Gráfica 4d. Frecuencia total de deleciones observadas por cromosoma (antes, durante y después de tratamiento).



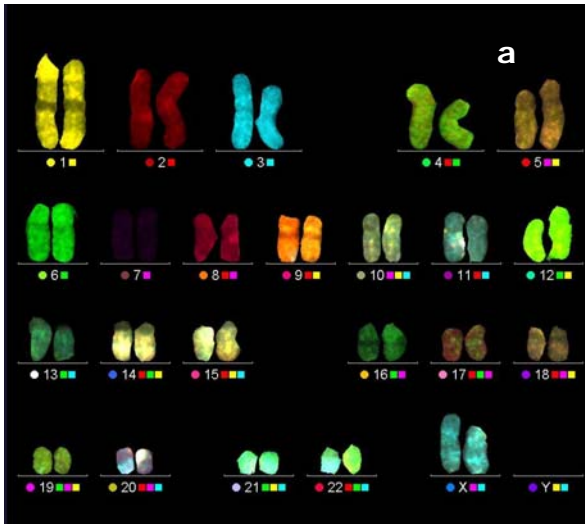
En la gráfica 4d se observa que el cromosoma 5 fue el más frecuentemente afectado por deleciones. La segunda frecuencia más importante se observó en el cromosoma 11. La tercera frecuencia más importante fue la que presentaron los cromosomas 2, 6, 17 y X, sin embargo no fue tan importante como la que se observó en los cromosomas 5 y 11. No se encontraron deleciones en los cromosomas Y ni 16.

### 6.5. Análisis estadístico.

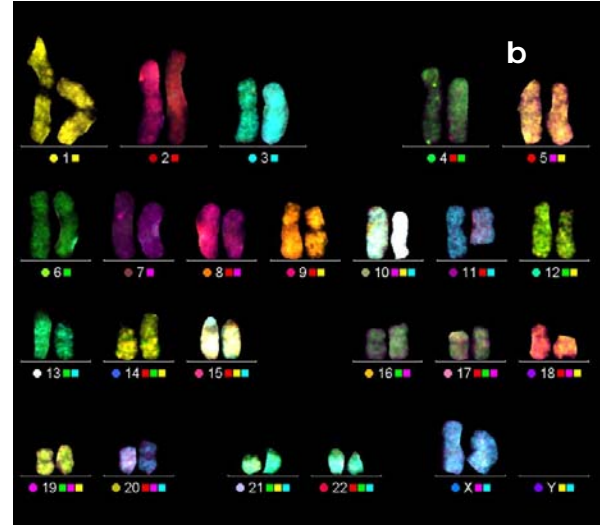
Por medio de la prueba estadística de Kruskal Wallis se determinó una diferencia significativa entre todos los grupos de estudio (sujetos control, pacientes antes, pacientes durante y pacientes después de tratamiento) ( $p < 0.05$ ).

Con la finalidad de realizar comparaciones entre pares de grupos se realizó la prueba de U-Mann Whitney. Mediante esta prueba se determinó que existe diferencia entre todos los grupos excepto entre el grupo de pacientes antes de tratamiento y el grupo durante tratamiento ( $p < 0.05$ ).

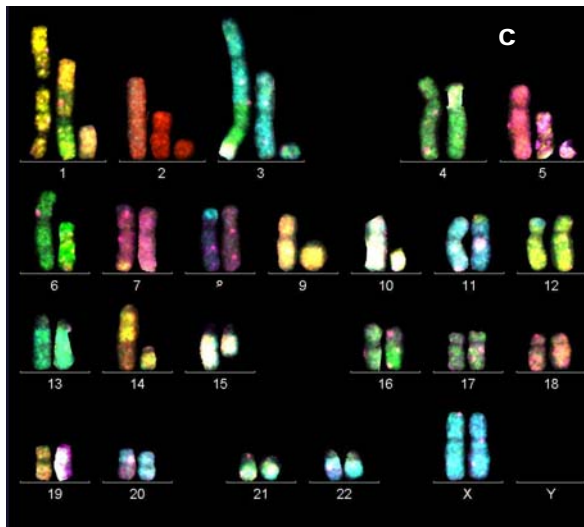
Figura 3. Se muestran cariotipos de pacientes con EH en diferentes tiempos de muestreo.



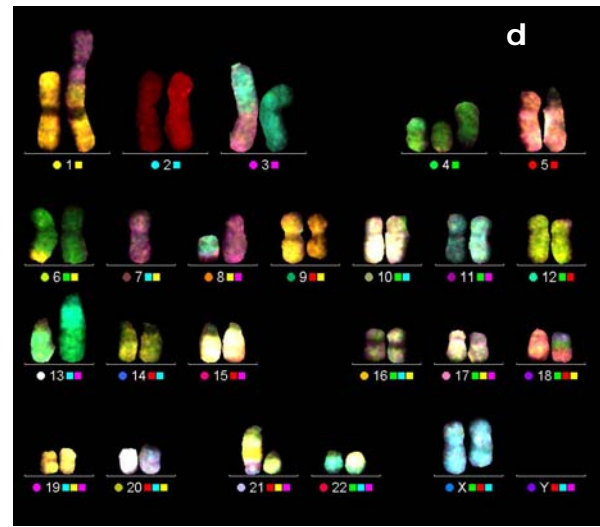
a. Cariotipo de paciente 118-I  
46,XX,dup(7p),dup(12q)



b. Cariotipo de paciente 118-II  
46,XX,del(11q)



c. Cariotipo de paciente 118-III  
44,XX,dic(1;9),der(1)t(1;14),del(2),inv(2),  
dic(3;6)t(3;6;10),der(7)t(7;14;20),t(8;22),  
der(10)t(6;10),t(11;12),der(14)t(2;14),del(14),  
der(16)t(6;16),der(20)t(7;20),  
ace(1),ace(2),ace(3),  
ace(9),chr(5q),chr(15q)

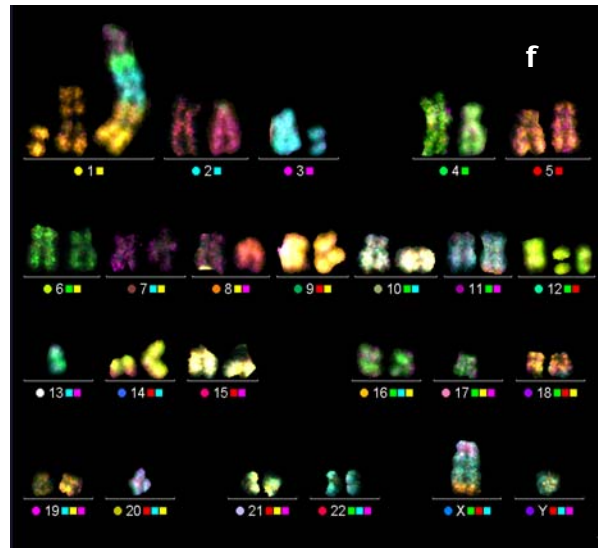


d. Cariotipo de paciente 118-III  
43,X,del(Xq),dic(1;7)(p31.2;p23),dic(3;8)(p11.2;p22),  
t(4;13),del(5p),der(6)t(1;6)(p32;q23.1),del(9q),  
der(15)t(15;18),der(18)t(X;6;18),del(20),  
der(21)t(9;19;21),-22,ace(3;8),ace(15;22),  
chrbdic(1;7)(1q),chr(4)

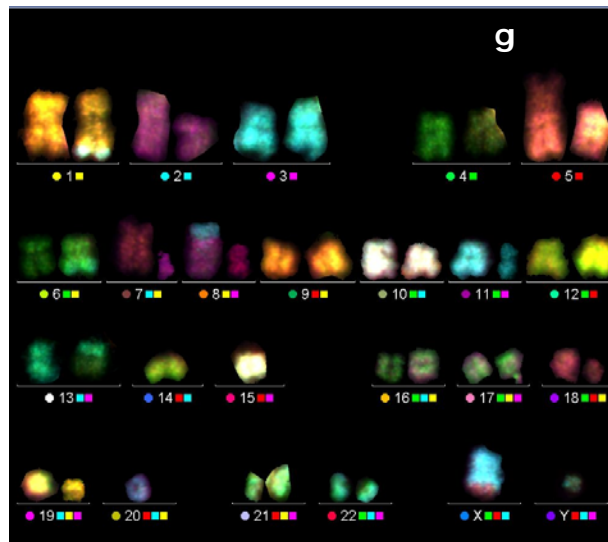




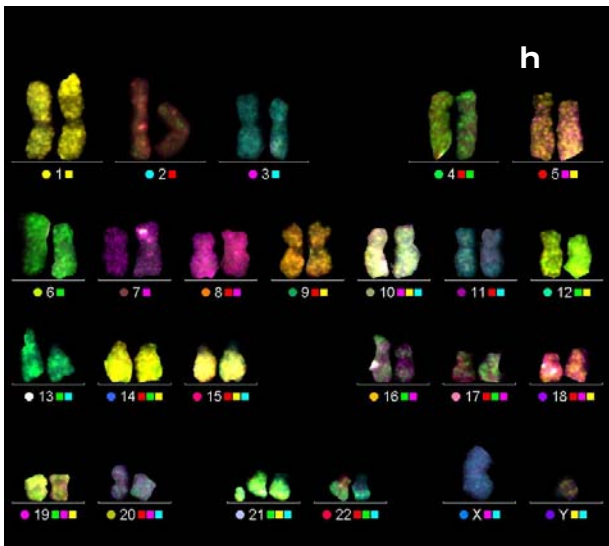
e. Cariotipo de paciente 109-I  
46,XY,del(5q),der(19)t(5;19)



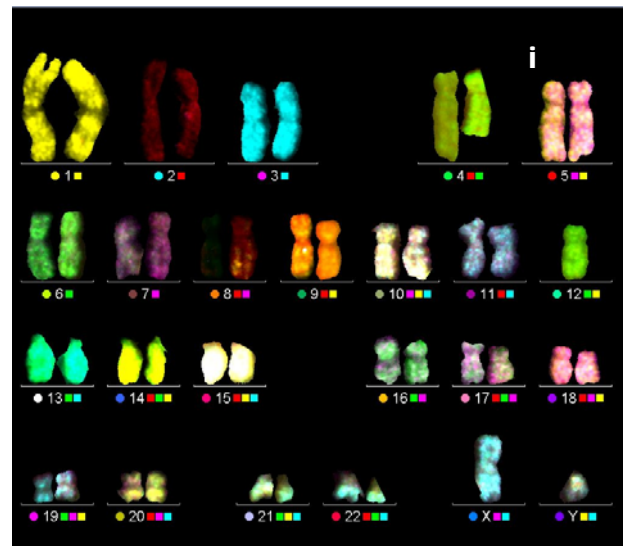
f. Cariotipo de paciente 109-II  
41,Y,dic(X;20)t(X;19;20),trc(1;3;8)t(1;3;8;13),inv(2),  
del(3p),dic(4;17),del(10)(p10),t(11;18),-13, ace(1),ace(3)  
chrB 12,



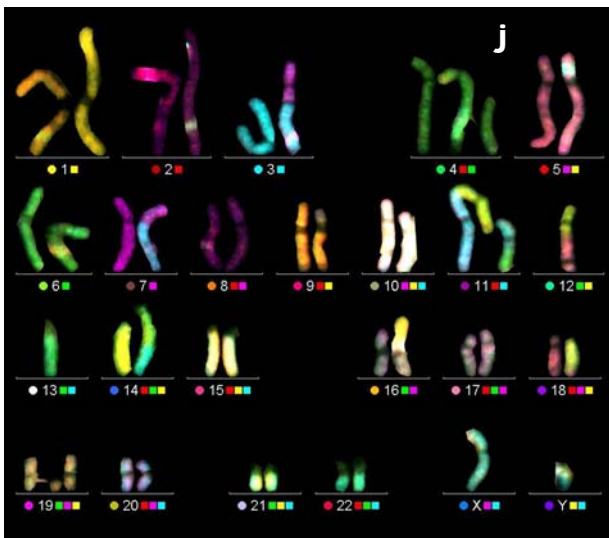
g. Cariotipo de paciente 109-III  
42,Y,der(X)t(X;18),t(1;10),dic(5;7),t(6;13),del(8),  
der(8)t(X;8),del(11),-14,-15,-20, ace(7) chtb 17



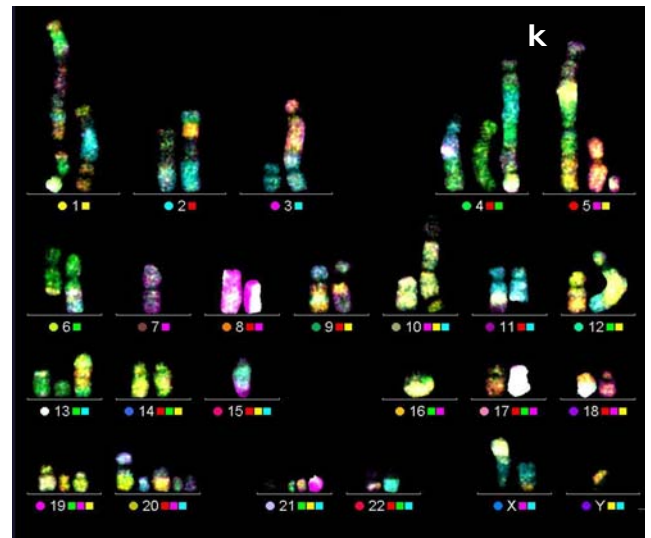
h. Cariotipo de paciente 122-I  
46,XY, chr21



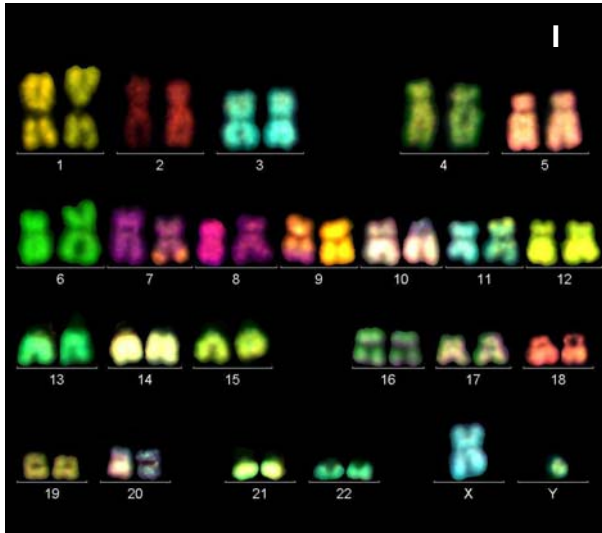
i. Cariotipo de paciente 122-II  
45,XY, del(4q),-12



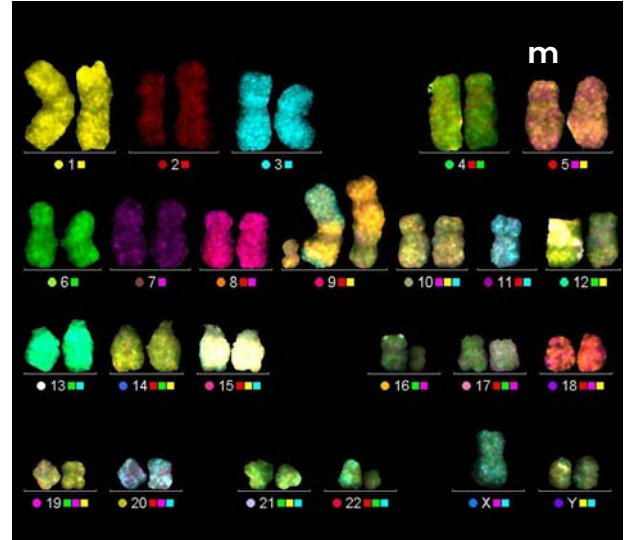
j. Cariotipo de paciente 122-III  
42,XY,dic(3;7),dic(4;13)t(4;12;13),der(6)t(6;13),  
t(9;16)(q10;p10),der(11)t(6;11)(p21;q13),dic(11;12),  
dic(12;18),der(14)t(11;14),ace(3;7),  
ace(4),ace(12;18) chrb19



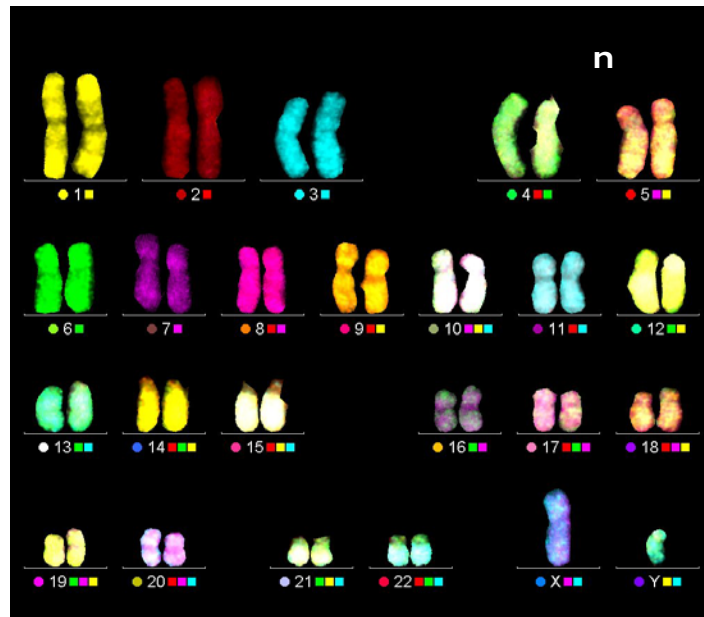
k. Cariotipo de paciente 122-III  
40,der(X)t(X;4),der(Y)t(Y;9),dic(1;12)(1;3;12),  
trc(1;13;21)t(X;1;2;6;13;21),der(2)t(2;3),  
der(2)t(2;3;9;13),der(3)del(3)(p13)del(3)(q21),  
dic(3;5),dic(4;7)t(1;4;7),del(5)(q32),der(6)t(6;14),  
der(6)t(6;11),del(7)(q33),trc(8;10;19),  
der(9)t(9;20;22),der(9)t(8;9;16),der(11)t(8;11;15),  
del(11)(q22),der(12)t(9;12),dic(13;15),dic(13;15),  
dic(15;16)t(2;3;6;15;16),der(16)r(15;16),der(19)t(15;19),  
+der(19)del(19)(p12),der(20)t(12;20),der(21)t(11;21),  
ace(X),ace(X;1),ace(5),ace(9;12;13),ace(9;20),ace(13),  
ace(19),chrb 20,chrb 20,chrb 21



l. Cariotipo de paciente 122-III  
 46,XY,t(7;9),t(10;20),t(9;11),der(11)t(11;15)



m. Cariotipo de paciente 128-III  
 45,XYY,dic(9;11)t(9;11;22),tas(9;16)(qter;pter),  
 del(22q),ace(9),ace(16)



n. Cariotipo de individuo normal (NL-35)  
 46,XY

---

## **7. DISCUSIÓN.**

Los avances logrados en cuanto al tratamiento del Linfoma de Hodgkin han ido en aumento en los últimos años, de manera que actualmente el pronóstico para estos pacientes es favorable en comparación con otros tipos de cáncer **(15,19)**.

El tratamiento más usado hoy en día para pacientes en estadios avanzados es la terapia ABVD en combinación con radioterapia; se ha reportado que los efectos adversos de esta terapia son menores a los que se han visto con otras, sin embargo debe estudiarse amplia y concretamente el efecto genotóxico de este esquema antineoplásico en células somáticas.

El estudio del efecto tóxico de la terapia sobre células somáticas como son los linfocitos es muy importante ya que el daño a estas células podría traducirse a largo plazo en segundas neoplasias, lo cual comprometería la calidad de vida del sobreviviente a EH. Además de que ya se ha comprobado que las alteraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica son un excelente biomarcador para el monitoreo del daño generado por la exposición a agentes genotóxicos **(52,53,54)**.

Se realizó la técnica de M-FISH para monitorear alteraciones cromosómicas en pacientes con Enfermedad de Hodgkin, ya que esta metodología además de ser muy eficiente ofrece información amplia y certera acerca del daño cromosómico que pudo haberse producido por la terapia antineoplásica ABVD/radioterapia. Esta metodología permite un análisis del genoma completo, además de que es posible resolver cariotipos con múltiples aberraciones estructurales de manera rápida y eficaz **(44,47)**.

---

Se analizaron siete pacientes con EH: cinco fueron muestreados longitudinalmente (antes, durante y después de tratamiento), y dos pacientes más, fueron analizados únicamente después de tratamiento; estos dos pacientes fueron incluidos en el estudio para tener mayor información acerca de las alteraciones producidas post-tratamiento, ya que estas dos muestras fueron tomadas 24 meses después de concluir la terapia, lo cual amplía el tiempo de monitoreo y nos permite observar si el daño persiste más allá de un año posterior a la terapia. Ya que se han observado alteraciones cromosómicas debidas a la terapia varios años después del tratamiento **(55)**.

Las muestras I (antes de tratamiento) fueron tomadas en el momento en que los pacientes fueron diagnosticados con EH, por lo que las alteraciones observadas en estas muestras puede ser un reflejo del daño propio de la enfermedad.

El segundo muestreo II (durante el tratamiento) fue obtenido en el tercer o cuarto ciclo de quimioterapia, por lo que el daño observado en estas muestras podría ser el producido por el esquema ABVD además del daño relacionado a la propia enfermedad.

Las muestras III fueron tomadas uno a dos años después de tratamiento, por lo que en éstas se vería reflejado el daño no solamente de ABVD sino también el de la radioterapia, ya que ésta última les fue dada al finalizar el esquema de fármacos antineoplásicos. Para observar únicamente el efecto de ABVD antes, durante y después de tratamiento sería necesario incluir pacientes que no hubieran recibido radioterapia pero esto resulta muy complicado ya que actualmente el tratamiento de elección es quimio-radioterapia.

---

- **ANÁLISIS POR GRUPO DE ESTUDIO (control, antes durante y después de tratamiento)**

### **Grupo Control.**

Se determinó la frecuencia de alteraciones para todos los individuos sanos entre 0 -0.021. Esta frecuencia puede ser considerada como la basal de alteraciones estructurales estables, y la que se observaría en sujetos sanos de nuestra población.

El tipo de alteraciones estructurales que se observaron con mayor frecuencia fueron de tipo inestable (rupturas cromatídicas), aunque también se encontraron translocaciones, deleciones, y dicéntricos pero se presentaron como evento de célula única por individuo.

Encontrar estas alteraciones en individuos sanos puede ser reflejo del continuo proceso de reparación que las células llevan a cabo para eliminar daño que el ADN llega a sufrir por factores endógenos o exógenos (56). También es necesario considerar que hay otros factores que podrían aumentar la incidencia de alteraciones cromosómicas en la población sana como la edad o el uso y consumo de sustancias dañinas como el cigarro y el café (57,58). Los individuos en este estudio pueden estar en esta situación ya que 4 de 5 son consumidores de café y cigarro.

### **Antes de tratamiento.**

Por medio de la prueba estadística U-Mann Whitney se determinó una diferencia significativa entre estas muestras y el grupo control ( $p < 0.05$ ) en cuanto a la frecuencia de alteraciones; la frecuencia en este grupo de estudio se encontró dentro del rango de 0.014 - 0.16.

Esta frecuencia puede considerarse propia de la enfermedad, ya que se ha reportado que los pacientes con EH pueden presentar una elevación en la frecuencia de anomalías cromosómicas al ser

---

comparados con la población sana **(42,52,59)**, los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con tales reportes.

En las muestras antes de tratamiento se observaron principalmente alteraciones inestables (rupturas). En cuanto a las estables, se encontraron translocaciones y deleciones, algunos de estos eventos fueron observados también en el grupo control pero en menor proporción.

En este estudio, los cromosomas involucrados en mayor número de alteraciones fueron el 5 y el 11. Trabajos previos han reportado alteraciones en estos cromosomas (5q31, 5p15, 11q23, 11q13) cuando se han analizado biopsias de nódulos linfáticos **(10)**; sin embargo en linfocitos de sangre periférica se han reportado alteraciones en: 1p, 6q, 7q, 4q, 11q. En este trabajo se encontró coincidencia con una elevada frecuencia de alteraciones en el cromosoma 11, sin embargo, debe tomarse con reserva debido a que se sabe que los pacientes con EH presentan una gran variedad de alteraciones y no se ha establecido hasta el momento, el o los tipos de alteraciones específicas de la enfermedad **(52,60)**.

#### **Durante tratamiento.**

Mediante la prueba de U-Mann Whitney se determinó que existe diferencia significativa entre las muestras de pacientes con EH durante tratamiento y las muestras de sujetos control ( $p < 0.05$ ), por otro lado, no se encontró diferencia significativa entre estas muestras y las muestras antes del tratamiento.

En estas muestras, al igual que en las previas al tratamiento, las alteraciones estructurales que se observaron con mayor frecuencia fueron: translocaciones, deleciones y las tipo inestables (rupturas). Es importante mencionar que aunque la frecuencia fue baja, también se observaron cromosomas dicéntricos y rearrreglos complejos (intercambios que involucraron tres o más puntos de ruptura en dos o más cromosomas); este tipo de alteraciones no se encontraron en las muestras antes de tratamiento, por lo que es probable que sean

---

consecuencia del daño causado por ABVD; esto mismo se ha sugerido en trabajos previos en los que se observó un incremento en el número de cromosomas dicéntricos después de la quimioterapia **(53)**.

En algunos casos se encontró que ciertas alteraciones observadas antes del tratamiento persistieron después de la quimioterapia, esto indica que probablemente en ese momento las dosis de ABVD aún no eran las suficientes para eliminar todas las células con daño; ya que en este punto del monitoreo todavía no se tenían completados los ciclos de quimioterapia. Las alteraciones que persistieron antes y durante el tratamiento son: dup(7),del(11q),del(17p),del(5p), la potencial importancia de algunas de estas aberraciones se discute más adelante.

#### **Después de Tratamiento:**

Por medio de las pruebas estadísticas de Kruskal Wallis y U-Mann Whitney se encontró una diferencia significativa entre las muestras después de tratamiento y el grupo control. También se encontró diferencia entre este grupo y los grupos antes y durante ( $p < 0.05$ ).

Es importante hacer notar que en 4 de 5 pacientes se presentó una elevación de alteraciones cromosómicas después de la terapia. (Gráfica 2a, 2b)

En dos de los pacientes (122 y 118), se observó un incremento severo en la frecuencia de alteraciones después de la terapia, en los pacientes 109 y 66 también se observó un incremento pero éste fue moderado y en el paciente 111 se encontró una disminución de aberraciones post-tratamiento (Gráfica 2a), sin embargo en el análisis de ACE estables (Gráfica 2b) se observa que esta disminución es menos abrupta que cuando se consideraron rupturas; es posible observar que en la muestra durante tratamiento la frecuencia de



---

alteraciones se ve elevada pero este incremento es debido principalmente a aberraciones de tipo inestable.

Es importante considerar que en este tipo de muestras (III) no solamente se analiza el daño debido a la quimioterapia, sino también se ve el efecto de la radioterapia. Es posible que el incremento abrupto en alteraciones como dicéntricos y translocaciones sea mayormente debido a la radioterapia, ya que se ha mostrado en análisis previos que la radioterapia causa una elevación en la frecuencia de este tipo de alteraciones **(52,59,61)**.

En este trabajo se encontró una mayor frecuencia de alteraciones después de la quimio/radioterapia que las encontradas en otros estudios. Sin embargo esto puede deberse a una diferencia en las metodologías empleadas ya que en los trabajos previos se hizo el análisis por medio de Bandas G o por medio de FISH por pintado completo de ciertos cromosomas. **(Tabla 8)**, sin embargo se encuentra coincidencia con el hecho de encontrar una elevación en la frecuencia de aberraciones después de la radiación **(52,53,59)**.

Por otro lado, el estudio realizado por Pouzolet et. al. (2007) refleja únicamente el efecto de la radioterapia, de este estudio se puede estimar que para una dosis de 30Gy se esperaría una frecuencia de translocaciones cercana a 0.25. En este estudio se encontró una frecuencia de translocaciones de 0.312 (Tabla7); la comparación de este valor con el que se estimó como propio al daño causado por la radioterapia (0.025) sugiere que, al menos con respecto a la frecuencia de translocaciones, la radioterapia tiene mayor contribución que la que tiene la quimioterapia **(61)**.

**Tabla 8. Frecuencia de alteraciones encontradas en otros estudios.**

Estudio	Quimioterapia	Metodología	Dosis de radiación	Alteraciones analizadas	Frecuencia alteraciones atribuidas a QT	Frecuencia alteraciones atribuidas QT+RT	Frecuencia alteraciones atribuidas RT
Bilban, et al 2001	MOPP/ABV	Bandas G	24-35Gy	dicéntricos	0.03	0.04	-
Lálic H, et al 2001	v,ABD	Bandas G	40 Gy	dicéntricos	-	0.065	-
M´Kacher, et al 2003	ABVD	Pintado de cromosomas 1,3,4	20-40Gy	translocaciones + dicéntricos + rupturas	0.096	0.33	-
Pouzoulet, et al 2007	-	M-FISH	0 Gy 12 Gy 50 Gy	translocaciones	-	-	0.086 0.14 0.373
Este estudio	ABVD	M-FISH	30-40Gy	translocaciones dicéntricos rupturas TOTAL	0.0459 0.0102 0.0562 0.1123	0.3115 0.0874 0.1311 0.53	-

\*\*En todos los estudios el tratamiento consistió de quimioterapia y radioterapia, excepto en el de Pouzoulet, et al. (sólo radioterapia)

---

- **ANÁLISIS DEL TIPO DE ALTERACIONES ENCONTRADAS.**

A lo largo del monitoreo se observó un aumento de alteraciones tanto numéricas como estructurales, sin embargo la contribución de las alteraciones numéricas fue mucho menor que la que presentaron las de tipo estructural. Debido a esto el análisis se enfocó en las alteraciones estructurales (Gráfica 1). Esto indica que el efecto de la vinblastina no es tan negativo como el del resto de los agentes ya que de entre los fármacos empleados éste es el que podría generar aneuploidías **(34)**.

El tipo de alteraciones estructurales observadas cambió después de tratamiento (Fig.3). En general, casi todos los tipos de alteraciones se incrementaron en estas muestras, especialmente deleciones, translocaciones, dicéntricos y los rearrreglos complejos (Gráfica 3). Los rearrreglos cromosómicos identificados en este tipo de muestras (uno a dos años después del tratamiento) sugieren que la terapia podría haber afectado a las células madre, ya que generaron células hijas con daño que no fue detectado ni reparado. Esto es un indicativo de que el efecto de la terapia ABVD/radioterapia es permanente hasta dos años después del tratamiento **(55)**.

Entre los mecanismos que se han propuesto para la formación de rearrreglos genómicos, se conocen dos que involucran el proceso de recombinación: la recombinación homóloga no alélica (NAHR) y la unión de extremos no homólogos (NHEJ); y uno más que involucra el proceso de replicación **(62,63)**.

Es muy probable que en las células expuestas a los agentes de la terapia en estudio se hayan llevado a cabo procesos de recombinación como NEHJ ya que se sabe que tanto los agentes antineoplásicos que conforman la quimioterapia ABVD así como la radioterapia, producen sobre todo rupturas de doble cadena (DSB) y este tipo de daño es reparado principalmente por procesos de

---

recombinación homóloga (HR) o unión de extremos no homólogos (NHEJ) **(64-67)**.

Esto resulta de gran importancia ya que se ha visto que en células somáticas, mecanismos como NEHJ pueden generar inestabilidad cromosómica y por lo tanto pueden producir cáncer **(62,63,66,67)**; lo que comprometería en gran medida el pronóstico de los sobrevivientes a EH, debido a que podrían desarrollar segundas neoplasias.

- **ANÁLISIS DE ALTERACIONES EN CADA CROMOSOMA**

**Alteraciones inestables.** En cuanto a las rupturas, se encontró que los cromosomas con mayor frecuencia de rupturas fueron el 4 (0.0088) y el 5 (0.0080), así como los cromosomas 9(0.0056) y 17(0.0056) (Gráfica 4b).

Es posible pensar en que las rupturas en los cromosomas 4 y 5 se deban a que son cromosomas grandes y por tanto tienen altas probabilidades de presentar daño, pero los cromosomas 9 y 17 no están en la misma situación. Alteraciones en el cromosoma 17 resultan críticas ya que pueden tener como blanco al gen *TP53*, que es un regulador del ciclo celular, por lo que las aberraciones en el cromosoma 17 pueden llegar a traducirse en fallas en el control del ciclo celular y por lo tanto podría generar cáncer **(69)**. Es posible que las rupturas observadas en este estudio comprometan a este gen, ya que las rupturas se presentaron más frecuentemente en el brazo corto (p) y en este brazo (p13) se encuentra el gen *TP53* **(68,70)**.

Cabe resaltar que la ruptura cromosómica en 17(p10) fue la única alteración que se encontró como clona (Paciente 109-III), por lo que en este caso se podría pensar en la posibilidad de que existiera una alteración directa en las células madre y no sólo en los mecanismos de reparación.

---

Es importante mencionar que además de encontrarse rupturas, se llegaron a encontrar deleciones [del(17p)], y en un caso (paciente 111) esta alteración se encontró tanto antes como durante el tratamiento, lo cual indica que hasta ese momento esta importante alteración no había sido eliminada.

Por otro lado, las rupturas en el cromosoma 9 involucraron tanto al brazo corto como al largo. Estas rupturas resultan importantes ya que en este cromosoma se encuentra el gen *NOTCH1* (9q34) que codifica para un receptor de membrana que regula el correcto desarrollo de los linfocitos T **(71)**. Este gen presenta mutaciones en un gran número de casos de leucemia aguda linfoblástica **(71,72)**.

**Alteraciones estables.** En cuanto a las deleciones encontradas, los cromosomas que presentaron mayor frecuencia de este tipo de alteración fueron los cromosomas 5 (0.008) y 11 (0.0056).

Se encontraron casi el mismo número de deleciones en el brazo corto que en el brazo largo del cromosoma 5. Las deleciones en 5q son importantes ya que esta alteración es característica en cierto grupo de pacientes con síndrome mielodisplásico (MDS). Este desorden hematológico puede aparecer “de novo” o puede aparecer como consecuencia de un tratamiento quimioterapéutico “relacionado a tratamiento (tr-MDS)” **(73,74,75)**, por lo que los pacientes con EH tendrían altas posibilidades de desarrollar esta enfermedad debido a que recibieron tratamiento quimioterapéutico, y más aún, podrían desarrollar leucemia mieloide aguda (AML) ya que es común que se presente esta enfermedad como consecuencia del síndrome mielodisplásico (MDS/AML).

---

Por otro lado, también se encontró una elevada frecuencia de deleciones del cromosoma 11, en todos los casos del brazo largo. Estas deleciones pueden resultar en alteraciones en el gen *MLL* (11q23) que regula a otros genes relacionados con el proceso de hematopoyesis **(76)**. Al igual que la deleción 5q, las deleciones de 11q son comunes en casos de síndrome mielodisplásico relacionado a tratamiento. Se ha visto que las deleciones en 5q son más comunes después del tratamiento con agentes alquilantes y las deleciones en 11q después de tratamiento con inhibidores de la topoisomerasa II **(71,73,76,77)**. Las alteraciones en 11q también se han encontrado en leucemia crónica linfocítica **(70,78)**.

A parte de *MLL*, en el cromosoma 11 también se encuentra el gen *ATM* (11q22.3-q23.1), que juega un papel importante al iniciar los puntos de control del ciclo celular tras haber una lesión de doble cadena (DSB), por lo que las alteraciones observadas en 11q bien podrían afectar a este gen que se ha relacionado a radiosensibilidad, riesgo de cáncer (leucemia prolinfocítica) e inestabilidad cromosómica **(79)**.

El tipo de alteración que aumentó abruptamente en las muestras después de tratamiento fueron las translocaciones. Los cromosomas más involucrados en este tipo de rearrreglos fueron el 11(0.024), 14(0.024) y 1(0.023) siendo estos cromosomas los más involucrados en intercambios. En estudios anteriores también se han visto translocaciones de estos cromosomas en diferentes neoplasias.

Translocaciones en el cromosoma 11 que involucran al gen *MLL* (11q23) se han asociado a leucemias agudas, en las que se han observado diversos rearrreglos que afectan a este gen que se transloca con diferentes cromosomas **(76,77)**.

---

Otras enfermedades en las que se han observado alteraciones en estos cromosomas son: leucemia aguda linfoblástica, leucemia linfocítica crónica de células B, linfoma difuso de células B (grandes). **(70,76,80-82).**

También se han reportado rearrreglos que involucran a los cromosomas 1 y 14 en diversos linfomas de células B como linfoma folicular [t(14;18)], linfoma de tejido asociado a mucosa [t(1;14)] y linfoma de células del manto [t(11;14)] **(68)**; así como en leucemia aguda linfoblástica en la que se han reportado los puntos de ruptura 14q11, 14q32 (gen *IGH*) y 1p32 (gen *TAL1*) **(83,84).**

Aunque se observó una gran diversidad de translocaciones, las más frecuentes fueron: t(6;11), t(1;7) y t(9;16). Estas translocaciones se encontraron en algunos casos balanceadas y en otros desbalanceadas, en todos los casos presentaron puntos de ruptura diferentes. En ninguna muestra constituyeron clonas.

En la base de datos de rearrreglos asociados a cáncer (desórdenes hematológicos) se reportan múltiples translocaciones que involucran a los cromosomas antes mencionados pero con diferentes puntos de ruptura, las que presentan mayor similitud con las encontrados en este estudio (TABLA 4) se mencionan a continuación:

**(85,86).**

-Algunos puntos de ruptura reportados para la t(1;7):

(q10;p10), (p14;p11), (p32;p15), (q31;q21), (p36;p11), (p32;p15)

-Algunos puntos de ruptura reportados para la t(6;11):

(q27;q23), (q24;p15), (p23-p25;q13), (p?21;q21), (p10;q10) y der(11)t(6;11)(p?;p?)

---

-Algunos puntos de ruptura reportados para t(9;16):

(q11;p11),(q22;p11),(q34;p11),(q22;p13),(q12;p13),(q11;q24)

Como ya se mencionó, las translocaciones encontradas en este estudio presentan cierta similitud con las ya descritas, sin embargo en las que se observa mayor coincidencia son las siguientes: (se muestra el desorden hematológico con que se les ha asociado)

t(1;7)(q10;p10) : leucemia relacionada a tratamiento

t(1;7)(p36;p11) : asociada a leucemia crónica mieloide

t(6;11)(p23-25;q13) : leucemia mieloide aguda

t(9;16)(q11;p11) : linfoma de células T

Como se puede observar, las alteraciones encontradas en este trabajo podrían relacionarse estrechamente con lo descrito en casos de leucemia, especialmente en aquella que resulta como consecuencia a un tratamiento.

El hecho de que se observe mayor frecuencia de alteraciones y que la complejidad de los rearrreglos aumente después del tratamiento, sugiere que la terapia ABVD/radioterapia tiene efectos genotóxicos permanentes y de acuerdo al hecho de no constituir clonas (excepto paciente 109-II que presentó una clona) podría sugerirse que lo afectado por la terapia son los mecanismos de reparación involucrados en las células madre **(42,55)**.

En los pacientes estudiados no se encontró relación entre una mayor incidencia de alteraciones cromosómicas y el estadio, el tipo de la enfermedad de Hodgkin, la edad o el sexo del paciente. Tampoco correlacionaron los hábitos de los pacientes con un mayor número de ACE. En reportes previos en pacientes con otros tipos de cáncer (leucemia mieloide aguda) se ha observado que los únicos factores que influyen en el pronóstico del paciente son la edad y el hecho de



---

que tengan cariotipos complejos **(74)**. Es posible que los pacientes aquí estudiados en los que se encontraron cariotipos tan complejos tengan un riesgo mayor, ya sea de recaer en la enfermedad o de desarrollar otro tipo de cáncer, estos datos podrían coincidir con la frecuencia de sobrevivientes que desarrollan leucemia como consecuencia del tratamiento **(37)**.

Es importante ampliar la población de estudio, así como dar seguimiento a los pacientes de este trabajo, para obtener más datos acerca del daño que genera la terapia ABVD/radioterapia y el comportamiento de los individuos, ya que a pesar de que ha sido establecida como terapia de elección, existen reportes tanto de falla como de recaídas del linfoma **(19,87)** y en este estudio se ha encontrado que a largo plazo aumenta la frecuencia de alteraciones cromosómicas en células somáticas.

Entre más extensa sea la información acerca del tipo y severidad de daño que causa la terapia ABVD/radioterapia, se podrá revalorar si esta terapia debe ser considerada como la que ofrece mejor respuesta y menor toxicidad. Así mismo, se debe extender la evaluación de la participación de la radiación en el efecto tóxico de la terapia, ya que quizá sea menor el daño si se reducen al mínimo las dosis y los campos irradiados. **(61,88)**

Por otro lado, también resulta importante evaluar el efecto de AVBD/radioterapia en células germinales ya que alteraciones cromosómicas en estas células podrían comprometer la vida reproductiva del sobreviviente a EH. (Parte del proyecto al que pertenece este trabajo es el estudio en células germinales)

---

## **8. CONCLUSIONES.**

-Por medio de la metodología de M-FISH fue posible el estudio cromosómico longitudinal de pacientes sobrevivientes a EH tratados con la terapia ABVD/radiación; encontrándose una diferencia significativa entre los pacientes con EH y la población sana. No se encontraron diferencias significativas antes y durante la terapia; sin embargo, se observó que la frecuencia de daño cromosómico así como la complejidad de las alteraciones aumenta después del tratamiento y este daño persiste hasta dos años de haber concluido la terapia.

-Los resultados sugieren que la terapia ABVD/radioterapia tiene efecto genotóxico sobre células madre, por lo que es posible observar alteraciones cromosómicas inducidas por la terapia hasta dos años después de haberla recibido; este hallazgo es importante ya que el daño encontrado puede incrementar en gran medida la probabilidad de que se generen segundas neoplasias.

-Son muy valiosos los estudios acerca de los tratamientos para la EH ya que a diferencia de muchos tipos de cáncer, la tasa de supervivencia es alta, por lo que es necesario lograr que la terapia sea la más efectiva y la menos genotóxica.

-La metodología de M-FISH resultó óptima para el amplio monitoreo de aberraciones cromosómicas en pacientes con EH ya que se encontró un gran número de cariotipos complejos.

---

## **9. REFERENCIAS.**

1. Martínez-Ávalos A. **Enfermedad de Hodgkin**. En: Rivera-Luna R. Diagnóstico del niño con cáncer. Mosby/Doyma libros. Madrid, 1994. p 143-150.
2. Olaya A. **Linfoma de Hodgkin**. En: Rivera-Luna R. El niño con cáncer; los padecimientos más comunes para el médico no especialista. Editores de Textos Mexicanos. México, 2007. p 61-74.
3. García-Vidrios V. (2002). **Actualidades en Linfomas y mieloma**. Gaceta Méd Méx 138(1):106-109.
4. Ceballos, F. y Cedeño, M. (2002). **Enfermedad de Hodgkin**. Oncol. 12 (1-2): 32-39.
5. Re D, Küppers R, Diehl V. (2005). **Molecular Pathogenesis of Hodgkin's Lymphoma**. J Clin Oncol 23(26):6379-6386
6. Meyer MR, Ambinder R, Stroobants S. (2004). **Hodgkin's Lymphoma: Evolving concepts with implications for practice**. American Society of Hematology: 184-202.
7. Hartmann S, Martín-Subero J I, Gesk S, Hüsken J, Giefing M, Nagel I, Riemke J, Chott A, Klapper W, Parrens M, Merlio J P, Küppers R, Bräuninger A, Siebert R, Hansmann M L. (2008). **Detection of genomic imbalances in microdissected Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's lymphoma by array-based comparative genomic hybridization**. Haematologica. 93(9):1318-1326
8. Canioni D, Deau-Fischer B, Taupin P, Ribrag V, Dejarue R, Bosq J, Rubio M T, Roux D, Vasiliu V, Varet B, Brousse N, Hermine O. (2009). **Prognostic significance of new immunohistochemical markers in refractory classical Hodgkin Lymphoma: A study of 59 cases**. PLoS ONE. 4(7): e6342.doi: 10.1371/journal.pone.0006341
9. Weber-Matthiesen K, Deerberg J, Poetsch M, Grote W, Schlegelberger B. (1995). **Numerical chromosome aberrations are present within the CD30 + Hodgkin and Reed-Sternberg cells in 100% of analyzed cases of Hodgkin's disease**. Blood, 86 (4): 1464-1468.

- 
10. Schouten HC, Sanger WG, Duggan M, Weisenburger DD, MacLennan KA, Armitage JO. (1989). **Chromosomal Abnormalities in Hodgkin's Disease**. *Blood*, 73 (8): 2149-2154
  11. Hochberg J, Waxman IM, Kelly KM, Morris E, Cairo MS.(2008). **Adolescent non-Hodgkin Lymphoma and Hodgkin Lymphoma:state of the science**. *Br J Haematol*. 2009 Jan; 144(1):24-40. Review
  12. Hasserjian R P, Ott G, Elenitoba-Johnson K S J, Balague Ponz O, de Jong D, de Leval L. (2009). **Commentary on the WHO classification of tumors of lymphoid tissues (2008):"Gray zone" lymphomas overlapping with Burkitt lymphoma or classical Hodgkin lymphoma**. *J Hematopathol*. 2:89-95. doi:10.1007/s12308-009-0039-7
  13. Slapak CA, Kufe DW. **Principios del tratamiento del cancer**. En: Harrison,T.R. 1998. Principios de medicina interna. Mc Graw-Hill. Madrid, Sexta parte oncología y hematología. Pp 594-607
  14. Carde P, Hagenbeek A, Hayat M, Monconduit M, Thomas J, Burgers MJ, Noordijk EM, Tanguy A, Meerwaldt JH, Le Fur R, Somers R, Kluin-Nelemans HC, Busson A., Breed WP, Bron D, Holdrinet A, Rutten EHJM, Michielis JJ, Regnier R, Debusscher L, Musella R, Fargeot P, Thyss A, Cattani A, Rigal-Huguet F, Roth S, Caillou B, Dupouy N, Henry-Amar M. (1993). **Clinical staging versus laparotomy and combined modality with MOPP versus ABVD in early-stage Hodgkin's disease: The H6 twin randomized trials from the European organization for research and treatment of Cancer Lymphoma Cooperative Group**. *J. Clin. Oncol* 11 (11): 2258-2272.
  15. Connors JM. (2005). **State-of-the-Art-therapeutics: Hodgkin's Lymphoma**. *J. Clin. Oncol* 23 (26): 6400-6408.
  16. Buchler T, Bomanji J, Lee S M. (2007). **FDG-PET in bleomycin-induced pneumonitis following ABVD chemotherapy for Hodgkin's disease- a useful tool for monitoring pulmonary toxicity and disease activity**. *Haematologica*. 92:e120-e121 doi: 10.3324/haematol.11856
  17. Gota V S, Purandare N C, Gujral S, Shah S, Nair R, Rangarajan V. (2009). **Positron emission tomography/computerized tomography evaluation of primary Hodgkin's disease of liver**. *Indian J Cancer*. 46(3): 237-239

- 
18. Radford J. (2008). **Limited-stage disease: optimal use of chemotherapy and radiotherapy treatment.** Hematology. 321-325
  19. Diehl V. (2003). **Advanced Hodgkin's disease: ABVD is better, yet is not good enough!** J. clin. Oncol. 21(4): 583-585.
  20. Acquatella G, Somoza R, Desenne J, Muller A, Torres MA, Tovar E, Urdaneta N, Perera A, Borrego M, de Jongh C, Arbona E, Travieso O. (2002). **Tratamiento de la Enfermedad de Hodgkin esquema MOPP /ABV, toxicidad (2a neoplasia) seguimiento durante 10 años.** Rev. Venez. Oncol. 14 (4): 190-197.
  21. Ng AK, Bernardo MV, Weller E, Backstrand K, Silver B, Marcus KC, Tarbell NJ, Stevenson MA, Friedberg JW, Mauch PM. (2002). **Second malignancy after Hodgkin disease treated with radiotherapy with or without chemotherapy: long-term risks and risk factors.** Blood 100(6):1989-96.
  22. Bonadonna G, Zucali R, Monfardini S, De Lena M, Uslenghi C. (1975). **Combination chemotherapy of Hodgkin's disease with adriamycin, bleomycin, vinblastine, and imidazole carboxamide versus MOPP.** Cancer 36:252-259.
  23. Brandt L, Kimby E, Nygren P, Glimelius B. (2001). **A systematic overview of chemotherapy effects in Hodgkin's disease.** Acta Oncologica 40(2/3):185-197
  24. Duggan DB, Petroni GR, Johnson JL, Glick JH, Fisher RI, Connors JM, Canellos GP, Peterson BA. (2003). **Randomized comparison of ABVD and MOPP/ABV hybrid for the treatment of advanced Hodgkin's disease: Report of an intergroup trial.** J. Clin Oncol 21 (4): 607-614.
  25. Sánchez-Sandoval S. (2006). **Detección de aneuploidías en espermatozoides de pacientes con Enfermedad de Hodgkin tratados con quimioterapia.** Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM.

- 
26. van Leeuwen FE, Klokman WJ, van 'tVeer MB, Hagenbeek A, Krol ADG, Vetter UAO, Scaapeveld M, van Heerde P, Burgers JMV, Somers R, 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(3): 487-497.
  27. Swerdlow AJ, Barber JA, Hudson GV, Cunningham D, Gupta RK, Hancock BW, Horwich A, Lister TA, Linch DC. (2000). **Risk of second malignancy after Hodgkin's disease in a collaborative British cohort: the relation to age at treatment.** J Clin Oncol. 18(3):498-509.
  28. Gustavsson A, Osterman B, Cavallin-Stahl E. (2003). **A systematic overview of radiation therapy effects in Hodgkin's lymphoma.** Acta Oncologica 42(5/6):589-604
  29. El Din M A A, Hughes K S, Raad R A, Godberg S I, Aisenberg A C, Niemierko A, Taghian A G. (2009). **Clinical outcome of breast cancer occurring after treatment for Hodgkin's lymphoma: case-control analysis.** Radiation Oncology. 4:19. doi:10.1186/1748-717X-4-19
  30. Krishnan B, Morgan GJ. (2007). **Non-Hodgkin Lymphoma Secondary to Cancer Chemotherapy.** Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 16(3): 377-380
  31. Slapak C, Kufe D. **Principios de l tratamiento del cáncer.** (1998) en: Harrison TR. Principios de medicina interna. Mc Graw Hill, Madrid, pp 596-611.
  32. Martínez-Ávalos A, Cardós CR. **Efectos tard íos de l tratamiento oncológico.** En: Rivera-Luna R. Diagnóstico del niño con cáncer. Mosby/Doyma libros. Madrid, 1994. p 71-75
  33. Rivera-Luna R. **Principios Generales de Quimioterapia** En: Rivera-Luna R. Diagnóstico del niño con cáncer. Mosby/Doyma libros. Madrid, 1994. p 27-58
  34. Morales AJ. **Quimioterapia ant ineoplásica.** (2004). Biocáncer (1):1-23
  35. Mehta D K, Ryan R S M, Hogerzeil H. **Antineoplásicos, inmunosupresores y fármacos utilizados en los cuidados paliativos** (2004). En: Formulario Modelo de la OMS. Sección 8. Editorial Pharma Editores. 1ª Edición. pp 183-201.

- 
36. Lowenthal M R, Eaton K. (1996). **Toxicity of chemotherapy.** Hematology/Oncology Clinics of North America 10(4):967-990
37. Brusa G, Zuffa E, Hattinger C M, Serra M, Remondini D, Castellani G, Righi S, Campidelli C, Pileri S, Zinzani P L, Gabriele A, Mancini M, Corrado P, Barbieri E, Santucci M A. (2007). **Genomic imbalances associated with secondary acute leukemias in Hodgkin lymphoma.** Oncology Reports. 18: 1427-1434
38. Hall J, Marcel V, Bolin C, Fernet M, Tartier L, Vaslin L, Hainaut P. (2009). **The associations of sequence variants in DNA-repair and cell-cycle genes with cancer risk: genotype-phenotype correlations.** Biochem Soc Trans. (3):527-533
39. Klug William S, Cummings Michael R, Spencer C A, **Conceptos de Genética**, Pearson-Prentice Hall, 8ª edición, Madrid, 2006, pp 213-237
40. ISCN 2005. **An International System for Human Cytogenetic Nomenclature.** Ed: Shaffer L G, Tommerup N. Karger en colaboración Cytogen Gen Res. 130 pp.
41. Edwards A A, Szuinska M, Lloyd D C. (2007). **Reconstruction of doses from ionizing radiation using fluorescence in situ hybridization techniques.** Br J Radiol. 80: S63-S67. doi:10.1259/brj/24766640
42. Salas-Labadía C. (2006). **Efectos genotóxicos secundarios al tratamiento antineoplásico en linfocitos de sobrevivientes con Enfermedad de Hodgkin.** Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias, UNAM
43. Teixeira MR. (2002). **Combined classical and molecular cytogenetic analysis of cancer.** Eur J Cancer. (38) 1580-1584
44. Speicher RM. (2005) **Fluorescence In situ Hybridization (FISH) Techniques.** Encyclopedia of life sciences, John Willey & Sons. doi:10.1038/npg.els.0005779
45. Jeffrey M, Levisky, Singer RH. (2003). **Fluorescence in situ hybridization: past, present and future.** J Cell Sci 116: 2833-2838

- 
46. Boehringer Mannheim Biochemicals. (1992). **Nonradioactive In Situ Hybridization**. Application Manual. Boehringer Mannheim GmbH Biochemicals. Germany 79p.
47. Romana PS, Vekemans M. (2005). **Clinical Molecular Cytogenetics**. Encyclopedia of life sciences, John Willey & Sons. doi: 10.1038/npg.els.0005573
48. Eils R, Uhring S, Saracoglu K, Sätzler K, Bolzer A, Petersen I, Chassery J, Ganser M, Speicher M R. (1998). **An optimized, fully automated system for fast and accurate identification of chromosomal rearrangements by multiplex-FISH (M-FISH)**. Cytogenet Cell Genet. 82(3-4):160-171
49. Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T. (1996). **Multicolor Spectral Karyotyping of Human Chromosomes**. Science. 273(5274):494-7
50. Lee C, Gisselsson D, Jin C, Nordgren A, Ferguson D O, Blennow E, Fletcher JA, Morton C C. (2001). **Limitations of chromosome classification by multicolor karyotyping**. Am J Hum Genet. 68(4):1043-7.
51. Vysis. 2006. Abbott Molecular Inc. Spectra Vysion Assay Protocol. USA.
52. Lalic H, Radosevic, 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
53. Bilban-Jakopin C, Bilban M. (2001). **Genotoxic effects of radiotherapy and chemotherapy on circulating lymphocytes in patients with Hodgkin's disease**. Mut Res 497: 81-88
54. Balachandar V, Lakshman KB, Sasikala K, Manikantan P, Sangeetha R, Mohana DS. (2007). **Identification of a high frequency of chromosomal rearrangements in the centromeric regions of prostate cancer patients**. J Zhejiang Univ Sci B. 8(9):638-646



- 
55. Ryabchenko N, Nasanova V, Anthoschina M, Fesenko E, Kondrashova T, Ivanova T, Pavlov V, Ryabikhina N, Terekhova A. (2003). **Persistence of chromosome aberrations in peripheral lymphocytes from Hodgkin's lymphoma remission patients.** *Int J of Radiat Biol.* 79(4):251-257
56. Bowater R P, Borts R, White M F. (2009). **DNA damage: from causes to cures.** *Biochem Soc Trans.* 37, 479-481; doi: 10.1042/BST0370479
57. Barale R, Chelotti L, Davini T, Del Ry S, Andreassi MG, Ballardini M, Bulleri M, He J, Baldacci S, Di Pede F, Gemignani F, Landi S.(1998). **Sister chromatid exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1,650 subjects in an Italian population: II Contribution of sex, age and lifestyle.** *Environ Mol Mutagen* 31(3):228-42
58. Castro-Ayala O. (2007). **Determinación de la translocación t(14;18) en leucocitos y espermatozoides de personas sanas.** Informe de Servicio Social. Licenciatura en Biología. División de ciencias biológicas y de la salud. UAM
59. M´Kacher R, Grinsky T, Koscieny S, Dossou J, Violot K, Béron-Gaillard N, Ribrag V, Bourhis J, Bernheim A, Parmentier C, Carde MD. (2003). **Baseline and treatment-induced chromosomal abnormalities in peripheral blood lymphocytes of Hodgkin's Lymphoma patients.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 136: 131-139
60. Atkin N B. Hodgkin's disease. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* May 1999. URL: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Anomalies/HodgkinID2068.html>
61. Pouzoulet F, Roch-Lefevre S, Giraudet AI, Vaurijoux A, Voisin Pa, Buard V, Delbos M, Bourhis J, Voisin Ph, Roy L. (2007). **Monitoring translocations by M-FISH and three color FISH painting techniques: A study of two radiotherapy patients.** *J Radiat Res.* 48 (5):425-434
62. Shaw C J, Lupski J R (2004). **Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease.** *Hum Mol Gen* 13 (1): R57-R64. doi:10.1093/hmg/ddh073
63. Gu W, Zhang F, Lupski JR. (2008). **Mechanisms for human genomic rearrangements.** *Patho Gen.* 1:4. doi:10.1186/1755-8417-1-4

- 
64. Gajecka M, Pavlicek A, Glotzback C, Ballif B, Jarmuz M, Jurka J, Shaffer L. (2006). **Identification of sequence motifs at the breakpoint junctions in three t(1;9)(p36.3;q34) and delineation of mechanisms involved in generating balanced translocations.** *Human Genet* 120:519-526
65. Humpal S E, Robinson D A, Krebs J E. (2009). **Marks to stop the clock: histone modifications and checkpoint regulation in the DNA damage response.** *Biochem Cell Biol* 87: 243-253
66. Gollin SM, Skarja SR. (2005). **Mitosis: Chromosomal rearrangements.** *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons. doi:10.1038/npg.els.0005773
67. Dinant C, Houtsmuller AB, Vermeulen W. (2008). **Chromatin structure and DNA repair.** *Epigenetics & Chromatin*. BioMed Central Ltd. Doi:10.1186/1756-8935-1-9
68. Sánchez-Beato M, Sánchez-Aguilera A, Piris M A. (2003). **Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas.** *Blood* 101(4):1220-1235
69. Khayat A S, Guimaraes A C, Calcagno D Q, Seabra A D, Lima E M, Leal M F, Faria M H G, Rabenhorst S H B, Assumpcao P P, Demachki S, Smith M A C, Burbano R R. (2009). **Interrelationship between TP53 gene deletion, p protein expression and chromosome 17 aneusomy in gastric adenocarcinoma.** *BMC Gastroenterology*. 9:55; doi:10.1186/1471-230X-9-55
70. Döhner H, Stilgenbauer S, Döhner K, Bentz M, Lichter P. (1999). **Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis.** *J Mol Med* 77:266–281
71. Pui C H, Robinson L L, Look A T. (2008). **Acute lymphoblastic leukemia.** *Lancet*. 371: 1030-1043
72. Raimondi S C. T-lineage acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. May 2007. URL: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Anomalies/TALLID1374.html>
73. Malcovati L, Nimer S D. (2008). **Myelodysplastic syndromes: diagnosis and staging.** *Cancer Control*. Vol. 15. Suppl: 4-13

- 
74. Kobayashi H, Matsuyama T, Ueda M, Suzuki T, Ozaki K, Mori M, Nagai T, Muroi K, Ozawa K. (2009). **Predictive factors of response and survival following chemotherapy treatment in acute myeloid leukemia progression from myelodysplastic syndrome.** *Inter Med.* 48:1629-1633. doi: 10.2169/internationalmedicine,48.2362
75. Godley L A, Larson R A. (2008). **Therapy-related myeloid leukemia.** *Semin Oncol.* 35(4):418-429
76. Brasseco M S, Montaldi A P, Gras D E, Camparoto M L, Martinez-Rossi N M, Serideli C A, Tone L G, Sakamoto-Hojo E T. (2009). **Cytogenetic and molecular analysis of MLL rearrangements in acute lymphoblastic leukaemia survivors.** *Mutagenesis.* 24(2): 153-160
77. Meyer C, Kowarz E, Hofmann J, Renneville a, Zuna J, Trka J, Abdelali R B, Macintyre E, De Braekeleer E, Delabesse E, Oliveira M P, Cavé H, Clappier E, van Dongen J J M, Balgobind B V, van den Heuvel-Eibrink M M, Beverloo H B, Panzer-Grümayer R, Teigler-Schlegel A, Harbott J, Kjeldsen E, Schnittger S, Koehl U, Gruhn B, Heidenreich O, Chan L C, Yip S F, Krzywinski M, Eckert C, Möricke A, Schrappe M, Alonso C N, Schäfer B W, Krauter J, Lee D A, Stadt U, Kronnie G T, Suttons R, Izraeli S, Trakhtenbrot L, Nigro L L, Tsaur G, Fechina L, Szczepanski T, Strehl S, Ilencikova D, Molkentin M, Burmeister T, Dingermann T, Klingebiel T, Marschalek R. (2009). **New insights to the MLL recombinome of acute leukemias.** *Leukemia.* 23, 1490–1499; doi:10.1038/leu.2009.33
78. Quijano S, López A, Rasillo A, Sayagués J M, Barrera S, Sánchez M L, Teodosio C, Giraldo P, Giralto M, Pérez M C, Romero M, Perdiguier L, Orfao A. (2008). **Impact of trisomy 12, del(13q), del (17p), and de l(11q) on the immunophenotype, DNA ploidy status, and proliferative rate of leukemic B-cells in chronic lymphocytic leukemia.** *Cytometry Part B* 2008; 74B:139-149

79. Huret J L. ATM (ataxia telangiectasia mutated). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. April 1998. URL: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/ATM123.html>  
 Uhrhammer N, Bay J O, Gatti R A. ATM (ataxia telangiectasia mutated). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. October 1999.  
 URL: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/ATM123.html>  
 Uhrhammer N, Bay J O, Gatti R A. ATM (ataxia telangiectasia mutated). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. November 2002. URL: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/ATM123.html>
80. Nanjangud G, Rao PH, Hegde A, Teruya-Feldstein J, Donnelly G, Qin J, Jhanwar SC, Zelenetz AD, Chaganti RSK. (2002). **Spectral karyotyping identifies new rearrangements, translocations, and clinical associations in diffuse large B-cell lymphoma.** Blood. 99: 2554-2561
81. Ferreira B I, García J F, Suela J, Mollejo M, Camacho F I, Carro A, Montes S, Piris M A, Cigudosa J C. (2008). **Comparative genome profiling across subtypes of low-grade B-cell lymphoma identifies type-specific and common aberrations that target genes with a role in B-cell neoplasia.** Haematologica. 93(5): 670-679
82. Küppers R, Dalla-Favera R. (2001). **Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas.** Oncogene 20: 5580-5594
83. Chiaretti S, Foá R. (2009). **T-cell acute lymphoblastic leukemia.** Haematologica. 94(2): 160-162
84. Dessen P, Knuutila S, Huret J L. Chromosome. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. Jul 2004. URL: [http://AtlasGeneticsOncology.org/Indexbychrom/idxa\\_.html](http://AtlasGeneticsOncology.org/Indexbychrom/idxa_.html),  
 Dessen P, Huret J L. Chromosome. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. Sep 2009. URL: [http://AtlasGeneticsOncology.org/Indexbychrom/idxa\\_.html](http://AtlasGeneticsOncology.org/Indexbychrom/idxa_.html)
85. "Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer (2009). Mitelman F, Johansson B, and Mertens F (Eds.), <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>", Dessen P, Knuutila S, Huret J L. Chromosome. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. Jul 2004. URL: [http://AtlasGeneticsOncology.org/Indexbychrom/idxa\\_.html](http://AtlasGeneticsOncology.org/Indexbychrom/idxa_.html), Dessen P, Huret J L. Chromosome. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. Sep 2009. URL: [http://AtlasGeneticsOncology.org/Indexbychrom/idxa\\_.html](http://AtlasGeneticsOncology.org/Indexbychrom/idxa_.html)

- 
86. Sanada M, Uide N, Ohyashiki K, Ozawa K, Lili W, Hangaishi A, Kanda Y, Chiba S, Kurokawa M, Omine M, Mitani K, Ogawa S. (2007). **Unbalanced t ranslocation der(1;7)(q10;p10) defines a unique clinicopathological subgroup of myeloid neoplasms**. *Leukemia* 21: 992-997
87. Lin T L, Shih L y, Hung Y S, Kuo T. (2009). **Thymic hyperplasia following successful chemotherapy for Hodgkin's lymphoma: Report of a case**. *Chang Gung Med J*. 32(1): 98-103
88. Klimm B, Haverkamp E H, Lohri A, Koch P, Boissevain F, Trenn G, Worst P, Dühmke E, Müller R P, Müller-Hermelink K, Pfistner B, Diehl V, Engert A. (2007). **Poorer outcome of elderly patients treated with extended-field radiotherapy compared with involved-field radiotherapy after chemotherapy for Hodgkin's lymphoma: an analysis from the German Hodgkin Study Group**. *Annals of Oncology*. 18: 357-363. doi:10.1093/annonc/mdl379
89. Nussbaum R L, Mc Innes R R, Willard H F. **Thompson & Thompson Genética en medicina**. Elsevier-Masson. España, 2008, 600 p.

## **ANEXOS**

### **ANEXO I. COMBINACIÓN DE FLUOROCROMOS EMPLEADOS PARA CADA CROMOSOMA EN M-FISH (51).**

Cromosoma	Fluorocromo				
	Spectrum green <sup>TM</sup>	Spectrum Gold <sup>TM</sup>	Spectrum Aqua <sup>TM</sup>	Spectrum FRed <sup>TM</sup>	Spectrum Red <sup>TM</sup>
1		Yellow			
2					Red
3			Cyan		
4	Green				Red
5		Yellow		Magenta	
6	Green				
7				Magenta	
8				Magenta	Red
9		Yellow			Red
10		Yellow	Cyan	Magenta	
11			Cyan		Red
12	Green	Yellow			
13	Green		Cyan		
14	Green	Yellow			Red
15		Yellow	Cyan		Red
16	Green			Magenta	
17	Green			Magenta	Red
18		Yellow		Magenta	Red
19	Green	Yellow		Magenta	
20			Cyan	Magenta	Red
21	Green	Yellow	Cyan		
22	Green		Cyan		Red
X			Cyan	Magenta	
Y		Yellow	Cyan		

---

## ANEXO II. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO



### Instituto Nacional de Pediatría

EFFECTOS GENOTOXICOS SECUNDARIOS AL TRATAMIENTO ANTINEOPLASICO EN SUPERVIVIENTES MASCULINOS CON ENFERMEDAD DE HODGKIN.

#### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

**Fecha:** \_\_\_\_\_

**Nombre:** \_\_\_\_\_

**Edad:** \_\_\_\_\_

- 1.- El que suscribe voluntariamente acepto donar una muestra de semen y una muestra de 10 ml de sangre para ser utilizadas exclusivamente para propósitos de investigación y la muestra de semen no será utilizada para fertilizar ningún óvulo humano.
- 2.- Mi participación en este estudio no implica ningún tratamiento medico.
- 3.- Se me ha informado que las muestras donadas se usarán para realizar la investigación, específicamente en semen, se determinará la cantidad de semen, el número, y el tipo de espermatozoides. Tanto en sangre como en semen 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 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 se utilizan en futuras investigaciones o publicaciones siempre se mantendrá el anonimato.
- 4.- Entiendo que este estudio puede no tener beneficios directos para mi, 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 si tengo alguna queja sobre el manejo de muestras e información, podré dirigirme a la Dra. Victoria del Castillo, Jefa del departamento de Investigación en Genética Humana del INP al teléfono 10 84 09 00 ext. 1331 para presentar mi queja.

**Firma del donador:** \_\_\_\_\_

**Testigo (nombre y firma):** \_\_\_\_\_

**Médico Tratante (nombre y firma):** \_\_\_\_\_

**Responsable del proyecto. Sara Frías:**  
\_\_\_\_\_

---

**ANEXO III. CUESTIONARIO DE TAMIZAJE.**

1.- Fecha de nacimiento \_\_\_\_\_  
Día/mes/año

2.- Fuma? SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_  
Cuántos cigarillos por día en los últimos 6 meses \_\_\_\_\_

3.- Ha tenido fiebre de más de 38°C en los últimos 6 meses?  
SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_

4.- Qué enfermedades ha tenido en los últimos 3 meses  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

5.- Tiene vasectomía ? SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_

6.- 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 endocrina u hormonal? SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_  
Especifique

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

e) Cáncer SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_  
Especifique

\_\_\_\_\_  
Tipo \_\_\_\_\_



---

Quimioterapia

---

---

---

Radioterapia

---

---

---

7.- Se ha tomado radiografías, o practicado algún examen que involucre radiación en los últimos 3 meses?                    SI \_\_\_\_\_                    NO \_\_\_\_\_

8.- ¿Se ha practicado un examen de semen antes?    SI \_\_\_\_\_                    NO \_\_\_\_\_  
Especifique la razón

---

---

---

---

9.- ¿Tiene algún problema de fertilidad?                    SI \_\_\_\_\_                    NO \_\_\_\_\_  
Si es informativo especifique

---

---

---

---

10.- ¿Se ha hecho alguna transfusión sanguínea en los últimos tres meses?

SI \_\_\_\_\_                    NO \_\_\_\_\_

Especifique la razón

---

---

---

---

11.- Tomas drogas regularmente?

No \_\_\_\_\_

Si \_\_\_\_\_

---

Qué tipo de drogas y con qué frecuencia?

12.- Tomas bebidas que contengan cafeína?

No \_\_\_\_\_

Si \_\_\_\_\_

13.- Aparte de enfermedad de Hodgkin ¿Qué enfermedades has padecido?

	No	Si
Diabetes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Trastornos de la tiroides	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hepatitis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Convulsiones/epilepsia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Has tomado algún medicamento	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
En los últimos 3 meses		

Menciona que medicamentos	Por qué razón los tomaste	Cuántos días
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

13.- En los últimos tres meses se te ha practicado algún examen radiológico?

Si \_\_\_\_\_

No \_\_\_\_\_

¿Qué tipo de examen?

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

---

**ANEXO IV. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN DE ACUERDO AL ANEXO III  
CUESTIONARIO DE TAMIZAJE**

1.- Menor de 18 años, se excluye.

4.- Si ha tenido enfermedades virales y/o de transmisión sexual en los últimos tres meses, esperar para tomar muestras. En caso de SIDA, se excluye.

5.- Afirmativo, se excluye.

6.- Afirmativo, se excluye. La excepción sería que el cáncer fuera EH, con lo que se incluiría como paciente.

7.- Afirmativo, esperar para tomar muestras.

8 y 9.- Si se sospecha de alguna enfermedad de origen cromosómico, se excluye.

10.- Afirmativo, esperar para tomar muestras.

---

## ANEXO V. CUESTIONARIO GENERAL

Por favor, contesta las siguientes preguntas.

- 1.- Fecha \_\_\_\_\_  
2.- Fecha de nacimiento \_\_\_\_\_  
3.- Peso del paciente \_\_\_\_\_ kg,  
4.- Talla del paciente \_\_\_\_\_ m.  
5.- Edo. civil.

- Soltero  
 Casado  
 Unión libre  
 Separado  
 Viudo

6.- Has estado en contacto con algún agente químico o radioactivo en los últimos tres meses?

- No  
 Si

Con cuáles agentes has tenido contacto \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

7.- Fumas regularmente?

- No  
 Si

8.- Anota el número promedio de cigarrillos por día fumados durante los últimos 5 años:

\_\_\_\_\_

9.- Tomas bebidas alcohólicas regularmente?

- No  
 Si

¿Qué cantidad promedio 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

---

14.- Algún familiar tuyo o de tus padres nació con algún defecto, o enfermedad hereditaria?

- No  
Si

¿Cuál? (anótalo)

---

\_\_\_\_\_

15.- Has presentado alguna (s) de las siguientes enfermedades?

- |  |                             |                             |
|--|-----------------------------|-----------------------------|
| Testículos no descendidos al nacimiento<br><input type="checkbox"/>  | Si <input type="checkbox"/> | No                          |
| Varicocele<br><input type="checkbox"/>   | Si <input type="checkbox"/> | No                          |
| Fimosis<br><input type="checkbox"/>  | Si <input type="checkbox"/> | No                          |
| Infección de vías urinarias<br><input type="checkbox"/>  | Si <input type="checkbox"/> | No                          |
| Enfermedades de transmisión sexual<br><input type="checkbox"/>   | Si <input type="checkbox"/> | No                          |
| Paperas<br><input type="checkbox"/>  | Si <input type="checkbox"/> | No                          |
| Cuando presentaste paperas, presentaste inflamación dolorosa De los testículos<br><input type="checkbox"/> | Si <input type="checkbox"/> | No                          |
| Secreción anormal por el pene?<br><input type="checkbox"/>   | Si <input type="checkbox"/> | No                          |
| Sensación de ardor al orinar?  | Si <input type="checkbox"/> | No <input type="checkbox"/> |
| Dolor severo o hinchazón de los testículos que requirió Tratamiento médico?                                | Si <input type="checkbox"/> | No <input type="checkbox"/> |

---

16.- Has tratado por más de 12 meses de concebir un hijo.

No

Si, en los últimos 12 meses.

Si, antes de los últimos 12 meses.

Cuándo? \_\_\_\_\_.

17.- Durante los últimos tres meses. Cuántas veces en promedio has eyaculado?

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

18.- Anota la cantidad promedio de bebidas con cafeína que has consumido por semana en los últimos 5 años \_\_\_\_\_ 1 taza de café = 6 oz.

19.- Has presentado fiebre de más de 38°C o mayor durante los últimos 3 meses.

No

Si

Hace cuanto tiempo presentaste fiebre \_\_\_\_\_ días.

20.- Durante los últimos tres meses cuántas horas a la semana en promedio utilizaste moto o bicicleta \_\_\_\_\_ horas/semana.

21.- Durante los últimos tres meses cuántas horas al día en promedio manejaste un vehículo de motor. \_\_\_\_\_ horas/día.

22.- Qué tipo de ropa interior utilizaste en los últimos 3 meses:

Boxer

Pants

Ninguna

Otra especificar :

\_\_\_\_\_

23.- Durante los últimos tres meses has usado sauna o baños de tina.

No

Si

---

Cuántas veces al mes \_\_\_\_\_ veces al mes.

Cuánto has durado en promedio \_\_\_\_\_ minutos.

Para ser llenado por el médico. **FAVOR DE LLENAR LOS SIGUIENTE DATOS DE ACUERDO AL EXPEDIENTE DEL PACIENTE.**

Expediente # :

Fecha de nacimiento:

Edad al diagnóstico:

Enfermedad de Hodgkin estadio:

Tipo celular:

Fecha de inicio de quimioterapia:

Tipo de quimioterapia (incluir los ciclos y las dosis aplicadas de cada mezcla):  
( De ser necesario incluir hojas extra o fotocopia del expediente)

Fecha de inicio de radioterapia:

Dosis aplicada y zona de aplicación:

Fecha de término de quimioterapia:

Observaciones:

Médico tratante (nombre y firma):

---

**ANEXO VI. REACTIVOS, MATERIAL Y EQUIPO UTILIZADOS**

<b>REACTIVOS</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>EQUIPO</b>
Pepsina (Sigma)	Vasos coplin	Microscopio Axio Imager Z1, ZEISS
PBS 1X GIBCO BRL	Tubos eppendorf (1.5-0.5ml)	Hybrite Vysis
Formaldehído 37% MERCK	Cubreobjetos 22x22mm <sup>2</sup> , 24x50mm <sup>2</sup>	Cámara ZEISS. Software ISIS
Etanol Absoluto (Merck)	Portaobjetos	Potenciómetro
SpectraVysion (Vysis)	Frascos estériles	Baño termostático
20XSSC (Vysis)	Pinzas	Parrilla eléctrica
Igepal (Sigma)	Tubos Falcon 50ml	Centrífuga
Agua destilada	Probeta 100ml	Campana de flujo laminar
DAPI (Sigma)	Cronómetro	Incubadora
HCl 37% (Merck)	Pipetas Pasteur	Vortex
NaOH (Merck)	Micropipetas de 10, 100 y 1000 µl	Refrigerador
Fijador (Metanol/Ác. Acético) (Merck)	Vaso de precipitados	Congelador (-20°C)
Cemento iris	Lápiz diamante	
	Termómetro	
Vectashield (Vector)	Puntas para micropipeta	
	Gasas	



---

## **ANEXO VII. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES**

### **FIJADOR CARNOY**

Preparar la cantidad necesaria de Metanol absoluto-  
Ácido acético glacial  
en proporción 3:1.

### **SOLUCIÓN 20XSSC**

Disolver 66g de  
e 20XSSC en 200ml de agua destilada.  
Ajustar pH a 5.3 con HCl 1N y aforar hasta 250 ml  
con agua destilada.

### **SOLUCIÓN 2XSSC**

360 ml de agua estéril  
40 ml de solución 20XSSC  
Ajustar pH a 7.0

### **HCl 1N**

Diluir 8ml de HCl 37% en  
92 ml de agua destilada.

### **NaOH 1N**

Disolver 4 g de NaOH en  
100 ml de agua destilada

### **PEPSINA**

Disolver 50mg de pepsina en  
2.5 ml de agua destilada  
Almacenar en alícuotas de 250µl

### **SERIES DE ETANOL**

- 1.- Etanol 100%: 50ml de etanol 100%
- 2.- Etanol 80%: 40ml de etanol y 10ml de agua destilada
- 3.- Etanol 70%: 35ml de etanol y 10ml de agua destilada

### **SOLUCIÓN POST FIJACIÓN**

60 µl de formaldehído 37% en 2ml de PBS 1X  
Almacenar a 4°C

---

**SOLUCIÓN 0.4XSSC 0.3% IGEPAL**

2ml 20XSSC, 0.3ml Igepal, 95ml agua destilada.

Ajustar pH entre 7-7.5. Aforar a 100ml. Precalear a 74°C media hora antes de su utilización.

**SOLUCIÓN 2XSSC 0.1% IGEPAL**

10ml 20XSSC, 0.1ml Igepal y 80 ml de agua destilada.

Ajustar pH entre 7-7.5. Aforar a 100ml

**ANEXO VIII. ALGUNAS ABREVIATURAS UTILIZADAS PARA LA DESCRIPCIÓN DE LOS CROMOSOMAS Y DE SUS ALTERACIONES (40,89).**

Abreviatura	Significado	Ejemplo	Característica
		46,XX	Cariotipo femenino normal
		46,XY	Cariotipo masculino normal
+	ganancia de	47,XX,+21	Mujer con un cromosoma 21 extra (trisomía 21)
-	pérdida de	45,XX,-22	Mujer con un cromosoma 22 menos (monosomía 22)
p	brazo corto del cromosoma		
q	brazo largo del cromosoma		
cen	centrómero		
tel	telómero		
ace	fragmento cromosómico que carece de centrómero	46,XX, ace 2	Mujer con un fragmento del cromosoma 2 sin centrómero
chtb	ruptura cromatídica	46,XX, chtb 3	Mujer con un cromosoma 3 que presenta ruptura en una cromátida
chrb	ruptura cromosómica	46,XX, chrb 3	Mujer con un cromosoma 3 que presenta ruptura en ambas cromátidas
del	delección	46,XX,del(5p)	Mujer con delección del brazo corto del cromosoma 5
der	derivado cromosómico	der(1)	Cromosoma por translocación derivado del cromosoma 1 y que contiene el centrómero del cromosoma 1

dic	cromosoma dicéntrico	45,XX,dic(3;5)	Mujer con un cromosoma que por translocación contiene los centrómeros de los cromosomas 3 y 5
dup	duplicación	dup(7p)	Cromosoma 7 con duplicación en el brazo corto
ins	inserción	ins(X;5)	Cromosoma X que tiene insertado un fragmento del cromosoma 5
inv	inversión	inv(3)(p25;q21)	Inversión pericéntrica del cromosoma 3
mar	cromosoma marcador	47,XX,+mar	Mujer con un cromosoma extra no identificado
r	cromosoma en anillo	46,X,r(X)	Mujer con un cromosoma X en anillo
t	translocación	46,XX,t(2;8)(q22;p21)	Mujer con intercambio entre los cromosomas 2 y 8.
tas	asociación telomérica	45,XX,tas(9;16)	Mujer con un cromosoma 9 asociado por el telómero al telómero del cromosoma 16.
trc	cromosoma tricéntrico	44,XX,trc(3;4;6)	Mujer con un cromosoma que por translocación contiene los centrómeros de los cromosomas 3, 4, y 6

