



**Universidad Nacional Autónoma de  
México**

**Facultad de Estudios Superiores Zaragoza**

**Alteraciones cromosómicas  
numéricas en espermatozoides  
de pacientes con linfoma de  
Hodgkin mediante FISH-  
Multicolor.**

**T E S I S**

**Que para obtener el grado de biólogo**

**P R E S E N T A**

**Ortiz Barrera Alan Enrique**

Directora de Tesis: *Dra. Elia Roldán Reyes*

*Citogenética y Mutagénesis*

Lab. 2 primer piso, UMIEZ

*Ciudad de México, 2022*



**FES  
ZARAGOZA**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



## **AGRADECIMIENTOS.**

*A la Dra. Elia Roldán y a la Biól. Aline López por su instrucción, confianza y apoyo, siempre les estaré agradecido.*

*A todos mis compañeros del laboratorio de Citogenética y Mutagénesis, con mención a título personal para Andrea Aguilar, Jessica Oliver, América Gutiérrez y Axel Díaz, les aprecio y guardo.*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México por gestar mi crecimiento profesional.*

*A la Dra. Emma Gallardo del servicio de Hematología del Hospital General de México.*

*Al proyecto PAPIIT UNAM IN213013-3.*

## **DEDICATORIA.**

*A los profesores Mario Ortiz Cruz y Soledad Edit Barrera Ramírez, cuyo amor asaz paciente y dedicado ha cuidado de mí. Yo también los amo.*

*A mis hermanos: el Ing. Fernando y Dr. Mario Tandeé, a quienes debo la definición de alegría y fraternidad, cuenten conmigo siempre.*

*A Leonardo Sánchez, Ulises Lemarroy, Arnulfo Ledesma y César Alonso. Conocerlos ha sido la mejor serendipia de este viaje.*

*A mi gran amigo y colega, Arturo Ávila, que además de robar mi tiempo y amistad se robó también esta dedicatoria.*

*A las comunidades de Santiago Yucuyachi y San Miguel Tequixtepec, Oaxaca, donde se me mostró quién soy y a dónde voy.*

## ***Al biólogo.***

*"...Estudiamos a los seres vivos  
y la salud de nuestro planeta,  
nos mostramos muy festivos,  
al ir logrando cada meta.*

*Vamos de lo enano a lo grande,  
del azul mar a la verde sierra,  
donde la vida icomande!..."*

**Profesor Manuel Faustino Rico Bernal.**  
*A título de suficiencia -Poesía- (2014).*  
FES Zaragoza, UNAM.

*...admite el sol en su familia de oro  
llama delgada, pobre y temerosa.*

**Quevedo.**

## RESUMEN

El linfoma de Hodgkin (LH) es un cáncer caracterizado por la alteración de los linfocitos B. En México es la segunda causa de cáncer pediátrico y su tratamiento actual involucra los quimioterapéuticos: adriamicina, bleomicina, vinblastina y dacarbazina (ABVD), cuya actividad puede alterar la síntesis de testosterona, la concentración de estrógenos y la espermatogénesis, aumentando el riesgo de resultados reproductivos anormales. El objetivo de este trabajo fue evaluar la calidad seminal y la frecuencia de aberraciones cromosómicas en pacientes con LH tratados con ABVD. Se estudió un total de 7 muestras seminales: 4 individuos sanos, sin antecedentes clínicos, y 3 de pacientes jóvenes clínicamente diagnosticados con LH y tratados con ABVD. Tras la evaluación de más de 35 000 células espermáticas con el ensayo FISH-AM8 se encontró daño genotóxico representado por el aumento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas numéricas (ACN) y estructurales (ACE); donde las ACN fueron más frecuentes que las ACE, aunque ambas fueron significativamente mayores que en el grupo control. No se observó efecto citotóxico entre los pacientes expuestos a ABVD; los pacientes mostraron adecuada densidad espermática. Estos resultados estarían relacionados con un restablecimiento de la línea germinal y una conservación de la capacidad de diferenciación tras la exposición a quimioterapéuticos.

Palabras clave: Aberraciones cromosómicas, citotoxicidad, espermatobioscopía, FISH multicolor, genotoxicidad.

## ABSTRACT

Hodgkin's lymphoma (LH) is characterized by B lymphocytes alteration. In Mexico, LH is the second cause of pediatric cancer, and current treatment involves chemotherapeutic agents: adriamycin, bleomycin, vinblastine and dacarbazine (ABVD), whose activity alters testosterone synthesis, estrogen concentration and spermatogenesis, increasing abnormal reproductive outcomes risk. The objective was to assess seminal quality and chromosomal aberrations frequency in LH patients treated with ABVD. Seven semen samples were studied: 4 healthy individuals with no medical history, and 3 from young patients clinically diagnosed with LH and treated with ABVD chemotherapy. More than 35,000 sperm cells were evaluated with the FISH-AM8 assay. Genotoxic damage was found, represented by increase in the frequency of numerical and structural chromosomal aberrations, ACN and ACE, respectively; ACN were more frequent than ACE, although both were significantly higher than control group. No cytotoxic effect was observed among patients exposed to ABVD, the patients showed adequate sperm density. These results would be related to germline reestablishment and maintenance of differentiation capacity after chemotherapeutic agents exposure.

Keywords: Chromosomal aberrations, cytotoxicity, multicolor FISH, genotoxicity, spermatobioscopy.

# ÍNDICE GENERAL

## 1. Introducción.

1.1 Cáncer.....	1
1.2 Aberraciones cromosómicas.....	4
1.2.1 Aberraciones cromosómicas numéricas.....	7
1.2.2 Aberraciones cromosómicas estructurales...	12
Región 1p36.....	15
1.3 Linfoma de Hodgkin.....	17
1.3.1 Etiología.....	22
1.3.2 Estadificación del linfoma de Hodgkin.....	25
1.3.3 Tratamiento.....	26
1.4 Efectos reproductivos del tratamiento antitumoral...	31
1.5 Hibridación Fluorescente In situ.....	33
1.5.1 FISH-AM8.....	35

2. <i>Justificación</i> .....	37
3. <i>Hipótesis</i> .....	37
4. <i>Objetivos</i> .	
4.1 <i>Objetivo general</i> .....	38
4.2 <i>Objetivos particulares</i> .....	38
5. <i>Método</i> .	
5.1 <i>Criterios de inclusión</i> .....	39
5.2 <i>Criterios de exclusión</i> .....	40
5.3 <i>Procesamiento de la muestra</i> .....	40
5.3.1 <i>Espermatobioscopía</i>	
5.3.2 <i>Ensayo FISH-M</i>	
5.4 <i>Análisis estadístico</i> .....	44
6. <i>Resultados</i> .	
6.1 <i>Población estudiada</i> .....	45
6.2 <i>Parámetros seminales</i> .....	47
6.3 <i>Aberraciones cromosómicas</i> .....	49
7. <i>Discusión</i> .....	54

8. Conclusiones.....	70
9. Perspectivas.....	71
10. Referencias.....	72
11. Anexo.....	93

# ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Aberraciones cromosómicas en una muestra de 100 mil embarazos.....	6
<b>Tabla 2.</b> Frecuencia de los subtipos histológicos en LH.....	19
<b>Tabla 3.</b> Grupos para el tratamiento de pacientes con LH.....	27
<b>Tabla 4.</b> Fármacos empleados en el esquema ABVD.....	29
<b>Tabla 5.</b> Valores de referencia para espermatobioscopia.....	33
<b>Tabla 6.</b> Datos clínicos de los individuos expuestos y controles.....	46
<b>Tabla 7.</b> Parámetros de espermatobioscopías en ambos grupos de estudio.....	47
<b>Tabla 8.</b> Datos clínicos, calidad seminal y aberraciones cromosómicas estructurales (ACN) y numéricas (ACN), mediante FISH multicolor-AM8.....	50
<b>Tabla 9.</b> Fenotipos y frecuencias de aberraciones cromosómicas numéricas (ACN) observadas mediante FISH-M-AM8.....	51
<b>Tabla 10.</b> Fenotipos y frecuencias de aberraciones cromosómicas estructurales (ACE) observadas mediante FISH-M-AM8...	52
<b>Tabla 11.</b> Frecuencia de espermatozoides con aberraciones cromosómicas en ambos grupos de estudio, establecidas mediante FISH-M-AM8.....	54

# ÍNDICE DE FIGURAS.

<b>Figura 1.</b> Clasificación de las anomalías cromosómicas.....	5
<b>Figura 2.</b> Comparación de una mala segregación meiótica en un par de cromosomas.....	10
<b>Figura 3.</b> Representación esquemática de los errores de segregación durante la meiosis: a) No disyunción en meiosis I; b) Separación prematura de cromátidas hermanas; c) No disyunción en meiosis II.....	11
<b>Figura 4.</b> Diferentes aberraciones cromosómicas estructurales (ACE): Deleciones, inserción, duplicación, inversión e isocromosomas.....	14
<b>Figura 5.</b> Ideograma del cromosoma 1 mostrando en naranja la región 1 p36.....	16
<b>Figura 6.</b> Estadios de diseminación del LH.....	25
<b>Figura 7.</b> Eje hipotálamo hipófisis gónada en el hombre.....	32
<b>Figura 8.</b> Ejemplo de diferentes tipos de sondas en hibridación fluorescente <i>in situ</i> (FISH).....	34
<b>Figura 9.</b> Esquema de sondas para FISH - AM8.....	36
<b>Figura 10.</b> Aberraciones cromosómicas establecidas mediante FISH - AM8 .....	43
<b>Figura 11.</b> Microfotografías FISH-AM8 en espermatozoides humanos. <b>(a)</b> espermatozoide sin daño cromosómico: <b>AM8</b> . <b>(b)</b> espermatozoide con daño cromosómico numérico: <b>AAMM88</b> , diploidía. <b>(c)</b> espermatozoide con daño cromosómico numérico: <b>008</b> , nulisomía del cromosoma 1. Microscopía de epifluorescencia (100X), filtro triple banda (DAPI/FITC/Texas red). Citogenética y Mutagénesis, Laboratorio 2, 1er piso, UMIEZ, FES-Z UNAM.....	44

## **A B R E V I A T U R A S.**

<b>ABVD:</b>	Adriamicina, bleomicina, vinblastina y dacarbacina.
<b>AC:</b>	Aberraciones o alteraciones cromosómicas.
<b>ACE:</b>	Aberraciones cromosómicas estructurales.
<b>ACN:</b>	Aberraciones cromosómicas numéricas.
<b>DAPI:</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DNA:</b>	Ácido desoxiribonucleico.
<b>DTT:</b>	DL-ditiotreitol
<b>EBV:</b>	Virus Epstein-Barr.
<b>FA:</b>	Formamida
<b>FICT:</b>	Isotiocianato de fluoresceína o fluoresceína-5-isotiocianato
<b>FISH-M:</b>	Hibridación fluorescente <i>in situ</i> – multicolor
<b>LH:</b>	Linfoma de Hodgkin
<b>LIS:</b>	3,5-ácido diiodosalicilico
<b>NL:</b>	Muestra seminal normal.
<b>NN:</b>	Muestra seminal no normal.
<b>OMS:</b>	Organización Mundial de la Salud.
<b>RS:</b>	Células Reed-Stenberg
<b>SSC:</b>	Citrato de sodio

# **1. INTRODUCCIÓN.**

## ***1.1 Cáncer***

En el año 2018, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que a causa del cáncer murieron 9.6 millones de personas en el mundo, así mismo, la organización registró un aumento de 18.1 millones de nuevos casos, posicionando este padecimiento como la segunda causa de decesos a nivel mundial y convirtiendo al cáncer en un tema de discusión central en la salud pública (WHO, 2018). Alarmantemente, la prevalencia del cáncer continúa aumentando anualmente sin límites de afectación, pues está presente en la totalidad de las sociedades humanas, tan sólo en niños, los tipos porcentualmente más altos de esta enfermedad son el cáncer vinculado a la sangre, al cerebro y a los ganglios linfáticos (Hassanpour y Dehghani, 2017).

En México la inexistencia de un registro nacional del cáncer limita la capacidad de conocer los datos actuales de las neoplasias malignas, hasta 2013 la mortalidad por cáncer era de 70 personas por cada 100 mil habitantes y fue marcadamente mayor en los estados al norte del país (como Chihuahua, Sonora y Nuevo León) y la ciudad de México,

las proyecciones a 2020 muestran aumento en la mortalidad llegando incluso a tasas superiores a las observadas en Europa (Reynoso-Noverón y Torres-Domínguez, 2017).

El cáncer es un crecimiento tisular producido por la proliferación continua de células anormales con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos, esta enfermedad se puede entender como una transformación de las funciones celulares normales, es decir, la alteración de genes codificantes a proteínas involucradas en el ciclo de proliferación celular, o bien, en el mantenimiento de la integridad del DNA (Imran, 2017; Monzón *et al.*, 2011).

Los *genes supresores de tumores* y los *oncogenes* son dos grandes grupos que intervienen en el proceso de transformación celular, al regular la proliferación. En el cáncer, su alteración causa la división celular descontrolada, el aumento de la supervivencia y eventual diseminación (Nenclares y Harrington, 2019).

Es evidente el carácter genético de esta enfermedad, pero en la mayoría de los casos no es hereditaria. En la enfermedad hereditaria el defecto genético se halla en los cromosomas de uno de los padres transmitiéndose al cigoto, sin embargo, cuando no ocurre de esta manera, las alteraciones en estos genes aparecen en la célula en forma

esporádica y puntual (Bièche, 2004), ello debido a la naturaleza intrínsecamente falible de los procesos de división celular.

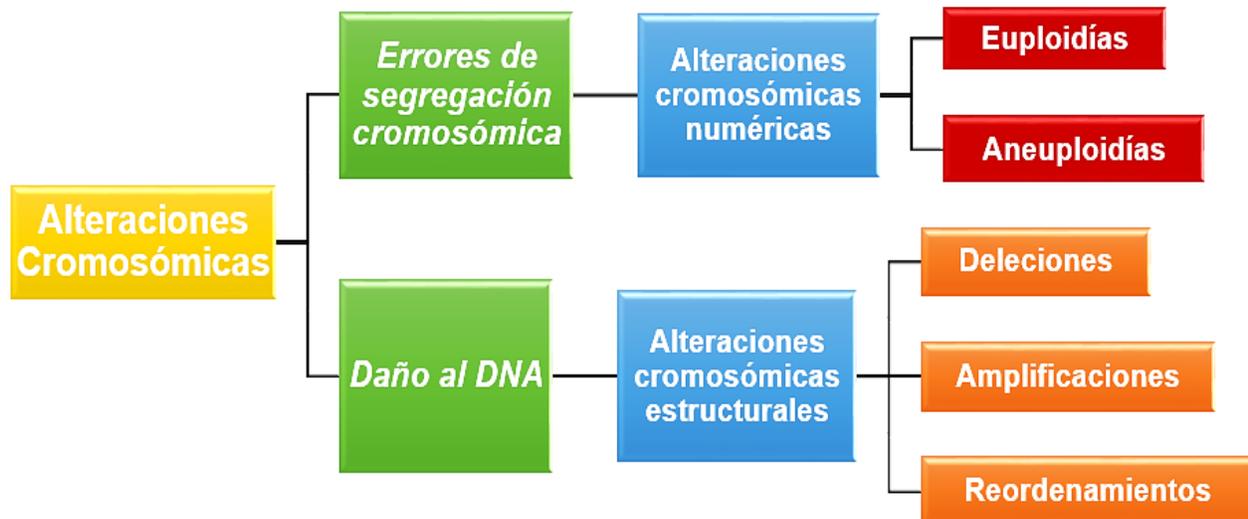
Aunque la acumulación de dichas mutaciones constituye el principal mecanismo de transformación celular maligna, existen igualmente otros elementos que logran incidir sobre el DNA, como son ciertas sustancias que propician eventos mutagénicos o carcinogénicos en las células, debido al efecto genotóxico que ejercen sobre el DNA (Roldán, 2016; Nenclares y Harrington, 2019). Otro ejemplo, es el cáncer asociado a diversas infecciones, principalmente virales, las cuales pueden generar las alteraciones necesarias en el material genético y así modificar también la función celular normal, mostrando que esta es una enfermedad multifactorial (Bard *et al.*, 2005; Plummer *et al.*, 2016).

## 1.2 Aberraciones cromosómicas

Las **aberraciones cromosómicas** (AC) pueden entenderse como una modificación anómala del material genético; ya sea en número o estructura, **Figura 1**. Una aberración del tipo numérico es el resultado de errores en la segregación cromosómica, mientras que las aberraciones del tipo estructural refieren un daño en el DNA que puede consistir en el exceso de la información genética, su reordenamiento o deficiencia (Curtis *et al.*, 2008; Kou *et al.*, 2020). En general, las AC encuentran su origen en la susceptibilidad que tienen los procesos celulares para producir errores, dichos procesos incluyen la replicación, transcripción y la reparación del DNA (Preston, 2014).

Las AC pueden afectar tanto autosomas como a cromosomas sexuales o inclusive ambos simultáneamente. Las aberraciones numéricas son más frecuentes que las estructurales, y sus consecuencias clínicas dependen de diversos parámetros como su localización, cromosomas involucrados y genes o regiones cromosómicas afectadas (Rosenberg y Drobnis, 2012). Las AC en la salud humana provocan una amplia variedad de síndromes y otras enfermedades congénitas, incluyendo

diversos problemas de fertilidad y pérdida del embarazo (Rosenberg y Drobnis, 2012; Blue, Page y Silver, 2019).



**Figura 1.** Clasificación de las anomalías cromosómicas (modificado de Kou *et al.*, 2020).

Las AC juegan un papel clave en el cáncer al facilitar la tumorigénesis y propiciar la expresión, función o disfunción de RNA's y proteínas. Se pueden identificar AC propias de los diferentes tumores que existen. Esta caracterización permite el diagnóstico y pronóstico clínico del cáncer, y ayuda a establecer tratamientos o bien promover terapias más eficientes contra esta enfermedad (Salamanca-Gómez, 1995; Mitelman, 2000; Kou *et al.*, 2020).

En el ámbito de la fertilidad, la especie humana se caracteriza por una importante mortalidad prenatal debida principalmente a las aberraciones cromosómicas en gametos humanos. En abortos espontáneos la frecuencia de aberraciones cromosómicas se encuentra al rededor del 50% y de manera similar, en los nacidos muertos están presentes hasta en el 5% de los casos, **Tabla 1** (Alonso, 2007; Vialard y Pellestor, 2008; Rosenberg y Drobnis, 2012). Es así como el estudio citogenético de las células germinales se muestra fundamental para una mejor comprensión de los mecanismos de formación y transmisión de estas anomalías genéticas

**Tabla 1.** Aberraciones cromosómicas en una muestra de 100 000 embarazos.

	<b>Embarazos</b>	<b>Abortos espontáneos</b>	<b>Nacidos vivos</b>
<b>Total</b>	100 000	15 000	85 000
Cromosomas normales	92 000	7 500	84 400
Cromosomas anormales	8 000	7 500	500

Rosenberg y Drobnis, 2012

### 1.2.1 Aberraciones cromosómicas numéricas

En seres humanos, se habla de *aberraciones cromosómicas del tipo numérico* (ACN) cuando la cantidad de cromosomas complementarios es distinta a la diploide ( $2n$ ) o haploide ( $n$ ), según se estudien células somáticas o gaméticas (Skinner, 2018). En espermatozoides, las ACN incluyen dos grandes categorías:

- a) Las **euploidías**, que se definen como cualquier múltiplo del número haploide de cromosomas ( $2n$ ,  $3n$  y  $4n$ ).
- b) Las **aneuploidías**, una condición en la que la célula no posee un múltiplo exacto del número haploide, como en la disomía ( $n+1$ ), que indica un cromosoma extra en el espermatozoide, mientras que, una nulisomía ( $n-1$ ) señala que lo ha perdido (Downie *et al.*, 1997; Nussbaum *et al.*, 2008).

Las **euploidías**, tanto **triploidías** ( $3n$ ) como **tetraploidías** ( $4n$ ), se han observado en fetos humanos con rara frecuencia, y aunque los niños triploides pueden nacer vivos (del 1 al 3 % de las concepciones), no llegan a sobrevivir mucho tiempo, cabe mencionar que la mayor parte de estos casos son el resultado de una fecundación dispérmica; sin

embargo, cierta proporción se debe también a fallos en la división meiótica (Nussbaum *et al.*, 2008; Rosenberg y Drobnis, 2012).

Las **aneuploidías** en la especie humana, son el trastorno cromosómico más común y el de mayor importancia clínica, pues está presente en al menos el 5% de los embarazos, sin embargo, se ha llegado a estimar que hasta el 60% de las concepciones presentan aneuploidías, y que antes de lograr ser embarazos clínicamente diagnosticados, estas se convierten en abortos espontáneos (Rosenberg y Drobnis, 2012; Skinner, 2018).

Las aneuploidías pueden ser *trisomías* (tres copias de un cromosoma) o bien *monosomías* (una sola copia de un cromosoma). Las monosomías son mucho menos frecuentes que las trisomías y más perjudiciales, aunque ambas ocasionan consecuencias fenotípicas graves (Nussbaum *et al.*, 2008).

Cualquier parte del genoma puede ser susceptible a formar una trisomía, pero las únicas compatibles con la vida involucran a los cromosomas 13, 18, 21, X. La trisomía más frecuente corresponde al cromosoma 21, que está presente en el 95 % de los casos del síndrome de Down y muestra una mayor sobrevivencia a largo plazo cuando se

le compara con el resto de las trisomías (Miller y Therman, 2001; Nussbaum *et al.*, 2008).

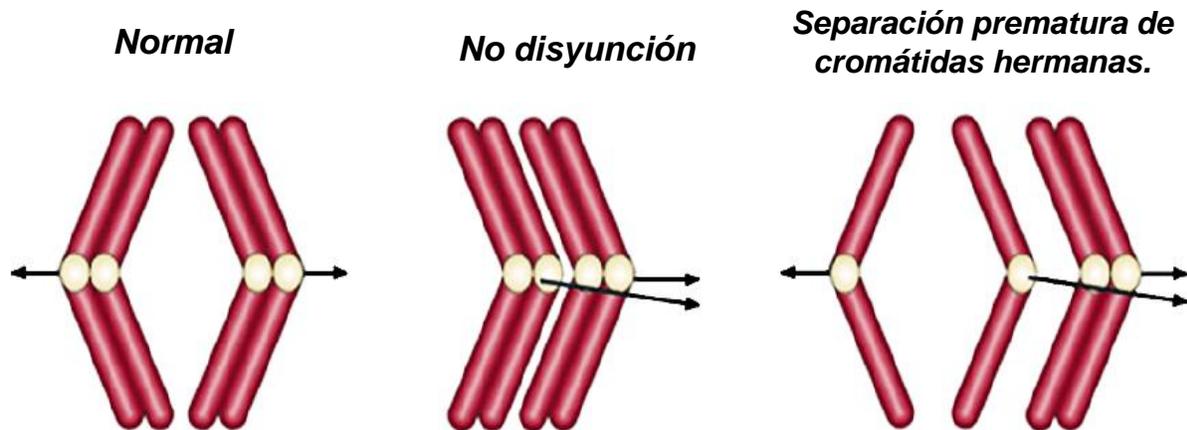
Es importante notar que los cromosomas 13, 18, 21 y Y son los que poseen el menor número de genes y que la trisomía de cualquier otro autosoma con mayor cantidad de genes es letal (Rosenberg y Drobnis, 2012; Dimassi *et al.*, 2017).

Por otra parte, la monosomía de cualquier cromosoma es siempre letal, exceptuando al cromosoma X, donde causa el síndrome de Turner (45, X) (Dimassi *et al.*, 2017).

En principio, todas las aneuploidías son el resultado de una inadecuada distribución cromosómica durante la división celular, la cual puede acontecer en tres escenarios posibles: en alguna división mitótica previa a la meiosis (en la línea germinal de cualquiera de los dos padres); en alguna de las dos divisiones meióticas (primera o segunda); o en una división mitótica embrionaria temprana (Miller y Therman, 2001; Vialard y Pellestor, 2008).

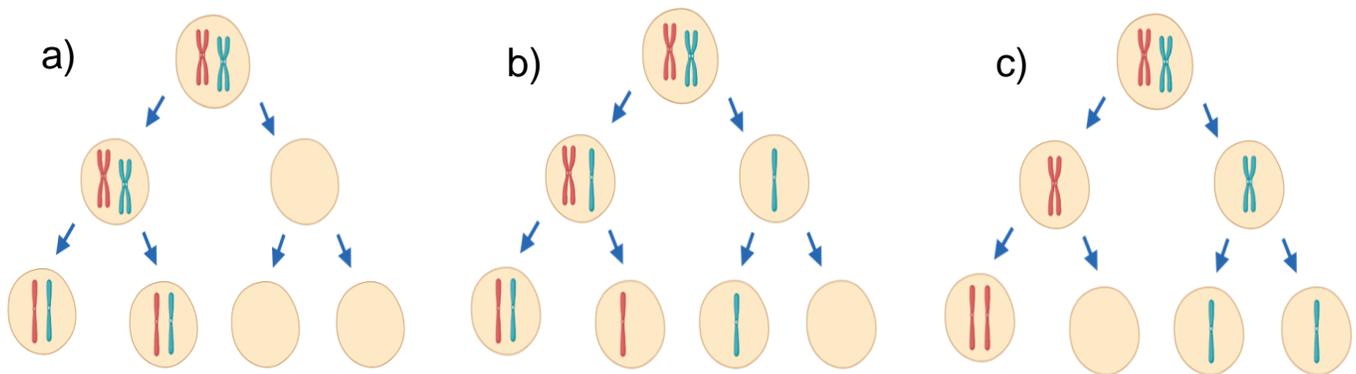
Las anomalías que se restringen a la línea germinal se denominan como meióticas, y son la causa de las aneuploidías en ella, esto sucede a través de dos conocidos mecanismos: la *no disyunción meiótica* o la

*separación prematura* de las cromátidas hermanas, se ilustran en la **Figura 2** (Egoszcue y Vidal, 2008; Martin, 2008).



**Figura 2.** Comparación de una mala segregación meiótica en un par de cromosomas (modificado de Vialard y Pellestor, 2008).

La *no disyunción* involucra un fallo en la separación de algún par cromosómico durante cualquiera de las dos fases meióticas, se sabe también que estos errores suceden con igual frecuencia en meiosis I y II, y que sus consecuencias son distintas según la fase en la que tenga lugar, **Figura 3** (Nussbaum *et al.*, 2008; De la Torre y Herrera, 2018).



**Figura 3.** Representación esquemática de los errores de segregación durante la meiosis: a) No disyunción en meiosis I b) Separación prematura de cromátidas hermanas, c) No disyunción en meiosis II (De la Torre y Herrera, 2018. Creado con BioRender.com).

Durante la meiosis I, el apareamiento de los cromosomas propicia la formación de las estructuras bivalentes, cuando no hay disyunción estas estructuras no se separan y los cromosomas homólogos migran al hacia el mismo polo, resultando en la presencia de dos cromosomas homólogos en la metafase II y generando dos gametos disómicos ( $n+1$ ) y dos nulisómicos ( $n-1$ ) para dicho cromosoma, **Figura 3a**, del mismo modo, cuando la no disyunción tiene lugar en la meiosis II, se pueden generar tanto gametos normales ( $n$ ) como nulisómicos y disómicos, **Figura 3c** (Armas *et al.*, 2016; De la Torre y Herrera, 2018).

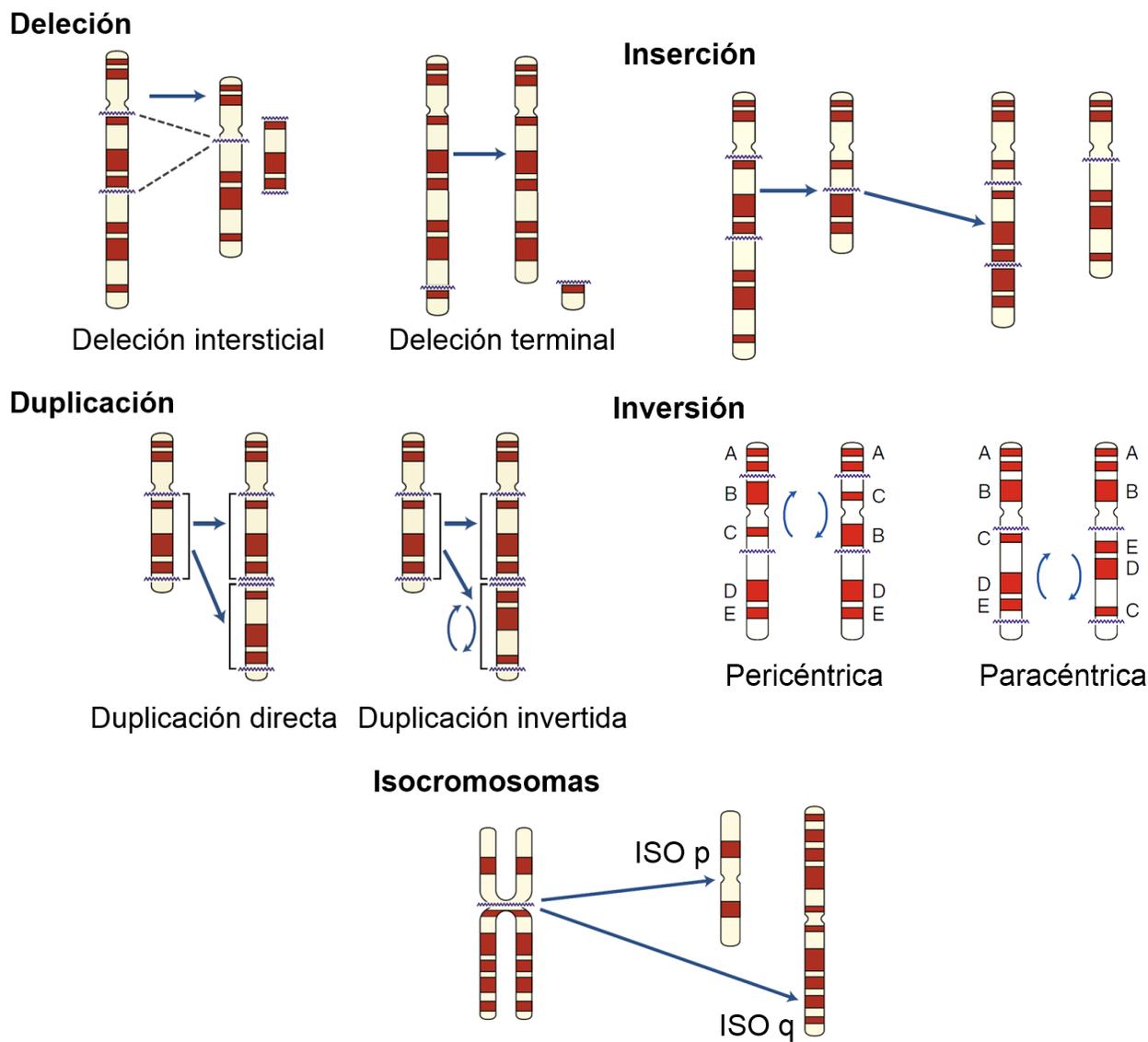
Por ultimo en la **Figura 3b**, se ejemplifican las consecuencias de la separación prematura de las cromátidas hermanas, la cual podría ocurrir tanto en meiosis I como en meiosis II, y crea una segregación aleatoria e inadecuada de cromátidas libres produciendo gametos con ACN (Egoszcue y Vidal, 2008; Vialard y Pellestor, 2008; Ioannou y Tempest, 2015).

### *1.2.2 Aberraciones cromosómicas estructurales*

Por su parte, las **aberraciones cromosómicas estructurales** (ACE) se definen como un cambio morfológico del cromosoma y se originan ya sea por errores en la replicación genética, o bien, por una reparación equivocada de las roturas cromosómicas, comúnmente producidas por agentes clastógenos, como la radiación ionizante, radiomiméticos o procesos oxidativos inducidos por químicos reactivos (Nussbaum, *et al.*, 2008; Preston, 2014; Roldán, 2016). Al encontrar comprometida la arquitectura del cromosoma, estos reordenamientos estructurales pueden clasificarse como equilibrados, si mantiene el complemento cromosómico original, o desequilibrados, si existe pérdida o ganancia de material genético (Nussbaum *et al.*, 2008).

Tras generarse daño al DNA, el fallo en los mecanismos de reparación propicia la aparición de ACE (Tafurt y Marin, 2014), dichas modificaciones pueden involucrar aumento, pérdida o reordenamiento de los genes a lo largo de todo el cromosoma (Granillo, Valdivia y Villarreal, 2014), siendo algunas de ellas estables e incluso capaces de transmitirse por cualquier división celular sin sufrir alteración, siempre que conserven los elementos cromosómicos esenciales, es decir, centrómero y telómeros funcionales (Nussbaum *et al.*, 2008).

De acuerdo al tipo de daño que acontezca en el DNA, podremos encontrar diversas ACE, por ejemplo: las *deleciones* son causadas por la ruptura simple de algún cromosoma, las *duplicaciones* requieren dos rupturas en un mismo cromosoma, por otro lado, las *inserciones* son el resultado de al menos tres roturas en dos cromosomas y en el caso de los isocromosomas, son efecto de una división centromérica anormal (Rosenberg y Drobnis, 2012). Cada uno de ellos se incluye en la **Figura 4**. Las ACE afectan a 1 de cada 400 nacidos vivos y pueden involucrar un cromosoma, dos cromosomas y pocas veces más de dos, situación en la cual son llamadas *anomalías cromosómicas complejas* (Rosenberg y Drobnis, 2012; Dimassi *et al.*, 2017).



**Figura 4.** Diferentes aberraciones cromosómicas estructurales (ACE): deleciones, inserción, duplicación, inversión e isocromosomas (modificado de Rosenberg y Drobnis, 2012).

## **Región 1p36**

El cromosoma 1 guarda un lugar sumamente importante en la especie humana, pues dada su compleja historia evolutiva, se compone por aproximadamente 200 millones de pares de bases, lo que representa el 9% del genoma total (Murphy *et al.*, 2003). Morfológicamente es el más grande de los cromosomas humanos y es de una importancia médica significativa ya que las disrupciones en este cromosoma están relacionadas con más de 350 enfermedades (Gregory *et al.*, 2006).

Dentro de este cromosoma, se encuentra la región *1p36*, **Figura 5**, un segmento subtelomérico numeroso en genes que, dada su susceptibilidad a sufrir alteraciones es considerada región crítica (Ruiz *et al.*, 2019).

Las regiones críticas son aprovechadas en diversos diseños experimentales para observar la inestabilidad cromosómica causada por fallos en la reparación en el DNA o en la respuesta ante el daño de agentes mutágenos. De esta manera se puede establecer la frecuencia de aberraciones, contrastadas con la frecuencia en individuos sanos, podrá facilitar el diagnóstico (Navarrete *et al.*, 2012).

Particularmente, la afectación de la región 1p36, se asocia a varias patologías (Contreras y Mancillas, 2004). Su deleción, afecta a 1 de cada 5000 nacimientos, e incluso, es conocida por ser la deleción cromosómica terminal más común en seres humanos (Bello y Rodríguez-Moreno, 2016). También, se ha observado que dicha deleción aparece en distintos tipos de cáncer, lo que sugiere, de acuerdo con Bagchi y Mills (2008), que podría contener algún importante gen de supresión tumoral.



**Figura 5.** Ideograma del cromosoma 1 mostrando en naranja la región **1 p36** (modificado de [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

### 1.3 Linfoma de Hodgkin.

En general, los linfomas se definen como neoplasias sólidas originadas por la transformación maligna de linfocitos B o T, siendo mucho más comunes los linfomas ocasionados por linfocitos B (Peña, 2016). Únicamente el 75% de los linfomas se producen en el tejido linfoide (ganglios, bazo, medula ósea), ya que también pueden originarse en cualquier otro tejido del organismo, además su incidencia varía en función de la edad, sexo, factores geográficos y étnicos (Navarro-Almenzar *et al.*, 2020).

El linfoma de Hodgkin (LH), como una de estas neoplasias, se caracteriza por la distorsión de la morfología normal de los ganglios linfáticos, así como por la presencia de las células Reed-Sternberg (RS), células multinucleadas que representan menos del 1% del tejido tumoral (Küppers y Hansmann, 2005; Lara-Torres y Ortiz-Hidalgo, 2009), el resto de este tejido está constituido por células no malignas; eosinófilos, macrófagos y linfocitos, tanto B como T, capaces de crear el microambiente del cual dependen las células RS (Küppers y Hansmann, 2005; Steidl, 2017).

Pérez-Zuñiga et al. (2019) describen a la célula RS con un núcleo multilobulado, con nucléolos pequeños y abundante citoplasma. Estas células tienen un inmunofenotipo variable, sin embargo, expresan primordialmente los marcadores CD15+, CD30+, CD45-, PAX5+ y CD20+, este último presente sólo en el 20-40 % de los pacientes (Gobbi et al., 2013; Alfonso et al., 2017; Oliveira y De Morales, 2017). La evidencia en secuenciación señala que las células RS derivan de linfocitos B que han logrado evadir la apoptosis a través de la pérdida de su linaje específico y distorsionando diversas vías de señalización como NF-κB y JAK-STAT, lo que facilita su escape inmunológico (Steidl, 2017).

En el LH, el número y grado de atipia de las células RS, junto con, el patrón de crecimiento y la composición del entorno celular, permiten realizar el adecuado diagnóstico de la enfermedad (Lara-Torres y Ortiz-Hidalgo, 2009). De esta manera, se reconocen dos grandes grupos de LH; el *linfocítico nodular* y el *linfoma clásico* (WHO, 2017). El LH clásico, a su vez agrupa cuatro subtipos histológicos; esclerosis nodular, celularidad mixta, depleción linfocítica, o bien, rico en linfocitos, **Tabla 2** (Bellas, 2004; Lara-Torres y Ortiz-Hidalgo, 2009; Frías et al., 2019; Pérez-Zuñiga et al., 2019).

**Tabla 2.** Frecuencia de los subtipos histológicos en LH.

<b>Subtipo histológico</b>	<b>Frecuencia (%)</b>
<b>Clásico</b>	<b>95</b>
Esclerosis nodular	40-75
Celularidad mixta	20-40
Depleción linfocítica	5-15
Rico en linfocitos	5-15
<b>Predominio linfocítico nodular</b>	<b>5</b>

(Alfonso *et al.*, 2017)

De acuerdo con Sung et al. (2021) en su estudio sobre la incidencia y mortalidad de 36 tipos de cáncer en 185 países, durante 2020 se habían registrado un total de 80 mil nuevos casos de LH y más de 23 mil nuevas muertes a causa de esta enfermedad, representando el 0.43 y 0.23 % de los casos y muertes por cáncer en todo el mundo. A su vez, la prevalencia del LH en los últimos 5 años sumó 281 112 diagnosticados, distribuidos principalmente en Asia (98 618 casos), seguida por Europa (78 086 casos) y América con 72 790 casos (IARC, 2020). La incidencia

del LH en la población global tiene un comportamiento bimodal, es decir, hay dos picos de incidencia; el primero en los jóvenes-adultos (20-30 años) y el segundo, en adultos mayores (>60 años), aunque también es posible verlo en niños y adolescentes pues en ellos es el linfoma más frecuente (INC, 2013).

El LH afecta 1.43 veces más a hombres que a mujeres. Además, el riesgo de desarrollar LH entre personas con un mayor status socioeconómico es más alto (Khodamoradi *et al.*, 2018; Sung *et al.*, 2021). De igual manera, LH tiene mayor incidencia en países más desarrollados, mientras que la mortalidad es más alta en los países en desarrollo, lo que puede estar relacionado con las diferencias de acceso a la salud y a las innovaciones terapéuticas (Khodamoradi *et al.*, 2018; Rivas-Vera *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2019).

En los Estados Unidos el LH afecta a más de 8 mil pacientes anualmente. Tan sólo en 2019, esta cifra representó aproximadamente el 10% de los linfomas totales que se padecen en este país. Además, la mayoría de estos pacientes fueron diagnosticados entre los 15 y 30 años de edad, seguidos por un segundo pico en adultos de 55 años o más (Hundall y Küppers, 2018; Siegel *et al.*, 2019).

Por su parte, en Latinoamérica ocurren más del 10% de los casos y muertes por LH. En México, el cáncer de órganos hematopoyéticos causa casi el 50% de las muertes en la población infantil (0 a 17 años) y se estima que el LH representa la segunda causa de cáncer en la edad pediátrica (Rivas-Vera *et al.*, 2019; Covarrubias-Espinoza *et al.*, 2016; INEGI, 2018). Durante 2016, México diagnosticó 2 278 casos de LH, 1 006 en mujeres y 1 272 en hombres, encontrando la incidencia más alta en adultos mayores de 60 años, seguido adultos entre 20 y 24 años, además 535 pacientes murieron en el mismo periodo (Rivas-Vera *et al.*, 2019). Ya en el 2020, México reportó 2 266 nuevos casos de LH y 610 decesos, mientras que la prevalencia de esta enfermedad durante los últimos 5 años alcanzó más 7 400 casos en nuestro país (IARC, 2021).

Aunque la incidencia del LH se ha mantenido estable en el mundo desde 1990 (Zhou *et al.*, 2019), en general, el Linfoma de Hodgkin es una enfermedad muy heterogénea, que varía en diversos parámetros como edad, sexo, clase social o localización geográfica.

### 1.3.1 Etiología

Hasta el día de hoy, el origen del linfoma de Hodgkin continúa siendo un tema debatido. En un principio, diversos estudios epidemiológicos sospecharon la participación de algún agente infeccioso en el desarrollo del LH. Más tarde, el paralelismo de incidencia entre los niños con poliomielitis y LH sugirió la posibilidad de que dicho agente fuera un virus (Bellas, 2004; Jarrett, 2015). Sin embargo, fue hasta el año 1987, que por primera vez se detectó DNA del *Virus Epstein Barr* (EBV) en muestras de pacientes con LH (Weiss *et al.*, 1987; Bellas, 2004),

EBV fue el primer oncovirus humano en ser descrito en 1964, tras el estudio de un paciente con linfoma de Burkitt (Esau, 2017). Se descubrió entonces que EBV tiene presencia en el 95% de la población mundial y que se transmite durante la infancia (1 a 6 años) y la adolescencia (14 a 20 años), con la posibilidad de permanecer latente durante toda la vida.

EBV tiene un blanco habitual en los linfocitos B, protagonistas en la patogénesis tanto de LH como linfoma de Burkitt (Diebold y Nicolás, 2001; IARC, 2012). Además, las células RS expresan los genes *LMP-1*, *LMP-2a* y *EBNA-1*, característicos de la latencia asociada a EBV

(Pérez-Zúñiga *et al.*, 2019). Este virus también se ha vinculado a otros linfomas de células T y NK, así como a variados síndromes autoinmunes que predisponen al cáncer (IARC, 2012).

En la actualidad, se ha encontrado que EBV sólo está presente en el 50% de los casos globales de LH, llegando incluso a decaer al 20-40%, según el subtipo histológico predominante (Lara-Torres y Ortiz-Hidalgo, 2009; Campo *et al.*, 2011; De Toledo y Sábado, 2016). Por el contrario, en algunos países desarrollados, la presencia viral se eleva a 90% (Stefan y Harif, 2017) y, en México, la prevalencia de EBV alcanza únicamente al 64% de los pacientes con LH (Romero *et al.*, 2004; Rivas-Vera *et al.*, 2019).

Los casos, donde no es posible demostrar la presencia de EBV, sugieren la existencia de otros factores de riesgo que pueden dar origen a la enfermedad, como la predisposición genética, historial médico o la participación de otros virus (Engert y Younes, 2020).

En 2016, Roemer y colaboradores relacionaron el LH clásico con alteraciones de la región 9p24.1 (en casi el 100% de los pacientes). Para las células RS, la ganancia de copias en esta región resulta en una mayor expresión de ligandos asociados a receptores de muerte celular

programada (PD-1), lo que inhibe la activación de los linfocitos T y la respuesta antitumoral oportuna.

El estudio a más de 5000 pacientes con LH, ha señalado cerca de 18 involucrados en la aparición de esta enfermedad. Dichos *loci* aumentarían el riesgo de padecer LH al afectar procesos biológicos clave como: la función y diferenciación de linfocitos T o la activación de NF-kB (Engert y Younes, 2020).

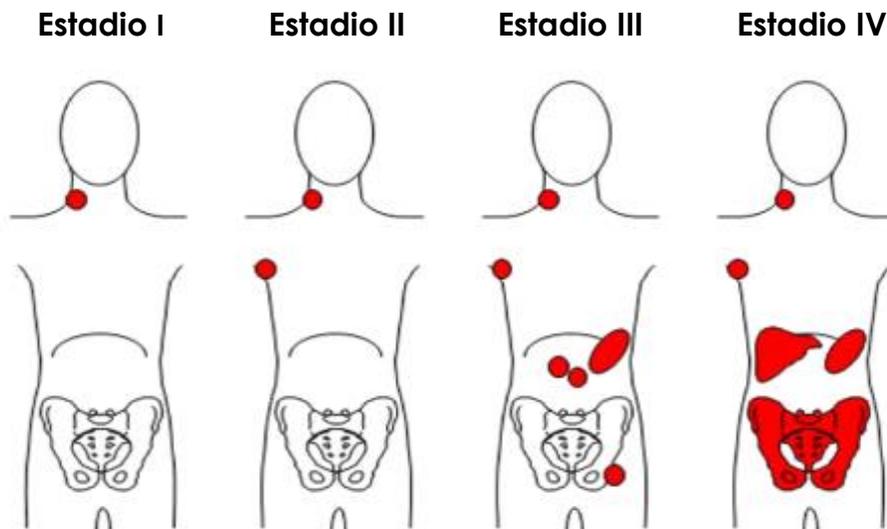
También se ha observado que el riesgo de padecer LH aumenta hasta tres veces cuando se cuenta con un familiar que haya padecido la enfermedad, siendo esto mucho más frecuente entre hermanos varones (Goldin *et al.*, 2004; Engert y Younes, 2020).

Algunos trabajos más han considerado factores de riesgo alternativos: como el tabaquismo y alcoholismo (Besson *et al.*, 2006; Tramacere *et al.*, 2012), sin embargo, no son concluyentes y recomiendan cautela en la interpretación de sus resultados, demostrando los amplios esfuerzos que se han hecho para establecer una etiología satisfactoria del LH.

### 1.3.2 Estadificación del linfoma de Hodgkin

En la década de 1970 se desarrolló el sistema Ann Arbor; una clasificación que detalla en los pacientes con LH la extensión, distribución y sintomatología de la enfermedad, lo que permite evaluar su aptitud para un tratamiento (Engert y Younes, 2020).

Este sistema se basa en la capacidad de tiene LH para diseminarse por el cuerpo, considerando además su localización: por encima o debajo del diafragma, **Figura 6** (Gobbi *et al.*, 2013).



**Figura 6.** Estadios de diseminación del LH (modificado de INC, 2013).

El **estado I** describe la afectación de un sólo ganglio linfático o una sola estructura linfoide (como el timo o el bazo), o bien, un grupo de nódulos que son adyacentes; el **estado II** refiere dos o más grupos ganglionares afectados en el mismo lado del diafragma; el **estado III** involucra nódulos en ambos lados del diafragma, incluso afectando al bazo; mientras que el **estado IV** describe una amplia diseminación de la enfermedad en sitios discontinuos al sistema linfático, implicando a otros órganos como el hígado o la medula ósea (Gobbi *et al.*, 2013; Engert y Younes, 2020). Una subdivisión adicional, asigna la letra **A** para declarar sintomatología inexistente y la **B** para la manifestación sinomas como fiebre (>38 °C), pérdida de peso corporal o sudoración excesiva (Pérez-Zúñiga *et al.*, 2019).

#### 1.3.4 Tratamiento

Con el propósito de establecer un adecuado tratamiento, los pacientes con LH son situados en distintas etapas (**Tabla 3**) que consideran el desarrollo o estadio de la enfermedad y la presencia de factores desfavorables; el estadio avanzado se asocia a un peor pronóstico e influye en la toma de decisiones terapéuticas (Pérez-Zúñiga *et al.*, 2019;

Murrieta *et al.*, 2009). Entre los principales factores considerados se encuentra el subtipo histológico, la edad, la presencia de síntomas B, sedimentación globular y masa mediastinal con diámetro mayor a 10 cm (Murrieta *et al.*, 2009).

Para los pacientes con estadios aún localizados, el tratamiento consiste en la combinación de quimioterapia y radioterapia, mientras que para la etapa avanzada se emplea mayor número de ciclos sin radioterapia (Ansell, 2016; Caballero, 2016).

**Tabla 3.** Grupos para el tratamiento de pacientes con LH

<b>Etapa</b>	<b>Descripción</b>
Temprana favorable	Estadio I – II, sin factores desfavorables
Temprana desfavorable	Estadio I – II, con factores desfavorables
Enfermedad avanzada	Estadio III – IV

(Pérez-Zúñiga *et al.*, 2019)

El tratamiento de primera línea contra el LH es el esquema quimioterapéutico **ABVD** (adriamicina, bleomicina, vinblastina y dacarbacina) seguido de radioterapia de campo extendido, la cual consiste en irradiación sobre los ganglios involucrados y colindantes (Engert y Horning, 2011; Gobbi *et al.*, 2013). Incluso en pacientes con diagnóstico favorable se prefiere la combinación de ambas terapias: 2 ciclos de ABVD con 20 Gy de radioterapia, pues se han demostrado tasas de recaída importantes al usar únicamente radioterapia (Gobbi *et al.*, 2013; Caballero, 2016). Para pacientes que no pueden recibir radioterapia debido al riesgo de efectos secundarios graves, se opta sólo por la aplicación de 4-6 ciclos de ABVD (Caballero, 2016).

Para la etapa avanzada de la enfermedad, que incluye los estadios clínicos III y IV, se recomiendan de 6 a 8 ciclos de ABVD sin radioterapia (Caballero, 2016; Younes y Ansell, 2016). En la **Tabla 4** describe el mecanismo de acción de cada compuesto que conforma el esquema ABVD.

La doxorubicina, también llamada adriamicina, es un compuesto que pertenece al grupo de las antraciclinas. Fue aislado de una cepa de *Streptomyces peucetius* a mediados del siglo pasado, tras identificarse su actividad antitumoral. Algunos efectos secundarios por su empleo

son alopecia, estomatitis, mielosupresión y cardiotoxicidad, donde se reporta que hasta el 1.7% de los pacientes llegan a fallecer debido a falla cardiaca (Arcamone, 1981; Murray, 2014).

**Tabla 4.** Fármacos empleados en el esquema ABVD

<b>Tipo</b>	<b>Fármaco</b>	<b>Efecto</b>	<b>Alteración citogenética</b>
<b>Alquilantes</b>	Dacarbacina	Daño en bases nitrogenadas. Formación de aductos. Roturas de cadena doble.	Deleciones, inserciones, inversiones y translocaciones cromosómicas.
<b>Antibióticos</b>	Doxorrubicina (adriamicina) Bleomicina	Entrecruzamiento del DNA. Roturas de cadena sencilla y de cadena doble. Intercalante del DNA. Generación de radicales libres	Translocaciones, acéntricas, disentéricas y otras aberraciones involucradas en daño a los telómeros.
<b>Inhibidor de la mitosis</b>	Vinblastina	Inhibición del huso mitótico	Aneuploidías y poliploidías

(Modificado de Frías *et al.*, 2020).

La bleomicina es un glicopéptido aislado del hongo *Streptomyces verticillus*. Como antineoplásico es ampliamente empleado por su bajo efecto inmunosupresor y mielosupresor. Sin embargo, desde 1971 se conoce su importante toxicidad pulmonar, llegando a provocar neumonitis y fibrosis pulmonar hasta en el 20% de los pacientes tratados (Cabrera, 2006; Böll *et al.*, 2018).

Por su parte la vinblastina es un vinca alcaloide que desde su aparición en la década de 1950 demostró una gran eficacia quimioterapéutica contra el LH (Sohier *et al.*, 1968), además del cáncer testicular, de seno, de ovario, riñón y vejiga, entre otros. Este agente se une fuertemente a la tubulina e inhibe su polimerización en microtúbulos, comprometiendo la formación del huso mitótico y bloqueando así la división celular. Muestra toxicidad hematológica, disminuye los glóbulos blancos y en menor medida las plaquetas y glóbulos rojos. Sus afectaciones sintomáticas promueven náuseas, vómitos, estreñimiento, alopecia, disnea y dolor de cabeza (Gigant *et al.*, 2005; Zakariya *et al.*, 2017).

Por último, la dacarbacina es un agente alquilante antineoplásico de administración oral, tradicionalmente empleado para tratar el melanoma metastásico. Los agentes alquilantes fueron las primeras moléculas desarrolladas contra el cáncer, en 1940. Sin embargo, la dacarbacina

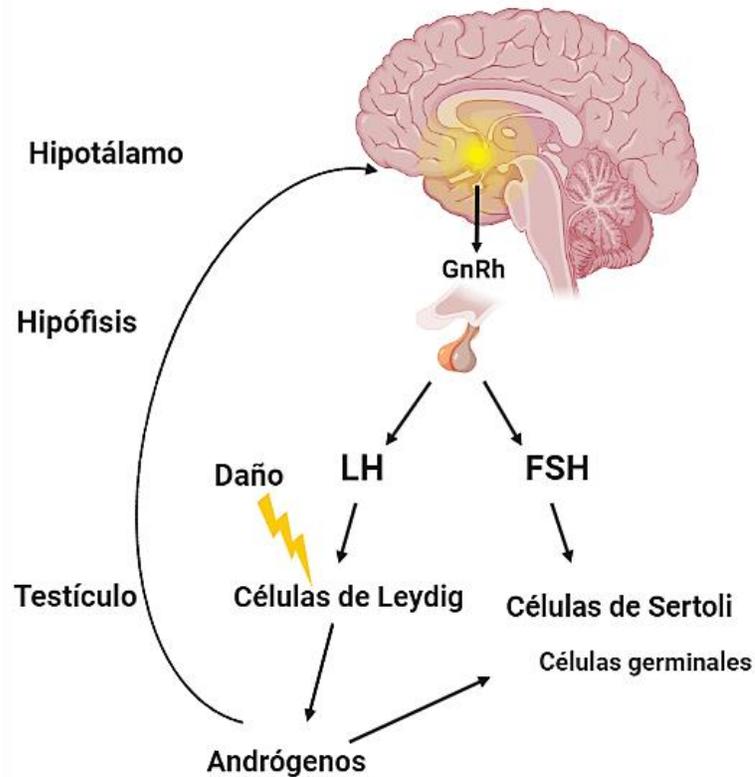
no tuvo aprobación clínica hasta 1975. La dacarbacina se combina con otros fármacos para conformar el tratamiento de varias enfermedades como el LH, los neuroblastomas y algunos sarcomas. Aunque los detalles de su mecanismo de acción no han sido esclarecidos totalmente, se conoce que la dacarbacina interfiere con la síntesis de purinas al actuar como una purina análoga y alquilante. Sus efectos antitumorales están relacionados con la inducción de aductos de metilo en el ADN (Murray, 2014; Al-Badr y Alodhaib, 2016).

#### **1.4 Efectos reproductivos del tratamiento antitumoral**

La mejora en los tratamientos anticáncer se traduce en un aumento de la sobrevivencia. No obstante, tanto los radio- como quimioterapéuticos tienen sustanciales efectos sobre la calidad de vida a largo plazo y una exposición durante la etapa reproductiva puede comprometer la fertilidad en sobrevivientes jóvenes (Fossa y Magelssen, 2004; Tremblay *et al.*, 2017).

En varones, los tratamientos antitumorales disminuyen la función reproductiva al interferir con la espermatogénesis, **Figura 7** (Kasper *et al.*, 2012; Tremblay, Beaud y Delbès, 2017). Este efecto, que puede dar

origen a anomalías cromosómicas, puede también variar en función del protocolo quimioterapéutico, así como al tiempo transcurrido desde la exposición (Bujan y De Mas, 2002).



**Figura 7.** Eje hipotálamo-hipófisis-gónada en el hombre (Creado con BioRender).

Aunque se ha documentado el restablecimiento de la espermatogénesis posterior a los tratamientos contra el cáncer, otros elementos como la integridad del ADN, la cromatina y el epigenoma de los espermatozoides pueden verse alterados en los supervivientes de esta enfermedad (Gerson, 2000; Tremblay *et al.*, 2017). Incluso se ha observado que valores aceptables en la evaluación seminal, no

necesariamente reflejan una óptima integridad genética **Tabla 5** (Liu y Liu, 2013).

Los agentes quimioterapéuticos pueden afectar la tasa de natalidad entre los pacientes expuestos. El aborto espontáneo y las malformaciones congénitas están altamente asociadas con la pérdida de la integridad genética del espermatozoide (Quintero-Vázquez *et al.*, 2015).

**Tabla 5.** Valores de referencia para espermatozoscopia.

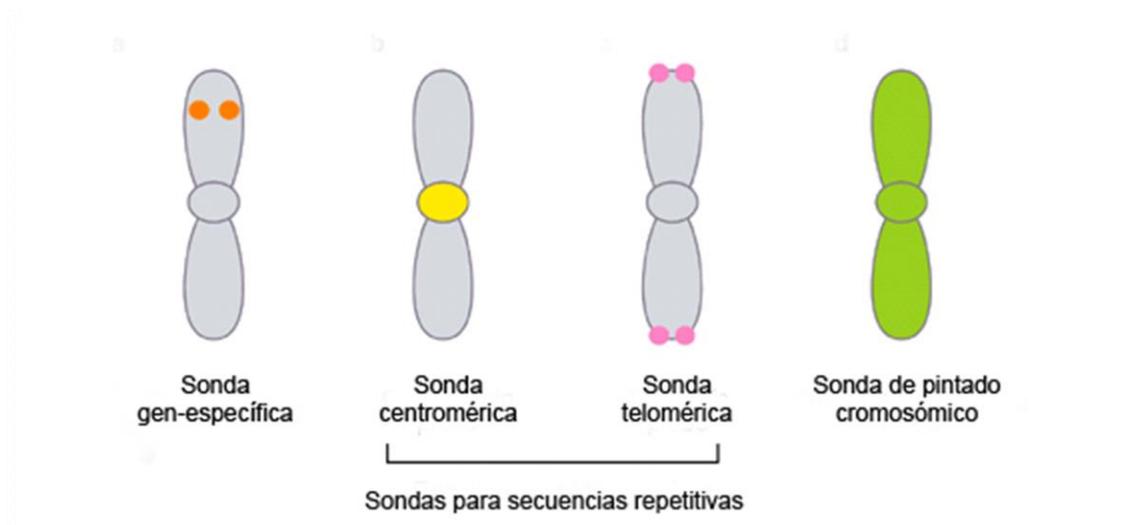
<b>Parámetro</b>	<b>Valor de referencia</b>
Licuefacción total (min)	60
pH	7.2 - 7.8
Volumen (ml)	2
Concentración espermática (10 <sup>6</sup> células/ml)	20
Motilidad progresiva (%)	50
Viabilidad (%)	75
Formas normales (%)	15

(WHO,1999)

### **1.5 Hibridación fluorescente *in situ***

Aunque el análisis seminal continúa siendo la principal herramienta en la evaluación de la función reproductiva, es necesario realizar un estudio más profundo para poder observar efectos genotóxicos sobre el

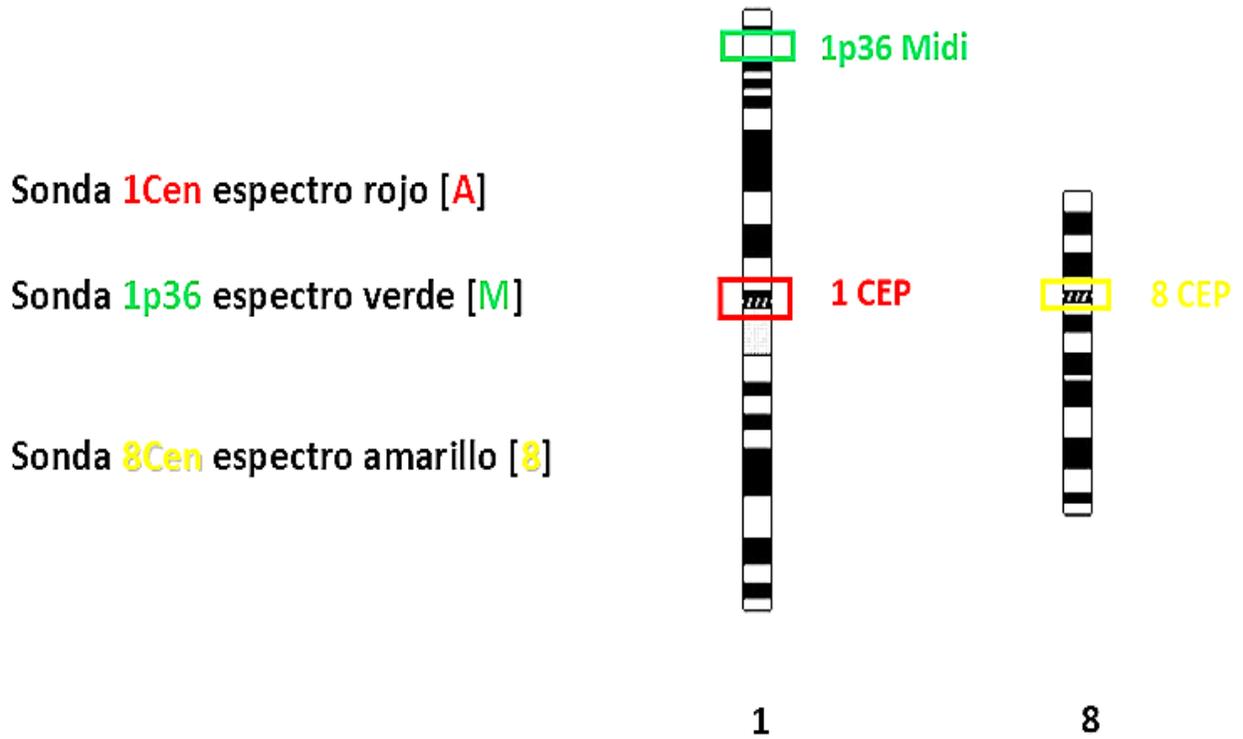
espermatozoide y, ensayo molecular de hibridación fluorescente *in situ* (FISH, por sus siglas en inglés) permite profundizar ese estudio. Esta técnica se fundamenta en la propiedad fisicoquímica de desnaturalización y renaturalización de la doble cadena de DNA al exponerse a concentraciones salinas o a un aumento en la temperatura. De esta forma se le puede hacer hibridar con una cadena de DNA complementaria (sonda asociada a un fluoróforo) con el fin de detectar la presencia o ausencia de secuencias de nucleótidos específicas. Estas sondas pueden marcar diversas secciones cromosómicas como lo son genes específicos, telómeros, centrómeros o el cromosoma por completo, **Figura 8** (Salazar *et al.*, 2016).



**Figura 8.** Ejemplo de diferentes tipos de sondas en hibridación fluorescente *in situ*, FISH (modificado de McNeil y Ried, 2016).

### 1.5.1 FISH-AM8

Existe una modificación del ensayo FISH el cual permite identificar aberraciones cromosómicas simultáneamente a través del empleo de sondas con distinto espectro de excitación, esta modificación es llamada FISH multicolor (M-FISH, por sus siglas en inglés). Cuando éste ensayo se lleva a cabo en el espermatozoide, que es una célula interfásica, donde el ADN se encuentra en alto grado de compactación, ésta modificación es llamada FISH – AM8; pues toma su nombre de las regiones cromosómicas que identifica como se esquematiza en la **Figura 9**. De ésta manera podemos lograr la detección de aberraciones cromosómicas numéricas, así como dos grandes categorías de anomalías estructurales las duplicaciones y deleciones cromosómicas, de manera simultánea (Sloter *et al.*, 2000; Tempest *et al.*, 2008).



**Figura 9.** Esquema de sondas para FISH - AM8, para el cromosoma 1 y el cromosoma 8 (modificado de Roldán y López, 2017).

## **2. JUSTIFICACIÓN**

En nuestro país el LH es uno de los padecimientos importantes que afecta a la población infantil y juvenil. Sin embargo, su tratamiento con el esquema quimioterapéutico ABVD, aunque eficiente, puede representar un peligro para la salud reproductiva por su elevada toxicidad. Los varones que sobreviven al tratamiento con ABVD ven comprometida la integridad genética de sus gametos en edad reproductiva, lo que los sitúa en la posibilidad de transmitir un conjunto de padecimientos asociados a la inestabilidad genética con consecuencias adversas en su descendencia. Un estudio con el ensayo molecular FISH-AM8 puede ayudar a establecer los efectos de estos quimioterapéuticos sobre las células espermáticas de pacientes con LH.

## **3. HIPÓTESIS**

Existe evidencia que señala la susceptibilidad de las células germinales a defectos genéticos originados por distintos antineoplásicos, por lo tanto, si estas son expuestas al esquema ABVD en pacientes con LH, las células germinales de dichos sobrevivientes manifestarán efectos genotóxicos.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 General**

Evaluar los efectos citotóxico y genotóxico en espermias de pacientes con LH tratados con el esquema quimioterapéutico ABVD.

### **4.2 Particulares**

Evaluar los diferentes parámetros seminales para establecer la calidad del líquido seminal de sobrevivientes al LH, asociados a citotoxicidad.

Determinar mediante FISH-multicolor AM8 las aberraciones cromosómicas numéricas en espermatozoides de pacientes con LH tratados con el esquema ABVD.

## **5. MÉTODO.**

### **5.1 Criterios de inclusión**

#### **Individuos sanos**

Se incluyeron en este estudio individuos sanos y se tomaron los siguientes criterios:

- i) Muestras de hombres sanos mayores de 18 años (sin antecedentes clínicos de LH).
- ii) Participación voluntaria con carta firmada de consentimiento informado.
- iii) Cuestionario de tamizaje, el cual describe hábitos alimenticios, enfermedades y exposición a medicamentos incluyendo consumo de cigarrillos, drogas o alcohol.

#### **Pacientes con LH y expuestos al tratamiento ABVD**

- i) Pacientes jóvenes varones mayores a 18 años.
- ii) Participación voluntaria con carta firmada de consentimiento informado.
- iii) Diagnosticados clínicamente con Linfoma de Hodgkin.

iv) Que finalizaron su tratamiento con el esquema ABVD con al menos 6 meses previos a la toma de muestra.

## **5.2 Criterios de Exclusión**

En todos los casos:

- i) Individuos con un periodo de abstinencia sexual menor a 3 días.
- ii) Individuos con vasectomía o bien que en los tres meses previos a la toma de muestra hubieran desarrollado algún tipo de enfermedad crónico-degenerativa o infectocontagiosa.
- iii) Que fueran descartados por algún parámetro del cuestionario de tamizaje.

## **5.3 Procesamiento de la muestra**

### **5.3.1 Espermatobioscopía**

Después del tiempo de licuefacción (1 hora tras su recolección) se comenzó la medición de pH, viscosidad y color. Para la progresión, viabilidad, morfología y densidad espermática se realizaron conteos de

200 espermatozoides por parámetro. Se fraccionó el líquido seminal para ser almacenado a -20 °C, finalmente las muestras fueron clasificadas en normal (NL) o no normal (NN) de acuerdo con los valores de referencia del manual de laboratorio de OMS 1999 (**Tabla 5**).

### **5.3.2 Ensayo FISH-M**

#### **Preparación y fijación de la muestra espermática**

Los frotis se realizaron al descongelar la muestra a temperatura ambiente y homogenizar con una pipeta Pasteur, tomando de ella de 5-7 µl. Se elaboraron dos laminillas por individuo dejando secar a temperatura ambiente por 48 h. Previo a la descondensación del núcleo espermático, el frotis fue fijado en metanol (Merck. Darmstadt, Alemania) al 100 % por 60 min.

Posteriormente se introdujo a DTT (ditiotreitól, Sigma, USA) en hielo por 30 min y consecuentemente en LIS (3,5-ácido diiodosalisílico, Sigma, USA) a temperatura ambiente por 70 min.

#### **Sondas e hibridación**

Se desnaturalizó la mezcla de sondas a 78 °C para aplicar sobre la zona de hibridación, dicha mezcla consiste en; Sonda 1Cen, espectro rojo (Vysis, Abbott, USA); Sonda 1p36 espectro verde (SureFISH, Agilent,

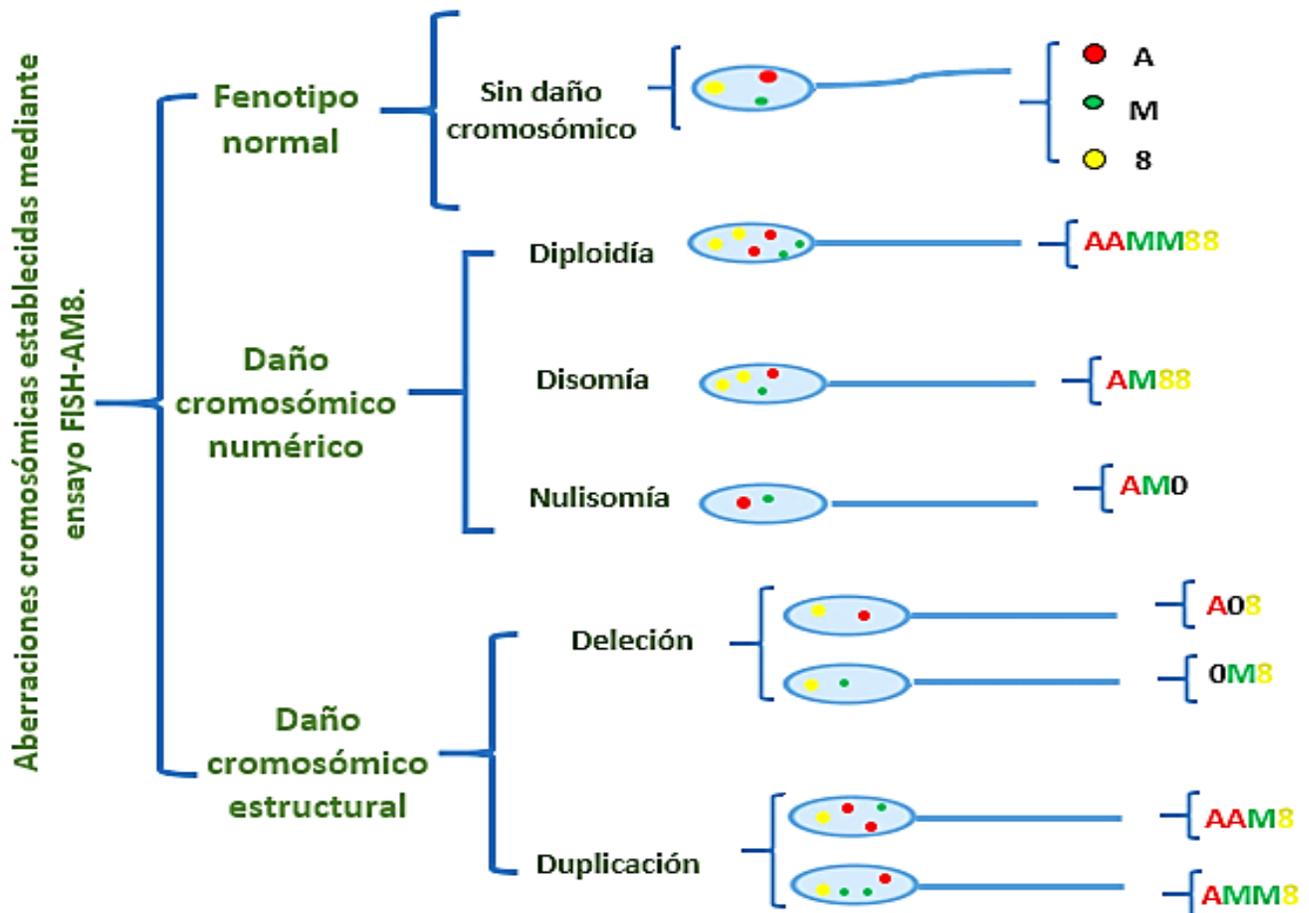
USA) y Sonda 8 Cen espectro amarillo (verde + rojo, Vysis, Abbott, USA), para después colocarlas de manera secuencial en alcohol al 70, 85 y 100% (V/V).

Para la hibridación se preparó una cámara húmeda con las laminillas preincubadas a 37 °C por 36 h en obscuridad. Para el lavado post-hibridación, una vez transcurrido ese tiempo, se retiraron las laminillas de la cámara húmeda y se retiró el cubreobjetos. Posteriormente se introdujo en formamida/2X SSC (IBI, New Heaven, USA) al 50 % (V/V) a temperatura de 45 °C por 10 min e igualmente en solución citrato de sodio (2X SSC) por 10 min a 37 °C y, finalmente, un lavado más en 2X SSC por 10 min, a temperatura ambiente. Finalmente se aplicó el medio de montaje (DAPI con Vectasheld, Vector, USA) sobre la zona de hibridación.

## **Evaluación**

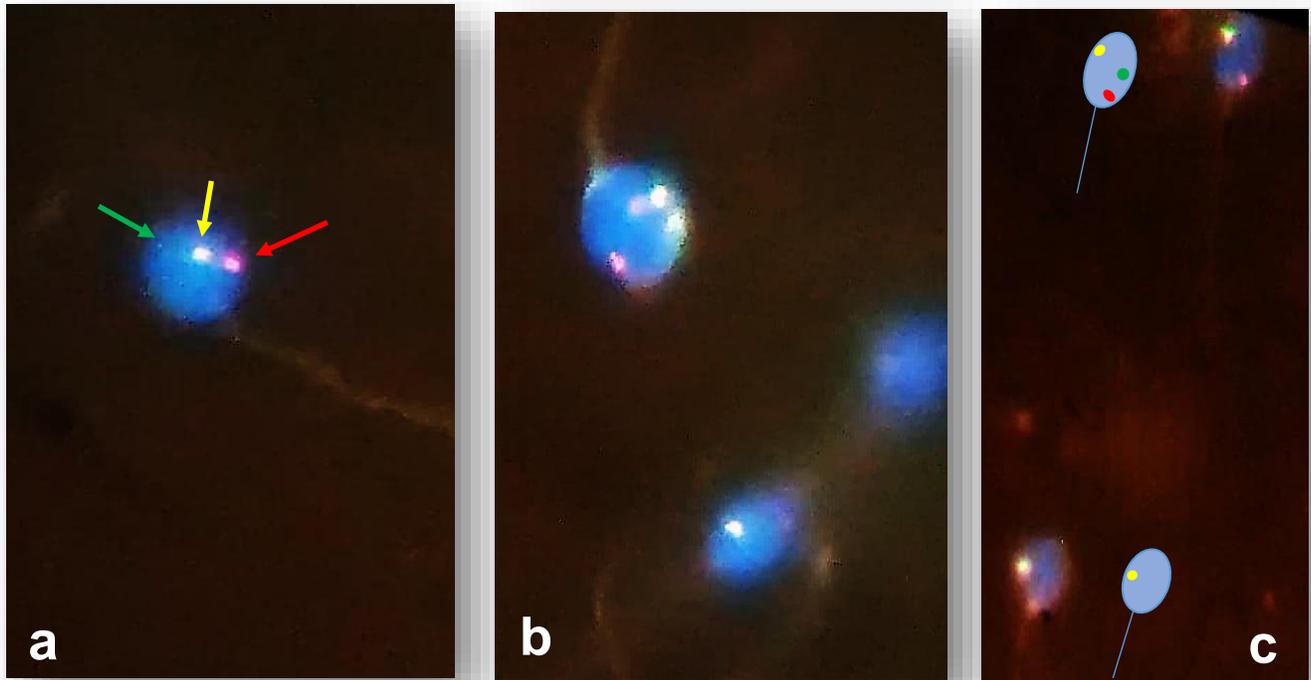
Se cuantificaron 5000 células por preparación en el microscopio de epifluorescencia a 100X con los siguientes filtros: Texas red (580-640 nm), FITC (490-560 nm), simples; dobles (FITC/Texas red) y triple banda (DAPI [358-461 nm]/FITC/Texas red) siguiendo los criterios de evaluación propuestos por Marchetti *et al* (2008).

Los fenotipos observados fueron catalogados como se esquematiza en la **Figura 10**: Sin daño cromosómico, fenotipo AM8; con daño cromosómico numérico, fenotipos AAMM88 (diploidía), AM88 (disomía), AM0 (nulisomía); y con daño cromosómico estructural, fenotipos A08 (delección), OM8 (delección), AAM8 (duplicación), AMM8 (duplicación).



**Figura 10.** Aberraciones cromosómicas establecidas mediante FISH - AM8 (modificado de Roldán y López, 2017).

Por su parte, la **Figura 11** exhibe esta correspondencia esquemática con tres microfotografías: un espermatozoide sin daño cromosómico, **Figura 11a** y dos espermatozoide con daño cromosómico numérico, **Figura 11b** y **11c**.



**Figura 11.** Microfotografías FISH-AM8 en espermatozoides humanos. **(a)** espermatozoide sin daño cromosómico: **AM8**. **(b)** espermatozoide con daño cromosómico numérico: **AAMM88**, diploidía. **(c)** espermatozoide con daño cromosómico numérico: **008**, nulisomía del cromosoma 1. Microscopía de epifluorescencia (100X), filtro triple banda (DAPI/FITC/Texas red). Citogenética y Mutagénesis, Laboratorio 2, 1er piso, UMIEZ, FES-Z UNAM.

#### 5.4 Análisis Estadístico

Con el fin de contrastar la frecuencia de anomalías cromosómicas en el grupo tratado (ABVD) y el grupo control (sin exposición) se aplicó Chi cuadrada con corrección de Yates ( $\chi^2 - Y$ ,  $p < 0.05$ ). Por otra parte,

para establecer diferencias entre los parámetros seminales de ambos grupos se empleó la prueba t-student ( $p < 0.05$ ).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Población estudiada

Se estudió un total de 7 muestras: 4 individuos sanos sin antecedentes clínicos y 3 de pacientes jóvenes clínicamente diagnosticados con LH. Los pacientes con LH fueron captados en el servicio de Hematología, departamento de Oncología, del Hospital General de México. Las edades medias ( $\pm$  DS) de los individuos control y expuestos a ABVD fueron semejantes entre sí ( $22 \pm 2.9$  y  $23 \pm 2.6$ , respectivamente).

El subtipo histológico de los participantes con LH fue celularidad mixta y recibieron en promedio 10.7 dosis por cada 5.3 ciclos de ABVD. El estadio de la enfermedad fue distinta entre los participantes, así como el tiempo sin exposición, donde el análisis individual aclarara para uno de los pacientes (NL-264) que el dato no fue declarado, **Tabla 6**.

Todos los individuos participantes firmaron el respectivo consentimiento informado y respondieron el cuestionario de tamizaje.

**Tabla 6.** Datos clínicos de los individuos expuestos y controles

<b>Muestra</b>	<b>Edad en años</b>	<b>Régimen quimioterapéutico</b>	<b>Tiempo sin exposición en meses</b>	<b>Tipo de Linfoma</b>	<b>Estadio</b>
<b><u>Controles</u></b>					
NL-111	24	--	--	---	--
NL-188	25	--	--	---	--
NL-200	19	--	--	---	--
NL207	20	--	--	---	--
<b>Media (± DS)</b>	<b>22 (2.9)</b>				
<b>Esquema ABVD</b>					
NL-190	22	ABVD: 8 dosis/4 ciclos	16	Celularidad mixta	I A
NN-177	26	ABVD: 8 dosis/4 ciclos	11	Celularidad mixta	IV A
NL-264	21	ABVD: 12 dosis/ 6 ciclos	-	Celularidad mixta	III A
<b>Media (± DS)</b>	<b>23(2.6)</b>		<b>13.5 (3.5)</b>		

## 6.2 Parámetros seminales

Se llevó a cabo la evaluación de las muestras seminales de los participantes por espermatobioscopia directa a fin de establecer la calidad seminal en concordancia con el manual de laboratorio para evaluación de semen humano de la OMS (1999).

**Tabla 7.** Parámetros de espermatobioscopías en ambos grupos de estudio.

<b>Muestra</b>	<b>Volumen (mL)</b>	<b>Color</b>	<b>pH</b>	<b>Viscosidad</b>	<b>Densidad (x10<sup>6</sup>esp/mL)</b>	<b>Viabilidad (%)</b>	<b>Morfología (%)</b>
<b>Controles</b>							
NL-111	4.5	Opalescente	8	Gota	154.00	91.75	22.00
NL-188	4.3	Opalescente	8	Hilo	148.00	32.75	21.75
NL-200	3.1	Opalescente	8	Hilo	112.52	44.25	25.75
NL-207	1.4	Opalescente	8	Gota	158.00	60.25	34.50
<b>Media (± DS)</b>	<b>3.3 (1.42)</b>	<b>-</b>	<b>8 (0)</b>	<b>-</b>	<b>143.13 (20.82)</b>	<b>57.25 (25.62)</b>	<b>26 (5.95)</b>
<b>Esquema ABVD</b>							
NL-190	0.7	Opalescente	7	Hilo	62.5	57.5	27.5
NN-177	2.7	Opalescente	8	Hilo	27.0	60.5	11.5
NL-264	0.75	Opalescente	8.5	Gota	106.0	77.5	20.0
<b>Media (± DS)</b>	<b>1.38 (1.14)</b>	<b>-</b>	<b>7.8 (0.76)</b>	<b>-</b>	<b>65.2 (39.6) *</b>	<b>65.2 (10.8)</b>	<b>19.67 (8.01)</b>
<b>OMS (1999)</b>	> 2.0	Opalescente	7,2-7,8	Gota	≥ 20	75	> 15
<b>OMS (2010)</b>	≥ 1.5	Opalescente	≥7.2	Gota	≥ 15	58	> 4

t – student \* p < 0.05 n= 35 404 espermatozoides.

De este modo, las muestras fueron clasificadas por código de identificación según lo establecido en la sección 5.3.1. Los datos se resumen comparativamente en la **Tabla 7**.

Todos los valores promedio de las muestras control son próximos a los valores de referencia establecidos OMS 1999, OMS 2010. En el grupo expuesto a ABVD, las muestras NL-264 y NL-190 fueron clasificadas como normales, al mostrar adecuados valores de referencia para la viabilidad y la densidad espermática, ya que, no evidenciaron efecto citotóxico.

Por el contrario, la muestra NN-177, presentó baja proporción de formas normales (11.5%) y viabilidad (60.5), así como el valor más bajo de densidad espermática entre el grupo de estudio ( $27 \times 10^6$  esp/mL). Todos estos parámetros sensibles para la determinación de la adecuada calidad seminal, sitúan esta muestra medianamente por debajo de los valores OMS 1999 (formas normales >15 %; Viabilidad 75 %; densidad espermática  $\geq 20 \times 10^6$  esp/mL), aunque cabe mencionar que los valores fueron cercanos a los propuestos por OMS en 2010.

En contraste, se demostró una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre la densidad espermática promedio ( $\times 10^6$  esp/mL) del grupo expuesto a ABVD ( $65.2 \pm 39.6$ ) y el grupo control ( $143.13 \pm 20.8$ ).

### 6.3 Aberraciones Cromosómicas

Se leyó un total de 35 404 células (N) con la metodología FISH-AM8; de las cuales 20 263 pertenecen a las muestras control y 15 141 a pacientes expuestos, así se evaluaron en promedio 5057.7 ( $\pm 40.9$ ) espermatozoides por muestra.

Se pudo observar que en las muestras control las aberraciones numéricas fueron más frecuentes que las estructurales, como se observa en la **Tabla 8**.

**Tabla 8.** Datos clínicos, calidad seminal y aberraciones cromosómicas estructurales (ACN) y numéricas (ACN), mediante FISH multicolor-AM8.

Muestra	Edad de diagnóstico (años)/estadío	Tratamiento/ Dosificación	Tiempo sin exposición (meses)	Densidad espermática. (10 <sup>6</sup> espermatozoides/mL)	ACN (%)	ACE (%)	Total de espermatozoides (n= 35 404)
<b>Controles</b>							
NL – 111	24	--	--	154	0.36	0.26	5 000
NL – 188	25	--	--	148	0.40	0.32	5 136
NL – 207	20	--	--	158	0.48	0.28	5 064
NL – 200	19	--	--	112.52	0.28	0.20	5 063
<b>Media (± DS)</b>	<b>22 (2.9)</b>			<b>143.13 (20.82)</b>	<b>0.38 (0.08)</b>	<b>0.26 (0.05)</b>	<b>5065.8 (55.6)</b>
<b>Esquema ABVD</b>							
NL – 190	22/I A	8 dosis/4 ciclos	16	62.5	<b>0.70 *</b>	<b>0.36 *</b>	5 040
NN – 177	26/IV A	12 dosis/6 ciclos	11	27.0	<b>0.52 *</b>	<b>0.50 *</b>	5 058
NL – 264	21/III A	12 dosis/6 ciclos.	-	106	<b>0.46 *</b>	<b>0.76 *</b>	5 043
<b>Media (± DS)</b>	<b>23 (2.6)</b>	<b>-</b>	<b>13.5 (3.5)</b>	<b>65.2 (39.6)</b>	<b>0.56(0.12) *</b>	<b>0.54(0.2) *</b>	<b>5 047 (9.6)</b>

*Chi<sup>2</sup> - Yates \* p < 0.05 n= 35, 404 espermatozoides.*

Como se muestra en la **Tabla 9 y 10**, se detectó entre los sobrevivientes al tratamiento ABVD una frecuencia significativamente ( $p < 0.05$ ) de ACN ( $0.56 \pm 0.12$ ) y de ACE ( $0.54 \pm 0.2$ ) frente al grupo control ( $0.38 \pm 0.08$  y  $0.26 \pm 0.05$ , respectivamente).

**Tabla 9.** Aberraciones cromosómicas numéricas (ACN) observadas mediante FISH multicolor-AM8.

<i>Muestra</i>	<i>Fenotipos</i>						<i>Células Aberrantes</i>	<i>Células Totales</i>	<i>ACN (%)</i>
	<i>AM0</i>	<i>008</i>	<i>AM88</i>	<i>AAMM8</i>	<i>AAMM88</i>	<i>AAM8</i>			
<b><u>Controles</u></b>									
NL-111	2	5	6	4	0	1	18	5000	0.36
NL-188	0	11	4	2	2	1	20	5136	0.40
NL-200	1	8	4	0	1	0	14	5064	0.28
NL-207	0	6	9	3	5	0	23	5063	0.48
<b>Media (<math>\pm</math> DS)</b>	<b>0.7 (1.2)</b>	<b>7.5 (2.6)</b>	<b>5.8 (2.4)</b>	<b>2.3 (1.7)</b>	<b>2 (2.2)</b>	<b>0.5 (0.6)</b>	<b>18.8 (8.9)</b>	<b>5065.75 (55.6)</b>	<b>0.38 (0.08)</b>
<b><u>Esquema ABVD</u></b>									
NL-190	4	12	5	8	5	1	35	5040	0.70*
NN-177	2	15	2	6	1	0	26	5058	0.52*
NL-264	2	12	4	4	1	0	23	5043	0.46*
<b>Media (<math>\pm</math> DS)</b>	<b>2.7 (1.0)</b>	<b>13.0(1.7)</b>	<b>3.7 (1.5)</b>	<b>6.0 (2.0)</b>	<b>2.3 (2.3)</b>	<b>0.3 (0.6)</b>	<b>28 (6.2)</b>	<b>5047.0 (9.6)</b>	<b>0.56* (0.12)</b>

$\chi^2$ -Yates \* $p < 0.05$   $n= 35\ 404$  espermatozoides CA: Células alteradas CT: Células totales.

En la **Tabla 9** se muestra que para el grupo control, las ACN más frecuentes fueron la disomía del cromosoma 8 ( $5.8 \pm 2.4$ ) y la nulisomía del cromosoma 1 ( $7.5 \pm 2.6$ ); mientras que en el grupo expuesto a ABVD lo fueron la disomía ( $6.0 \pm 2.0$ ) y nulisomía, ambas del cromosoma 1 ( $13.0 \pm 1.7$ ).

**Tabla 10.** Aberraciones cromosómicas estructurales (ACE) observadas mediante FISH Multicolor-AM8.

Muestra	Fenotipos			Células Anormales	Células Totales	ACE (%)
	A08	AMM8	OM8			
<b><u>Controles</u></b>						
NL-111	5	3	4	12	5 000	0.24
NL-188	9	7	0	16	5 136	0.32
NL-200	1	8	1	10	5 064	0.20
NL207	5	8	1	14	5 063	0.28
<b>Media (± DS)</b>	<b>5 (3.3)</b>	<b>6.5 (2.4)</b>	<b>1.5 (1.7)</b>	<b>13 (2.6)</b>	<b>5065.75 (55.6)</b>	<b>0.26 (0.05)</b>
<b><u>Esquema ABVD</u></b>						
NL-190	10	7	1	18	5 040	<b>0.36 *</b>
NN-177	4	15	3	25	5 058	<b>0.50 *</b>
NL-264	13	23	2	38	5 043	<b>0.76 *</b>
<b>Media (± DS)</b>	<b>9 (4.6)</b>	<b>15 (8.0)</b>	<b>2 (1.0)</b>	<b>27 (10.1)</b>	<b>5047.0 (9.6)</b>	<b>0.54 (0.2) *</b>

*Chi<sup>2</sup> - Yates \* p < 0.05 n= 35 404 espermatozoides.*

Por otra parte, la ACE más común, tanto para el grupo control como para el expuesto a ABVD, fue la duplicación de la región 1p36 ( $6.5 \pm 2.4$ ;  $15 \pm 8.0$ , respectivamente), seguida por su delección ( $5 \pm 3.3$ ;  $9 \pm 4.6$ , respectivamente), **Tabla 10**.

Dentro del grupo expuesto, las ACN ( $0.56 \pm 0.12$ ) fueron mayores que las ACE ( $0.54 \pm 0.2$ ), exceptuando bien la muestra NL-264, donde la tendencia se muestra invertida ( $0.46$  y  $0.76$ , respectivamente). Esto podría estar relacionado con el tiempo sin exposición del paciente (no declarado) y la intensidad del tratamiento recibido (12 dosis/6 ciclos); un corto periodo sin exposición a quimioterapéuticos (al menos 6 meses después) está relacionado con una mayor pérdida de la integridad del DNA, este daño reciente habría dado poco tiempo a los mecanismo de reparación del DNA, aunque se ha observado que dicho daño puede persistir hasta por un periodo de 18 a 24 meses (O'Flaherty *et al.*, 2010; Meistrich, 2013). De la misma manera, un mayor daño estructural evidenciaría la mayor proporción de agentes presentes en ABVD que pueden interferir con el proceso de replicación y reparación del DNA (Frías *et al.*, 2019).

Finalmente, la **Tabla 11** resume las frecuencias de aberraciones cromosómicas encontradas en ambos grupos de estudio.

**Tabla 11.** Frecuencia de espermatozoides con aberraciones cromosómicas en ambos grupos de estudio, establecidas mediante FISH multicolor-AM8.

<i>Muestra</i>	<i>ACN</i>					<i>ACE</i>			
	<i>AM0</i>	<i>008</i>	<i>AM88</i>	<i>AAMM8</i>	<i>AAMM88</i>	<i>AAM8</i>	<i>A08</i>	<i>AMMO</i>	<i>0M8</i>
<b><u>Controles</u></b>									
Espermatozoides $\bar{x}$ ( $\pm$ DS).	0.75 (1.2)	7.5 (2.6)	5.75 (2.4)	2.25 (1.7)	2 (2.2)	0.5 (0.6)	5 (3.3)	6.5 (2.4)	1.5 (1.7)
Frecuencia (%) <sup>B</sup>	0.02	0.15	0.12	0.05	0.04	0.01	0.1	0.13	0.03
<b><u>Esquema ABVD</u></b>									
Espermatozoides $\bar{x}$ ( $\pm$ DS).	2.7 (1.2)	13.0 (1.7)	3.7 (1.5)	6.0 (2.0)	2.3 (2.3)	0.3 (0.6)	9 (4.6)	15 (8.0)	2 (1.0)
Frecuencia (%) <sup>B</sup>	0.05	0.26	0.07	0.12	0.05	0.01	0.18	0.3	0.04

*ACN* Alteraciones cromosómicas numéricas.

*ACE* Alteraciones cromosómicas estructurales.

<sup>B</sup> 5000 espermatozoides.

## 7. DISCUSIÓN

Parámetros seminales.

El mejoramiento de los tratamientos contra el cáncer ha aumentado la sobrevivencia de los pacientes jóvenes en edad reproductiva. De manera particular en el LH, la tasa de sobrevivencia es superior al 90%.

Actualmente, algunos de los principales esfuerzos al tratar esta enfermedad se dirigen al mantenimiento de la calidad de vida en los sobrevivientes (Vakalopoulos *et al.*, 2015; Paoli *et al.*, 2016; Okada y Fujisawa, 2019), por lo que, la preservación de la fertilidad tras la exposición a quimioterapéuticos es de un importante interés. En el caso de los varones jóvenes, durante este periodo de exposición experimentan una drástica reducción en la producción de espermatozoides o inclusive azoospermia, ya sea temporal o permanente, de acuerdo al tratamiento empleado (Kasper *et al.*, 2012; Meistrich, 2013).

En este marco, nuestros resultados señalan que después del tratamiento con ABVD, los pacientes con linfoma de Hodgkin recobran valores aceptables en los parámetros seminales asociados a citotoxicidad: concentración espermática y viabilidad (OMS 2010). Esto habla de una recuperación en la producción de espermatozoides, y por lo tanto, una recuperación de la línea germinal, la cual depende tras cualquier tratamiento de la cantidad sobreviviente de células madre espermátogoniales y la conservación de su capacidad de diferenciación (Meistrich, 2013). Lo reportado hasta ahora confirma que estas cualidades son menos afectadas por ABVD cuando se le compara con

otros regímenes quimioterapéuticos, y esto ha tenido su explicación más recurrente en la ausencia de ciertos agentes alquilantes en dicho esquema, como procarbacina o cisplatino (Gobbi *et al.*, 2013; Okada y Fujisawa, 2019). Estos últimos han sido relacionados históricamente con azoospermia permanente al emplearse sobre pacientes con LH, hasta en el 80-90% de los casos. Aunque en pacientes tratados con ABVD la esterilidad también está presente, es mucho menos frecuente, además, aún no son claros los motivos por los que algunos individuos son más susceptibles que otros (Viviani *et al.*, 1985; Gobbi *et al.*, 2013).

Dado lo anterior, en este estudio se encontró que si bien ambos grupos muestran adecuados parámetros de calidad seminal (OMS 2010), el grupo expuesto a ABVD posee una densidad espermática dos veces más baja ( $65.2 \pm 39.6$ ) ( $p < 0.05$ ), que el grupo control ( $143.13 \pm 20.8$ ).

**Tabla 7.** Tendencia similar ha sido descrita por Paoli y colaboradores en 2016, quienes reportaron decaimiento de la concentración espermática en los pacientes expuestos al esquema ABVD, a los 6 y 12 meses terminado el tratamiento. En cualquier caso, los investigadores declaran que las medias de los pacientes eran también normales de acuerdo con OMS 2010.

Meistrich (2013) propone que este lento restablecimiento de la cuenta espermática podría deberse a que las espermatogonias tipo A no inician la diferenciación hasta que la población está completamente regenerada. Dicha detención podría ocurrir en diferentes etapas de la espermatogénesis, lo que resultaría en una producción de espermatozoides variable. Una demora generalizada provocaría azoospermia (Templado *et al.*, 2013).

Se ha pensado incluso que la enfermedad LH, por sí misma, podría interferir con la espermatogénesis, lo que establecería pobres valores seminales iniciales, que se acentuarían tras el tratamiento con ABVD. Dicho daño sería propiciado por la sintomatología experimentada por los pacientes, tales como la pérdida de peso o los episodios de fiebre; largos periodos de fiebre han estado relacionados con oligospermia e incluso astenozoospermia (Dohle, 2010; Vakalopoulos *et al.*, 2015). Durante la enfermedad LH, la apoptosis de las células tumorales y normales puede producir cantidades importantes de metabolitos espermatotóxicos, lo que a su vez generaría una respuesta autoinmune mediada por anticuerpos antiespermatozoides (Vakalopoulos *et al.*, 2015). De igual manera, se ha planteado que las alteraciones nutricionales, por las que atraviesan estos pacientes, pueden tener un

efecto negativo en la calidad seminal al interferir con el consumo adecuado de vitaminas, las cuales juegan un papel clave en el mantenimiento de la capacidad reproductiva (Meistrich, 2013).

La baja calidad seminal en los pacientes con LH que aún no han sido tratados, también se ha intentado relacionar con estadios más avanzados de la enfermedad (Tal *et al.*, 2000; O'Flaherty *et al.*, 2010). Sin embargo, autores como Viviani y colaboradores (1991) no encontraron relación entre mala calidad seminal y estadio de la enfermedad o síntomas sistémicos del pretratamiento. En el mismo sentido, Paoli y colaboradores (2016) afirman que en 202 pacientes con LH, el 75 % de ellos fueron normozoospermicos previamente al tratamiento, y que tras la exposición los parámetros seminales son principalmente afectados por el tipo de tratamiento y el número de ciclos, no por los síntomas experimentados.

Aunque la literatura llega a ser contradictoria respecto a la pobre calidad seminal en pacientes con LH de manera previa al tratamiento, esto sólo parece estar relacionado con los estadios no localizados o más avanzados del LH, mientras que en el post-tratamiento, únicamente parecen estar afectadas por el tipo de tratamiento y el número de ciclos

(Tal *et al.*, 2000; Bahadur *et al.* 2005; Dohle, 2010; Paoli *et al.*, 2016; Amin *et al.*, 2021).

Por otra parte, la acción sinérgica de los quimioterapéuticos que componen el esquema ABVD también puede jugar un papel importante al explicar un detrimento de la concentración espermática, y en general, de los parámetros seminales (Meistrich, 2013; Okada y Fujisawa, 2019). Por ejemplo, al comparar diferentes tipos de regímenes quimioterapéuticos se ha observado que el fármaco adriamicina puede llegar a producir toxicidad adicional en los esquemas (Meistrich, 2013).

En el mismo sentido, se ha visto que la interacción entre adriamicina y algunos aneugénicos puede tener efectos diferentes de acuerdo al tipo de célula involucrada (Ramos *et al.*, 2019), por lo tanto, el daño sobre los diferentes tipos de células que componen el tejido germinal también podría ser distinto; así se podría afectar la espermatogénesis, a través de las células de Leydig o Sertoli, actores fundamentales de este proceso, **Figura 10**.

Por otra parte, aunque la vinblastina es capaz de detener la espermatogénesis y provocar apoptosis, no se le ha vinculado con una azoospermia prolongada (Zakariya *et al.*, 2017; Okada y Fujisawa,

2019). Sin embargo, Meistrich (2013), asegura que al combinarse con algunos agentes alquilantes o antraciclinas (como la adriamicina) la vinblastina podría tener efectos adicionales.

Para la dacarbacina los mecanismos de acción tampoco han sido completamente descritos (Murray, 2014), aún menos algunas de sus interacciones, lo que puede restar explicaciones precisas en torno a su empleo y efectos de tratamiento (Vellemans y André, 2021). Así mismo, la dacarbacina como agente alquilante contra el cáncer es considerado tóxico para las gónadas, en particular en la espermatogénesis (Dohle, 2010; Vakalopoulos *et al.*, 2015; Okada y Fujisawa, 2019). En ratones, se ha demostrado que por sí misma es capaz de reducir la cuenta espermática, e inducir daño genotóxico, así como disminuir los niveles de testosterona intratesticular (Kumar *et al.*, 2006).

No obstante, la evidencia apoya la baja reprotoxicidad de la dacarbacina al actuar conjuntamente en el esquema ABVD, encontrando únicamente disminución temporal de la concentración espermática y restablecimiento de la cuenta en 6, 12 o 18 meses tras de la exposición, algo compartido también por nuestros resultados (Tal *et al.*, 2000; Bahadur *et al.* 2005; Paoli *et al.*, 2016; Okada y Fujisawa, 2019; Amin *et al.*, 2021; Vellemans y André, 2021).

Respecto al volumen seminal en los pacientes sobrevivientes a ABVD, aunque existe evidencia de que las células de Leydig son resistentes al daño inducido por radioterapia (Okada y Fujisawa, 2019), tras la exposición a quimioterapéuticos estas células pueden sufrir una notable disfunción que depende de la dosis administrada (Vakalopoulos *et al.*, 2015). Un daño sobre estas células productoras de andrógenos podría empobrecer las secreciones que acompañan al semen humano al interferir con glándulas como la vesícula seminal o la glándula prostática, cuya actividad depende estrictamente de andrógenos.

Además, el daño sobre las células de Leydig podría permanecer mucho más tiempo debido a su menor tasa de división (Vázquez y Vázquez, 2007; Vakalopoulos *et al.*, 2015; Okada y Fujisawa, 2019). También se ha observado que compuestos como la bleomicina en combinación con algunos agentes alquilantes, pueden reducir significativamente los niveles de testosterona (Vakalopoulos *et al.*, 2015; Zirkin y Papadopoulos, 2018).

De la misma manera, el pH seminal depende de estas secreciones, aunque esto no se vería relacionado con una baja concentración espermática, ya que, el espermatozoide tolera con mayor facilidad la alcalinización que la acidificación (Vázquez y Vázquez, 2007). En este estudio, no obstante la aparente diferencia tanto en pH como en volumen entre el grupo control y expuesto no fue significativa ( $p < 0.05$ ).

En general, múltiples factores intervienen en las causas de una mala calidad seminal en los pacientes con LH,

Sin embargo, el tratamiento con ABVD está mayormente relacionado con una baja citotoxicidad y la recuperación de la producción de espermatozoides, como lo apoyan nuestros resultados y el estudio previo realizado por Roldán y López, 2017.

De manera futura, profundizar en la actividad sinérgica de los compuestos que componen ABVD podría facilitar el planteamiento de nuevos esquemas, a fin de que, los pacientes tratados con este protocolo logren alcanzar valores seminales estándares, como los mostrados por los donantes no expuestos. También en la literatura son notables los llamados por establecer adecuadamente la correcta evaluación reproductiva de los pacientes de manera previa a recibir el

tratamiento ABVD, aparentemente algo poco recurrente en diferentes países.

### ***Aberraciones Cromosómicas.***

De acuerdo con Frías y colaboradores (2019), los esquemas quimioterapéuticos pueden afectar las frecuencias tanto de ACE como ACN, en lo que definen como aumento de la **inestabilidad cromosómica** (CIN): un fenómeno que también es causado por otros elementos extrínsecos como la exposición a radiación, infecciones virales y algunos procesos fisiológicos como la inflamación. Además, explican que algunos de estos mecanismos tendrían la capacidad de generar un daño al DNA heredable, produciendo variaciones cromosómicas que facilitarían la adaptación y evolución del cáncer. Para el espermatozoide, estos esquemas quimioterapéuticos que incluyen agentes aneugénicos y clastógenos pueden originar daño genético importante, daño capaz de aumentar el riesgo de resultados reproductivos anómalos (Tal *et al.*, 2000; Wyrobek *et al.*, 2005; Amin *et al.*, 2021).

Para mostrar dicho daño entre los pacientes con LH que han recibido ABVD, este estudio empleó el ensayo FISH-AM8, el cual permite observar simultáneamente anormalidades cromosómicas numéricas y estructurales en el espermatozoide. Nuestros resultados encuentran que en promedio 13.5 meses después de la exposición a este esquema, la frecuencia de ACN y ACE en los espermatozoides es significativamente alta ( $p < 0.05$ ) entre los pacientes sobrevivientes. Se ha estimado que el tiempo necesario para retornar a los valores normales podría tomar entre 12 a 24 meses en pacientes tratados con ABVD, mientras que, para otros esquemas llega a tomar más de 2 años (Wyrobek *et al.*, 2000; Bujan *et al.*, 2014; Martínez *et al.*, 2016; Vellemans y André, 2021).

Otros trabajos que emplearon el protocolo ABVD en pacientes con LH han reportado un efecto similar para los demás autosomas y cromosomas sexuales (Tempest *et al.*, 2008), donde también se observó un incremento de las aneuploidías (disomías y nulisomías) seis meses después de recibir tratamiento. De igual forma, en 2016, Martínez y colaboradores, reportaron que puede encontrarse un aumento de las aneuploidías para los cromosomas 18, X y Y apenas 3 meses después, cuando ABVD es combinado con radioterapia, este

estudio además reportó alteraciones de volumen y pH, en las muestras seminales de los pacientes expuestos.

Los trabajos con FISH sobre aneuploidías en espermatozoides humanos varían ampliamente según en número de sondas empleadas en el ensayo, así como, las regiones cromosómicas que se desean identificar. Las estimaciones sobre la incidencia de las aneuploidías espermáticas entre la población se encontraría en el rango del 1% al 3%, no obstante, actualmente existe discusión sobre las implicaciones que tendrían estas cifras en el número de nacimientos con anomalías o abortos espontáneos (Wyrobek *et al.*, 2000; Templado *et al.*, 2011; Nagaoka *et al.*, 2012).

Algunos estudios (Van Hummelen *et al.*, 1996; Frías *et al.*, 2020) reportan que, en personas sanas, la frecuencia de disomías del cromosoma 1 es de 1.7 ( $\pm 2.2$ ) y de 1.9 ( $\pm 2.2$ ) para el cromosoma 8 por cada  $10^4$  espermatozoides. En contraste con la literatura, en nuestro estudio las disomías de los cromosomas 1 y 8 del grupo control mostraron respectivamente mayores frecuencias: 2.5 ( $\pm 1.7$ ) y 5.7 ( $\pm 2.4$ ) espermatozoides por cada 5000 evaluados, es decir, el 0.05 y 0.12 %, mientras que en el grupo expuesto a ABVD, la disomía del

cromosoma 1 fue de 6.0 ( $\pm 2.0$ ) y para el cromosoma 8 de 3.7 ( $\pm 1.5$ ), es decir, 0.12 y 0.07 %, respectivamente, **Tabla 11**.

Cabe mencionar que el cromosoma 8, históricamente ha sido relacionado a frecuencias bajas,  $\sim 0.03$  % por cada  $10^4$  (Van Van Hummelen *et al.*, 1996; Downie *et al.*, 1997; Templado *et al.* 2005). Sin embargo, revisiones más recientes reportan frecuencias más elevadas, esto al observar las aneuploidías espermáticas en dos grupos diferentes: individuos normozoospermicos y normozoospermicos con fertilidad probada, donde se encontró que los participantes podían presentar disomías del cromosoma 8 en una frecuencia del 0.17% al 0.23% (Gambera *et al.* 2011; Piomboni *et al.* 2014).

En una extensa revisión de diversos estudios sobre las aneuploidías espermáticas en 18 cromosomas diferentes, Templado y colaboradores (2005, 2011 y 2013) señalan que, para hombres sanos, la frecuencia de disomías del cromosoma 1 se encontraría entre 0.07-0.11%, y para el cromosoma 8 en 0.02-0.14%, por cada  $10^4$  espermatozoides, valores también próximos a los resultados encontrados.

Respecto a las nulisomías, nuestro estudio encontró que el grupo control presentó una frecuencia de 0.15 % para el cromosoma 1,

mientras que para el cromosoma 8 fue de 0.02 %, ambos en 5000 espermatozoides. En el tratamiento con ABVD, nuestros pacientes con LH presentaron una mayor frecuencia de nulisomías con respecto al grupo control; para el cromosoma 1: 0.26% y para el cromosoma 8: 0.05%, en 5000 espermatozoides. La frecuencia del cromosoma 1 fue distinta respecto a lo reportado por Van Hummelen y colaboradores (1996), 0.004 % y Slotter y colaboradores (2000), 0.012 %, en  $10^4$  espermatozoides.

Podría sugerirse que altas frecuencias de nulisomías pueden atribuirse a una ineficiente hibridación, no obstante, para evitar esto, las laminillas deben presentar una hibridación superior al 95 % para ser evaluadas, también, al determinar una nulisomía, los espermatozoides circundantes deben presentar la señal ausente, demostrando que no es una región sin hibridación (Marchetti *et al.*, 2008). En este sentido, si en el espermatozoide una de las tres sondas emite una señal adecuada (p. ej. Cromosoma 8), la ausencia de las otras señales puede ser considerada como evidencia de nulisomía (Gambera *et al.*, 2011).

En relación a las ACE, nuestro estudio reporta que en el grupo control la frecuencia deleciones y duplicaciones de la región 1p36 es de  $5 (\pm 3.3)$  y  $6.5 (\pm 2.4)$  espermatozoides por cada 5000, respectivamente. Por

otra parte, en los sobrevivientes a ABVD, dichas aberraciones muestran un aumento significativo ( $p < 0.05$ ): 9 ( $\pm 5.3$ ) en deleciones y 15 ( $\pm 8.3$ ) en duplicaciones. Slotter y colaboradores (2000) reconocen frecuencias basales: entre 4.5 ( $\pm 0.5$ ) para las duplicaciones y 4.1 ( $\pm 1.3$ ) para las deleciones, ambas en  $\sim 10^4$  espermatozoides. Aunque otros trabajos (Van Hummelen *et al.*, 1996; Frías *et al.*, 2020) registran valores aún más bajos en hombres sanos: 3.2 ( $\pm 1.9$ ) en duplicaciones y 2.9 ( $\pm 3.6$ ) para deleciones. En contraste, a pesar de las diferencias entre frecuencias, nuestros valores promedio conservan la tendencia mostrada por estos autores: las duplicaciones de la región 1p36 son más frecuentes que las deleciones de la misma región. Aunque la muestra expuesta NL-190, mostró más deleciones que duplicaciones, también fue la que menos ACE presentó. La heterogeneidad entre donadores ha sido ampliamente discutida en este tipo de investigaciones, bajo la principal recomendación de estudiar un elevado número tanto de espermatozoides como individuos a fin de disminuir la posibilidad de un caso atípico severo entre las anomalías evaluadas. Esto podría contarse como una de las principales limitaciones de nuestro trabajo, además de la falta de valores seminales previos al tratamiento con ABVD, que nos permitirían observar la

evolución de los parámetros en el tiempo. Una limitación técnica de FISH-AM8 es que no permite observar regiones cromosómicas invertidas o translocadas (con cambios en la ubicación) y dado que la totalidad del material de ADN está presente, las reorganizaciones cromosómicas equilibradas pueden pasar desapercibidas (Genetic Alliance, 2009).

En general, a través de los diferentes estudios que se han realizado sobre aneuploidías en espermatozoides existe gran variabilidad en las frecuencias estimadas, las cuales pueden moverse en un rango que va del 0.01 al 0.38 % (Downie *et al.*, 1997; Templado *et al.*, 2005). Además, son relativamente pocos los artículos que contrastan sus resultados con otras investigaciones. Según Templado y colaboradores (2005), las diferencias entre las sondas empleadas, puede ser una de las razones por las que la discusión de las frecuencias entre estudios encuentra poca regularidad.

## 8. CONCLUSIONES

Los resultados de calidad seminal obtenidos por esta investigación muestran que no existe efecto citotóxico en los sobrevivientes al LH expuestos al esquema quimioterapéutico con ABVD.

La recuperación de la cuenta espermática refleja la conservación del potencial de diferenciación y proliferación de la línea celular germinal tras un promedio de 13.5 ( $\pm$  3.5) meses de exposición a ABVD

Los parámetros de viabilidad y morfología entre los pacientes sobrevivientes al linfoma de Hodgkin fueron aceptables dentro de los parámetros OMS 2010, aunque no así para OMS 1999.

El volumen seminal de los pacientes expuestos a quimioterapéuticos fue más bajo que en el grupo control, sin embargo, dicha diferencia no fue significativa; al igual que los valores de morfología y viabilidad.

Por medio del ensayo FISH-multicolor AM8 se encontró que las ACN fueron más frecuentes que las ACE, aunque ambas fueron significativamente mayores a las encontradas en el grupo control, estableciendo así que el régimen ABVD puede provocar daño genotóxico que puede persistir hasta 13.5 meses después de la exposición.

En varones sobrevivientes a quimioterapéuticos, el análisis de las aberraciones cromosómicas espermáticas cobra una importancia fundamental. Sobre todo para la comprensión de los efectos que estas pueden tener sobre la reproducción humana: aumento de riesgo de la pérdida del embarazo o incremento del riesgo de transmitir una enfermedad de carácter genético en la descendencia.

## 9. Perspectivas

- Un estudio sobre la actividad hormonal LH o FSH en los pacientes con LH podría complementar la información arrojada por las espermátobioscopías. Además, podría aportar en la discusión sobre el origen y desarrollo de la inestabilidad cromosómica provocada por ABVD.
- En un futuro, aumentar el número de muestras, y por lo tanto el número de células espermáticas evaluadas, podría afinar la precisión en la estimación de las frecuencias de aberraciones cromosómicas observadas en los pacientes expuestos a ABVD con LH.

## 10. Referencias

- Al-Badr A. A. y Alodhaib M. M. (2016) Capítulo 4: Dacabazine. Profiles of drug substances, excipients and related methodology. 41, 323-357. <https://doi.org/10.1016/bs.podrm.2015.12.002>
- Alfonso G., Ardaiz M., Basquiera A., Castro R. M., De Dios S. M., Dragosky M., Enrico A., Fishman L., Flores G., Garate G., González M., Lucheta P., Márquez M., Narbaitz M., Negri F., Otero V., Palmer L., Pavlovsky A., Pavlovsky M., Picon A., Riveros D., Shanley C., Stemmelin G., Tartas N., Vijnovich A., Zerga M. y Zoppegna L. (2017) Guías de diagnóstico y tratamiento. *Sociedad Argentina de hematología*. 447-564. <http://sah.org.ar/docs/2017/000-Presentaci%C3%B3n.pdf>
- Alonso C.C. (2007). Bases cromosómicas de las alteraciones genéticas humanas. *Química Clínica*. 26 (4), 224-228.
- Amin M. S. A., Brunckhorst O., Scott C., Wrench D., Gleeson M., Kazmi M. y Ahmed K. (2021) ABVD and BEACOPP regimens' effects on fertility in young males with Hodgkin lymphoma. *Clinical and Translational Oncology*. 23(6), 1067-1077. <http://doi:10.1007/s12094-020-02483-8>.
- Ansell S. M. (2016) Hodgkin Lymphoma: 2016 update on diagnosis, risk stratification and management. *American Journal of Hematology*. 91, 434-442. <https://doi.org/10.1002/ajh.24272>
- Arcamone F. (1984) Adriamycin and its Analogs. *Tumori*. 70, 93-122. <https://doi.org/10.1177/030089168407000201>

- Armas G. L., Gómez V. L., Garcia D.A.D., Cortes V.A.C., Leal S.K., Salas G. R, (2016) Análisis retrospectivo de anomalías cromosómicas de tipo numéricas en pacientes del hospital regional de alta especialidad del niño “Dr. rodolfo nieto padrón” 2005-2015. *Revista de Salud Pública y Nutrición*. 15 (4), 1-8.
- Bagchi A., Mills A.A. (2008) The quest for the 1p36 tumor suppressor. *Cancer Research*. 68 (8), 2551-2556 <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2095>
- Bahadur G., Ozturk O., Muneer A., Wafa R., Ashraf A., Jaman N., Patel S., Oyede A.W., Ralph D. J. (2005) Semen quality before and after gonadotoxic treatment. *Human Reproduction*. 20, 774-781. doi: 10.1093/humrep/deh671.
- Bard D., Barouki R., Benhamou S., Bénichou J., Clavel J., Jouglu E., y Launoy G. (2005). Cancer: approche méthodologique du lien avec l'environnement. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. 92. <https://hal-lara.archives-ouvertes.fr/hal-01571691/document>
- Bellas M. C. (2004) Linfoma de Hodgkin. *Revista Española de Patología*. 37 (2), 129-138.
- Bello S. y Rodriguez-Moreno A. (2016) Una revisión actualizada del síndrome de deleción (monosomía) 1p36. *Revista Chilena de Pediatría*. 87 (5), 411-421. <https://0.1016/j.rchipe.2015.12.004>
- Besson H., Brennan P., Becker N., De Sanjosé S., Nieters A., Font R., Maynadié M., Foretova L., Cocco P. L, Staines A., Vornanen M., Boffetta P. (2006). Tobacco smoking, alcohol drinking and Hodgkin's lymphoma: a European multi-centre case-control study

(EPILYMPH). *British Journal of Cancer*. 95 (3), 378-384.  
<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603229>.

- Bièche I. (2004) Biologie Moléculaire des cancers, *Immuno-analyse y biologie spécialisée*. 19, 13–22.  
<https://doi.org/10.1016/j.immbio.2003.11.002>
- Blue R. N., Page J.M. y Silver M.R. (2019) Genetic abnormalities and pregnancy loss. *Seminars in Perinatology*. 43, 66-73  
<https://doi.org/10.1053/j.semperi.2018.12.002>
- Böll B., Plütschow A., Bürkle C., Atta J., Pfreundschuh M., Feuring-Buske M., Vogelhuber M., Sökler M., Eichenauer D. A., Thielen I, von Tresckow B., Fuchs M., Engert A., Borchmann P. (2018) Doxorubicin, vinblastine, dacarbazine and lenalidomide for older Hodgkin lymphoma patients: final results of a German Hodgkin Study Group (GHSG) phase-I trial. *British Journal of Haematology*. 185 (1), 42-52. <https://doi.org/10.1111/bjh.15741>
- Bujan L. y De Mas P. (2002) Génotoxicité des chimiothérapies et radiothérapies: Quelles sont les conséquences pour le spermatozoïde humain? *Andrologie*. 12 (3), 284-294.
- Bujan L., Walschaerts M., Brugnol F., Daudin M., Berthaut I., Auger J., Saias J., Szerman E., Moinard N., Rives N. y Hennebicq S. (2014) Impact of lymphoma treatments on spermatogenesis and sperm deoxyribonucleic acid: a multicenter prospective study from the CECOS network. *Fertility and Sterility*. 102 (3), 667-674.  
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.06.008>
- Caballero B. D. (2016) Tratamiento del linfoma de Hodgkin. *Hematología*. 20 (1), 118-123.

- Cabrera B. S. (2006) Bleomicina: un modelo de fibrosis pulmonar. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*. 19 (1), 53-61.
- Campo E., Swerdlow S.H., Harris N.L., Pileri S., Stein H. y Jaffe E. S. (2011) The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 117, 5019-5032.
- Contreras C.N. y Mancillas A.L. (2004) Enfermedades con asociación genética. *Médica Sur*. 11 (1), 4-12. <https://www.medigraphic.com/pdfs/medsur/ms-2004/ms041b.pdf>
- Covarrubias-Espinoza G., Luna-Córdova J. A., Rendón-García H, Gómez A. M., Morales-Peralta A, Larios-Farak T. & Ríos-García C.G. (2016) Linfoma de Hodgkin. Factores Pronósticos Asociados a la Respuesta del Tratamiento. *Biología Clínica Hospital Infantil Estado de Sonora*. 33, 9-13.
- Curtis H., Barnes S., Schnek A. y Massarini A. (2008) Biología. (7ma Ed.) Panamericana, Madrid, España. 309-313.
- De la Torre S. M. E. y Herrera M. M. (2018) Mecanismos relacionados con el origen de las aneuploidias humanas en la avanzada edad materna. *Medicent Electron*. 22 (4), 359-363.
- De Toledo J.S. y Sábado A.C. (2016) Linfomas de Hodgkin y No Hodgkin. *Pedriatría Integral*. 20, 390-400.
- Diebold J. y Nicolas J. C. (2001) Virus Epstein-Barr et pathologies associées. *Dossier Scientifique*. 337. 23-24.

- Dimassi S., Tilla M., & Sanlaville, D. (2017). Anomalies chromosomiques. *Journal de Pédiatrie et de Puériculture*, 30 (6), 249–270. doi:10.1016/j.jpp.2017.09.007
- Dohle G. R. (2010) Male infertility in cancer patients: Review of the literature. *International Journal of Urology*. 17 (4), 327-331. [https://doi: 10.1111/j.1442-2042.2010.02484.x](https://doi.org/10.1111/j.1442-2042.2010.02484.x)
- Downie S. E., Flaherty S. P. y Matthews C. D. (1997) Detection of chromosomes and estimation of aneuploidy in human spermatozoa using fluorescence in-situ hybridization. *Molecular Human Reproduction*. 3 (7), 585-98. [https://doi: 10.1093/molehr/3.7.585](https://doi.org/10.1093/molehr/3.7.585)
- Egozcue V. S. y Vidal D. F. (2008) Anomalías meióticas: Implicaciones en la esterilidad masculina. *Revista Internacional de Andrología*. 6 (1), 48-51. [https://doi.org/10.1016/S1698-031X\(08\)72567-6](https://doi.org/10.1016/S1698-031X(08)72567-6)
- Engert A. y Horning S. J. (2011) Hodgkin Lymphoma. A comprehensive update on diagnostics and clinics. *Hematologic Malignances Springer*. 9, 381.
- Engert A. y Younes A. (2020) Hodgkin Lymphoma: a comprehensive overview. (3ra Ed.) *Springer*. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-32482-7>
- Esau D. (2017) Viral Causes of Lymphoma: The History of Epstein-Barr Virus and Human T-Lymphotropic Virus 1. *Virology: Research and Treatment*. 8, 1-5. <https://doi.org/10.1177/1178122X17731772>

- Fossa S. D. y Magelssen H. (2004) Fertility and reproduction after chemotherapy of adult cancer patients: malignant lymphoma and testicular cancer. *Annals of Oncology*. 15 (4), 259-265. <https://doi:10.1093/annonc/mdh936>
- Frias S., Ramos S., Salas C., Molina B., Sánchez S., Rivera-Luna R. (2019) Nonclonal chromosome aberrations and genome chaos in somatic and germ cells from patients and survivors of Hodgkin Lymphoma. *Genes (Basel)*. 10 (1), 37. <https://doi:10.3390/genes10010037>
- Frias S., Van Hummelen P., Meistrich M. L., Wyrobek A. J. (2020) Meiotic susceptibility for induction of sperm with chromosomal aberrations in patients receiving combination chemotherapy for Hodgkin lymphoma. *PloS One*. 15, 1-19 <https://doi:10.1371/journal.pone.0242218>
- Gambera L., Morgante G., Serafini F., Stendardi A., Orvieto R., De Leo V., Petraglia F. y Piomboni P. (2011) Human sperm aneuploidy: FISH analysis in fertile and infertile men. *Expert Review of Obstetrics and Gynecology*. 6 (6), 609–627. <https://doi:0.1586/EOG.11.57>
- García P. A. (2018) Búsqueda de daño en la estructura de la cromatina en espermatozoides de sobrevivientes a linfoma de Hodgkin que fueron tratados con ABVD y MOPP. Tesis de posgrado en ciencias biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México. 19.
- Genetic Alliance; The New York-Mid-Atlantic Consortium for Genetic and Newborn Screening Services. (2009) Cómo entender la genética: Una guía para pacientes y profesionales médicos en

la región de Nueva York y el Atlántico Medio. Washington (DC):  
Anexo F, Anomalías cromosómicas.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK132208/>

- Gerson R. (2000). Fertilidad y cáncer. *Revista Médica del Hospital General de México*, 63 (1), 30-40.
- Gigant, B., Wang, C., Ravelli, R., Roussi F., Steinmetz M. O., Curmi P. A., Sobel A. y Knossow M. (2005) Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine. *Nature* 435, 519–522  
<https://doi.org/10.1038/nature03566>
- Gimeno M. I. M. (2014) Morfología espermática y parámetros seminales básicos en varones normo y oligoastenoteratozoospermicos. Tesis de grado. Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Gobbi P. G., Ferreri A.J.M., Ponzoni M., y Levis A. (2013) Hodgkin lymphoma. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 85 (2), 216–237.
- Goldin R. L., Pfeiffer M. R., Gridley G., Gail M. H., Li X., Møller L., Olsen J. H., Hemminki K. y Linet M. S. (2004) Familial aggregation of Hodgkin lymphoma and related tumors. *Cancer*, 100, 1902-1908. <https://doi.org/10.1002/cncr.20189>
- Granillo V. M.P., Valdivia U. B.A. y Villarreal D. M.S. (2014) Biología general: los sistemas vivos. México, Ed. Patria, 220-222.
- Gregory, S., Barlow, K., McLay, Kaul. R., Swarbrick K., Dunham A., Scott C. E., Howe K. L., Woodfine K., Spencer C. C. A., Jones M. C., Gillson C., Searle S., Zhou Y., Kokocinski F., McDonald L., Evans R., Phillips K., Atkinson A., Cooper R. y Bentley D. R.,

(2006) The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1. *Nature* 441. 315–321.  
<https://doi.org/10.1038/nature04727>

- Hassanpour S.H. y Dehghani M. (2017) Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of Cancer Research and Practice*. 4, 127 – 129.
- Hundall D. y Küppers R. (2018) Precision Molecular Pathology of Hodgkin Lymphoma. *Springer*. 236. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-68094-1>
- IARC, International Agency for Research on Cancer (2012) Biological Agents; a review of human carcinogens. [Monografía] 100. <https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/06/mono100B.pdf>
- IARC, International Agency for Research on Cancer. (2020) Hodgking Lymphoma [Infografía]. *Global Cancer Observatory*. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/33-Hodgkin-lymphoma-fact-sheet.pdf>
- IARC, IARC. (2021) México [Infografía]. *Global Cancer Observatory*. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf>
- Imran A., Qamar H.Y., Ali Q., Naeem H., Riaz Mariam, Amin S., Kanwal N., Ali F., Sabar M. F. y Nasir I. A. (2017) Role of Molecular Biology in Cancer Treatment: A Review Article. *Iranian Journal of Public Health*. 46 (11), 1475–1485.
- INC, Institut National du Cancer. (2013). Guide du parcours de soins Tumeur maligne, affection maligne du tissu lymphatique ou

hématopoïétique; Lymphome de Hodgkin classique de l'adulte.  
[https://www.has-sante.fr/jcms/c\\_1652304/fr/guide-du-parcours-de-soins-du-lymphome-de-hodgkin-classique-de-l-adulte](https://www.has-sante.fr/jcms/c_1652304/fr/guide-du-parcours-de-soins-du-lymphome-de-hodgkin-classique-de-l-adulte)

- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2018), Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Comunicado de prensa. 61, 13.
- Instituto Nacional del Cáncer (2008) Manual de enfermería Oncológica, Ministerio de Salud, Argentina, 72.
- Ioannou D. y Tempest H., (2015). Meiotic nondisjunction: insights into the origin and significance of aneuploidy in human spermatozoa. R. Bronson (ed.). The male role in pregnancy loss and embryo implantation failure. *Advances in experimental medicine and biology*. 1, 22. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-18881-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-18881-2_1)
- Jarrett R.F. (2015) The Role of Viruses in the Genesis of Hodgkin Lymphoma. Hodgkin Lymphoma. *Hematologic Malignancies. Springer*. 21-32. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-12505-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-12505-3_2)
- Kasper D., Fauci A., Hauser S., Longo D., Jameson J.L., & Loscalzo J. (2012) Principios de medicina interna (18° Ed.) Mc Graw Hill México D.F. 3018-3019.
- Khodamoradi F., Pakzad R., Ghoncheh M., Sadeghi H., G., Salehiniya H. (2018) Epidemiology, incidence and mortality of hodgkin's cancer in the world and its relation with development. *World Cancer Research Journal*, 5 (2), 1085. <https://www.wcrj.net/wp-content/uploads/sites/5/2018/06/e-1085->

Epidemiology-incidence-and-mortality-of-Hodgkin%E2%80%99s-cancer-in-the-world-and-its-relation-with-development.pdf

- Kou. F, Wu L., Ren, X., Yang L. (2020) Chromosome abnormalities: new insights in their clinical significance in cancer. *Molecular Therapy*. 17, 562-570.
- Kumar S. G., Narayana K., Bairy K. L., D'Souza U. J., Samuel V. P. y Gopalakrishna K. (2006) Dacarbazine induces genotoxic and cytotoxic germ cell damage with concomitant decrease in testosterone and increase in lactate dehydrogenase concentration in the testis. *Mutation Research*. 607 (2), 240-252. <https://doi:10.1016/j.mrgentox.2006.04.019>.
- Küppers R, Hansmann ML. (2005) The Hodgkin and Reed/Sternberg cell. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 37 (3), 511-517.
- Lara-Torres C. y Ortiz-Hidalgo (2009) Diagnóstico patológico e inmunohistoquímico del linfoma de Hodgkin y su diagnóstico diferencial. *Patología*, 47 (1), 35-45.
- Liu D y Liu M. (2013) Clinical value of sperm DNA damage should be assessed in motile sperm fraction rather than whole ejaculated sperm. *Fertility and Sterility*. 99 (2), 367-71.
- Málaga C. Y, Ortiz N. D., Hernández M. I., Tovar J.M. y Ayala R. A. (2005) Detención de la espermatogénesis. *Ginecología y Obstetricia de México*. 73, 500-508.
- Mandrioli D., Belpoggi F., Silbergeld E. K. y Perry M. J. (2016) Aneuploidy: a common and early evidence-based biomarker for

carcinogens and reproductive toxicants. *Environmental Health*. 15, 97. <https://doi:10.1186/s12940-016-0180-6>.

- Marchetti F., Cabrerros D., Wyrobek A. J. (2008) Laboratory methods for the detection of chromosomal structural aberrations in human and mouse sperm by fluorescence in situ hybridization. *Methods Molecular Biology*. 410, 241 – 271.
- Marina S. (2003) Avances en el conocimiento de la espermatogénesis: Implicaciones clínicas. *Revista Iberoamericana de fertilidad*. 20 (4), 213-225.
- Martin R. (2008) Meiotic errors in human oogenesis and spermatogenesis. *Reproductive Biomedicine Online*, 16 (4), 523-531.
- Martínez G., Walschaerts M., Le Mitouard M., Borye R., Thomas C., Auger J., Berthaut I., Brugnon F., Daudin M., Moinard N., Ravel C., Saias J., Szerman E., Rives N., Hennebicq S., Bujan L. (2016) Impact of Hodgkin or non-Hodgkin lymphoma and their treatments on sperm aneuploidy: a prospective study by the French CECOS network. *Fertility and Sterility*. 107, 341-350 <https://doi:10.1016/j.fertnstert.2016.10.001>
- McNeil N, Ried T. (2000) Novel molecular cytogenetic techniques for identifying complex chromosomal rearrangements: technology and applications in molecular medicine. *Expert Rev Mol Med*. 14,1-14. doi: 10.1017/S1462399400001940.
- Meistrich M. L. (2013) Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis in humans. *Fertility and Sterility* 100 (5), 1180-1186. <https://doi:10.1016/j.fertnstert.2013.08.010>.

- Miller O. J. y Therman E. (2001) *Human Chromosomes* (4ta Ed.) Springer-Verlag, New York, USA. 157- 171.
- Mitelman F. (2000) Recurrent chromosome aberrations in cancer. *Mutation Research*. 462, 247-253.
- Monzón G. O., Mora P. E., Torres T. L., Gutiérrez L. D. y Cladelis R. (2011) Bases moleculares del cáncer. *Repertorio de Medicina y Cirugía*. 20 (4), 210-216.
- Murphy W., Frönicke L., O'Brien J.S., Stanyon R. (2003). The origin of human chromosome 1 and its homologs in placental mammals. *Genome Research*. 13, 880-1888. <https://doi:10.1101/gr.1022303>
- Murray A. (2014) *Encyclopedia of Toxicology: Dacarbazine*. Third Edition. *Biomedical Sciences*. 1132-1134. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.01213-6>
- Murrieta G. H., Villalobos P. A. y García C. S. (2009) Linfoma: Aspectos clínicos y de imagen. *Anales de Radiología en México*. 1, 81-97.
- Nagaoka S. I., Hassold T. J. y Hunt P. A. (2012) Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nature Review Genetics*. 13 (7), 493-504. <https://doi:10.1038/nrg3245>.
- Navarrete M. d. P., Pérez P. V., y Cruz R. A. (2012). Síndromes de inestabilidad cromosómica asociados con inmunodeficiencia: Aspectos citogenéticos de importancia en el diagnóstico. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*, 21(1), 13-22.

- Navarro-Almenzar B., Moreno B.M.J. y Gómez E.J. (2020) Linfomas. *Medicine*. 13 (20), 1125-1132.
- Nenclares P. y Harrington K. J. (2019). The biology of cancer. *Cancer biology and Imaging*. 48, 67-72.
- Nussbaum R. L., McInnes R. y Willard H. F. (2008) Genética en medicina. (7ma Ed.) Saunders, Barcelona, España. 64-76.
- O'Flaherty C., Hales B. F., Chan P., Robaire B. (2010) Impact of chemotherapeutics and advanced testicular cancer or Hodgkin lymphoma on sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertility and Sterility*. 94 (4), 1374-1379. <https://doi:10.1016/j.fertnstert.2009.05.068>.
- Okada K. y Fujisawa M. (2019) Recovery of spermatogenesis following cancer treatment with cytotoxic chemotherapy and radiotherapy. *World Journal Mens Health*. 37 (2), 166-174. <https://doi:10.5534/wjmh.180043>
- Oliveira S. M. A. y De Moraes L. M. (2017) CD20+ role in pathophysiology of Hodgkin's disease, *Associação Médica Brasileira*. 63 (9), 810-813.
- Paoli D., Rizzo F., Fiore G., Pallotti F., Pulsoni A., Annechini G., Lombardo F., Lenzi A., Gandini L. (2016) Spermatogenesis in Hodgkin's lymphoma patients: a retrospective study of semen quality before and after different chemotherapy regimens. *Human Reproduction*. 31 (2), 263-72. <https://doi:10.1093/humrep/dev310>.
- Peña E. V. (2016) Medicina Interna: Diagnóstico y Tratamiento (2 Ed.) Editorial de Ciencias Médicas, Cuba. 397-404.

- Pérez-Zúñiga J.M., Aguilar-Andrade C., Álvarez-Vera J. L., Augusto-Pacheco M., Báez-Islas P.E., Bates-Martín R., Cervantes-Sánchez I. Alvarado-Ibarra M. (2019) Linfoma de Hodgkin. *Revista de Hematología México*. 20 (2), 124-130.
- Piomboni P., Stendardi A. y Gambera L. (2014) Chromosomal aberrations and aneuploidies of spermatozoa. E. Baldi and M. Muratori (eds.), Genetic Damage in Human; Spermatozoa. *Advances in experimental medicine and biology*, 791, 27-52. [https://doi:10.1007/978-1-4614-7783-9\\_3](https://doi:10.1007/978-1-4614-7783-9_3)
- Plummer M., de Martel C., Vignat J., Ferlay J., Bray F. y Franceschi S. (2016) Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Global Health* 4 (9), 609-616.
- Preston R. J. (2014) Chromosome Aberrations. Encyclopedia of toxicology (3ra Ed.) US National Library of Medicine, USA. 955-958.
- Quintero-Vázquez G. A, Bermudez-Cruz R. Ma. y Castillo-Cadena J. (2015) Infertilidad masculina y fragmentación del DNA espermático: un problema Actual. *Boletín Clínico del Hospital Infantil del Estado de Sonora*. 18 (2), 144-151.
- Ramos C., Ladeira C., Zeferino S., Dias A., Faria I., Cristovam E., Gomes M., Ribeiro E. (2019) Cytotoxic and genotoxic effects of environmental relevant concentrations of bisphenol A and interactions with doxorubicin. *Mutation Res /Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 838:28-36. <https://doi:10.1016/j.mrgentox.2018.11.009>.

- Reynoso-Noverón N. y Torres-Domínguez J. A., (2017). Epidemiología del cáncer en México: carga global y proyecciones 2000-2020. *Revista Latinoamericana de Medicina Conductual*. 8, 9-15.
- Rivas-Vera S., Ramírez-Ibarguen A. F., Figueroa-Acosta R. y Ledesma-Osorio Y. C. (2019). Linfoma de Hodgkin: carga de la enfermedad en México. Construcción de una medida proxy con datos administrativos del Sistema Nacional de Salud. *Gaceta mexicana de oncología*, 18 (4), 246-252.
- Roemer M. G. M., Ligon H., Engert A., Younes A., Santoro A., Zinzani P. L., Timmerman J. M., Ansell, Armand P., Fanale A., Ratanatharathorn V., Kuruvilla J., Jonathon B., Cohen J. B., Graham P., Collins G. P., Savage K. G., Trneny M., Neuberg D. S., Redd R. A., Farsaci B., Kato K., Sumbul A., Rodig S. J. y Shipp M. A. (2016) Chromosome 9p24.1/PD-L1/PD-L2 Alterations and PD-L1 Expression and Treatment Outcomes in Patients with Classical Hodgkin Lymphoma Treated with Nivolumab (PD-1 Blockade). *Blood*. 128, 22. <https://doi.org/10.1182/blood.V128.22.2923.2923>
- Roldán R E. (2016) Introducción a la toxicología. FES-Zaragoza, UNAM. Ciudad de México, México. Pág. 81-100. Ebook, <http://www.librosoa.unam.mx/handle/123456789/1256>
- Roldán R. E. y López G. L. A. (2017) Alteraciones cromosómicas espermáticas en pacientes con linfoma de Hodgkin. *RelbCi*. 4(5), 84-91.
- Romero M, Cruz H, Huetter M, Krueger G, Gathof B, Padilla M, Rojo J. (2004) Prevalencia de los virus herpes humanos 4 (VEB)

y 6 (HHV-6) en linfoma de Hodgkin, en pacientes estudiados en la Ciudad de México. *Revista Médica del Hospital General de México* 167. 124-129.

- Rosenberg L. E. y Drobnis D. (2012). Human genes and genomes. Londres, Reino Unido, *Academic Press*. 141-167.
- Ruiz C.V., Hernández D.R. y De la Rosa Z.G. (2019), *Genética Clínica*. 2° Ed. Manual Moderno, Ciudad de México, México. 974.
- Salamanca-Gómez F. (1995) Alteraciones cromosómicas en el cáncer humano. *Salud Pública México*. 37 (2), 1-14.
- Salazar M.A.M., Sandoval R.A.S. y Armendáriz B.J.S. (2016) *Biología Molecular; Fundamentos y aplicaciones en ciencias de la salud*. (2da Ed.) Mc GrawHill, México D. F. 349.
- Siegel R. L., Miller K. D. y Jemal A. (2019). Cancer statistics *Cancer Journal Clinicians*. 69, (1) 9-11. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>
- Skinner M. K. (2018), Numerical Chromosome Abnormalities. *Encyclopedia of Reproduction*. (2da. Ed.) University of Utah, USA, 4. 231-236. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64537-3>
- Slotter D.E., Lowe X., Moore I.D., J. Nath, Wyrobek A.J. (2000). Multicolor FISH analysis of chromosomal breaks, duplications, deletions, and numerical abnormalities in the sperm of healthy men. *American Journal of Human Genetics*. 67, 862-872. <https://doi.org/10.1086/303088>
- Sohler D. W., Wong L. K. R., Aisenberg A. C. (1968) Vinblastine in the treatment of advanced Hodgkin's disease. *American Cancer Society*. 22 (2), 467-472. <https://doi.org/10.1002/1097>

- Stefan D.C. y Harif M. (2017) Hodgkin Lymphoma. In: *Pediatric Cancer in Africa*. Springer, [https://doi-org.2443/10.1007/978-3-319-17936-0\\_14](https://doi-org.2443/10.1007/978-3-319-17936-0_14)
- Steidl C. (2017) Exposing Hodgkin-Reed-Sternberg cells. *Blood*. 129 (1), 6-7. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-11-746701>
- Sung H., Ferlay J., Siegel L. R., Laversanne M., Soerjomataram I. Jemal A. y Bray F. (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *International Journal Cancer*. 71 (3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Tafurt Y., Marin M.A. (2014) Principales mecanismos de reparación de daños en la molécula de ADN. *Biosalud*. 13 (2), 95-110.
- Tal R., Botchan A., Hauser R., Yogev L., Paz G. y Yavetz H. (2000) Follow-up of sperm concentration and motility in patients with lymphoma. *Human Reproduction* 15 (9), 1985-1988. <https://doi:10.1093/humrep/15.9.1985>.
- Tempest H., Ko E., Chan P., Robaire B., Rademaker A. y Martin R. H. (2008) Sperm aneuploidy frequencies analysed before and after chemotherapy in testicular cancer and Hodgkin's lymphomapatients. *Human Reproduction*. 23 (2), 251–258. <https://doi:10.1093/humrep/dem389>
- Templado C., Bosch M. y Benet J. (2005) Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human spermatozoa. *Cytogenet Genome Research*. 111 (3), 199-205. <https://doi:10.1159/000086890>.

- Templado C., Uroz L. y Estop A. (2013). New insights on the origin and relevance of aneuploidy in human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*. 19 (10), 634-643. <https://doi.org/10.1093/molehr/gat039>
- Templado C., Vidal F. y Estop A. (2011) Aneuploidy in human spermatozoa. *Cytogenet Genome Research*. 133, 91-99. [https://doi: 10.1159/000323795](https://doi:10.1159/000323795).
- Tramacere I, Pelucchi C, Bonifazi M, Bagnardi V, Rota M, Bellocco R, Scotti L, Islami F, Corrao G, Boffetta P, La Vecchia C, Negri E. (2012). A meta-analysis on alcohol drinking and the risk of Hodgkin lymphoma. *European Journal of Cancer Prevention*. 21 (3). 268-273. doi: 10.1097/CEJ.0b013e328350b11b.
- Tremblay A., Beaud H. y Delbès G. (2017) Effets transgénérationnels des chimiothérapies: l'exposition du père influence-t-elle la santé des générations futures? *Gynécologie Obstétrique Fertilité & Sénologie*. 45 (11), 609-618. <https://doi.org/10.1016/j.gofs.2017.09.004>
- Vakalopoulos I., Dimou P., Anagnostou I. y Zeginiadou T. (2015) Impact of cancer and cancer treatment on male fertility. *Hormones*. 14 (4), 579-89. <https://doi:10.14310/horm.2002.1620>.
- Van Hummelen P., Lowe X. R. y Wyrobek A. J. (1996) Simultaneous detection of structural and numerical chromosome abnormalities in sperm of healthy men by multicolor fluorescence in situ hybridization. *Human Genetics*. 98 (5), 608-615. [https://doi: 10.1007/s004390050268](https://doi:10.1007/s004390050268)

- Vásquez R, F. y Vásquez E. D. (2007). Espermograma y su utilidad clínica. *Revista Salud Uninorte*, 23 (2), 220-230.
- Vellemans H. y André M. P. E. (2021) Review of treatment options for the management of advanced stage Hodgkin Lymphoma. *Cancers (Basel)*. 13 (15), 3745. <https://doi:10.3390/cancers13153745>.
- Vialard F. y Pellestor F. (2008) Intérêt de la cytogénétique des gamètes humains: résultats et perspectives. *Pathologie Biologie*. 56, 388-399.
- Viviani S, Ragni G, Santoro A, Perotti L, Caccamo E, Negretti E, Valagussa P, Bonadonna G. Testicular dysfunction in Hodgkin's disease before and after treatment. *European Journal of Cancer*. 27 (11), 1389-1392. [https://doi:10.1016/0277-5379\(91\)90017-8](https://doi:10.1016/0277-5379(91)90017-8)
- Viviani S, Santoro A, Ragni G, Bonfante V, Bestetti O. y Bonadonna G. (1985) Gonadal toxicity after combination chemotherapy for Hodgkin's disease. Comparative results of MOPP vs ABVD. *Clinical Oncology*. 21 (5), 601-605. . [https://doi:10.1016/0277-5379\(85\)90088-4](https://doi:10.1016/0277-5379(85)90088-4)
- Weiss L.M., Strickler J.G., Warnke R.A., Purtilo D.T., Sklar J. Epstein- Barr viral DNA in tissues of Hodgkin's disease. *The American Journal of Pathology*. 129, 86-91. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1899692/>
- WHO [World Health Organization] (1999). Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge, U.K.: Cambridge University Press.

- WHO [World Health Organization] (2017). Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. (4ta Ed). Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H. Lyon: International Agency for Research on Cancer.
- WHO [World Health Organization] (2018) Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018. [press release] International Agency for research in cáncer.
- Wyrobek A. J., Marchetti F., Slotter E. y Bishop J. (2000) Chromosomally defective sperm and their developmental consequences. Human monitoring after environmental and occupational exposure to chemical and physical agents. Ed. IOS Press, 134-150.
- Wyrobek A. J., Schmid T. E. y Marchetti F. (2005) Relative susceptibilities of male germ cells to genetic defects induced by cancer chemotherapies. *Journal National Cancer Institute* [Monografía]. 34, 31-35. <https://doi:10.1093/jncimonographs/lgi001>
- Younes A. y Ansell S. M. (2016) Novel agents in the treatment of Hodgkin lymphoma: Biological basis and clinical results. *Seminars in Hematology*. 53 (3), 183-189. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2016.05.011>.
- Zakariya I, Moutaouakkil I., Nchinech N., Maghous A., Fettah H., Nejari R., El guessabi L. (2017) Les alcaloïdes anticancéreux de la pervenche de Madagascar. *Journal Marocain des Sciences Médicales*. 21 (1), 16-19. <https://doi.org/10.48401/IMIST.PRSM/jmsm-v21i1.9807>.

- Zhou, L., Deng, Y., Li, N., Zheng Y., Tian T., Zhai Z., Yang S., Hao O., Wu., Song D., Zhang D., Lyu J. (2019) Global, regional, and national burden of Hodgkin lymphoma from 1990 to 2017: estimates from the 2017 Global Burden of Disease study. *Journal of Hematology & Oncology*. 12, 107.  
<https://doi.org/10.1186/s13045-019-0799-1>
- Zirkin B. R. y Papadopoulos V. (2018) Leydig cells: formation, function, and regulation. *Biology of Reproduction*. 99, 101-111.  
[https://doi: 10.1093/biolre/iory059](https://doi:10.1093/biolre/iory059).

## 11. ANEXO



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
AUTÓNOMA  
DE MÉXICO



### Constancia

Que otorga la  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES ZARAGOZA  
a través de la Unidad de  
Formación Integral

A Alan Enrique Ortiz Barrera, Laura Aline López  
García y Elia Roldán Reyes

Por su participación en la modalidad de **Exposición oral**,  
titulada: "*Alteraciones cromosómicas espermáticas en pacientes  
con linfoma de Hodgkin tratados con quimioterapia ABVD*", en  
el marco del **XXIV Foro de Investigación Escolar en Biología**;  
organizado por la Carrera de Biología, el día 9 de agosto del año  
en curso.

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Ciudad de México, 20 de septiembre de 2019.

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Vicente Jesús Hernández Abad  
Director

LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
y  
EL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD



Otorgan la presente

*Constancia*

a:

Ortiz Barrera Alan Enrique, López García Laura Aline y Roldán Reyes Elia.

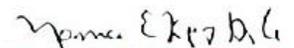
Por la presentación del trabajo:

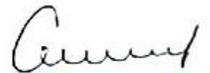
ALTERACIONES CROMOSÓMICAS ESPERMÁTICAS EN PACIENTES CON  
LINFOMA DE HODGKIN TRATADOS CON QUIMIOTERAPIA ABVD

en el XXIV Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud

Celebrado los días 30 de Septiembre al 04 de Octubre del 2019

  
Dr. José Luis Gómez Olivares  
Jefe del Dpto. de Ciencias de la Salud

  
Dra. Norma Edith López Díaz-Guerrero  
Coordinadora

  
Dra. Elsa Cervantes Ríos  
Coordinadora



AmpliBio



# Science Associated Editors

La central de los libros electrónicos

www.scased.com

Julio 17, 2020

Dra. Elia Roldán Reyes

Por la presente le hacemos una sincera disculpa por el retraso en la publicación del capítulo de libro titulado:

## **Aberraciones cromosómicas en espermias de sobrevivientes a Linfoma de Hodgkin**

Cuyos autoría corresponde a los investigadores:

Elia Roldán Reyes, Laura Aline López García y Alan Enrique Ortiz Barrera

Que esta incluido en el libro

### **Instituciones de Educación Superior. La labor investigadora e innovadora en México**

Que estará en circulación la primera quincena del mes de Agosto del dos mil veinte

Reiterando nuestra disculpa, certificamos que el retraso en la publicación fue por causas ajenas a los autores

Comite Editorial  
Science Associated Editors

7300 Yellowstone Road #10  
Cheyenne, WY 82009  
Estados Unidos de America





Hospital Infantil de México Federico Gómez  
Dirección de Investigación  
Unidad de Investigación en Virología y Cáncer

Otorga la presente

# CONSTANCIA

a

**ALAN ORTIZ BARRERA**

Por su asistencia al Taller Teórico - Práctico

El amplio espectro de desordenes del sistema inmune y cáncer, asociado al Virus del Epstein-Barr  
Celebrado del 24 al 26 de junio de 2019 en el Auditorio "Dr. Jesús Kumate"  
del Hospital Infantil de México Federico Gómez

*EZEQUIEL M. FUENTES*

Dr. Ezequiel M. Fuentes Pananá

Profesor Titular



## XLIV CONGRESO NACIONAL DE GENÉTICA HUMANA



Universidad Autónoma de Chiapas  
Asociación Mexicana de Genética Humana A.C.  
Otorgan la presente:

# CONSTANCIA

a  
**Alan Enrique Ortiz Barrera**

Por haber participado como Ponente con el tema:

**ALTERACIONES CROMOSÓMICAS ESPERMÁTICAS EN PACIENTES CON LINFOMA DE HODGKIN TRATADOS CON QUIMIOTERAPIA  
ABVD**

Por su presentación de **Trabajos Libres en modalidad Oral**, realizado el 16 de noviembre dentro del marco del XLIV Congreso Nacional de Genética Humana en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

**"POR LA CONCIENCIA DE LA NECESIDAD DE SERVIR"**

**Dra. Leticia del Carmen Flores Alfaro**  
Secretaría Académica  
Universidad Autónoma de Chiapas

**Dra. en C. Dora Gilda Mayén Molina**  
Presidenta  
Asociación Mexicana de Genética Humana A.C.