

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

DETECCIÓN DE ANEUPLOIDÍAS EN ESPERMATOZOIDES
DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE HODGKIN
TRATADOS CON QUIMIOTERAPIA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

PRESENTA

SILVIA ROSALÍA SÁNCHEZ SANDOVAL

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. SARA FRIAS VÁZQUEZ

MÉXICO, D.F.

JUNIO, 2006.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional
de Ciencia y Tecnología;
CONACYT 32557-M.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Citogenética
del Departamento de Investigación en Genética Humana
del Instituto Nacional de Pediatría, SS.

Comité Tutorial:

Dra. Sara Frias Vázquez

Dr. Mario A. Altamirano Lozano

Dr. J. Miguel Betancourt Rule

AGRADECIMIENTOS

Isaac y Paco, mi pequeña gran familia. Gracias por donarme gran parte de su tiempo para lograr la realización de este trabajo. Los amo.

Ma: Por ti llegué hasta donde estoy.

Pa: Eres un gran motor en mi vida.

Al laboratorio de Citogenética. Gracias por todos estos años de enseñanzas que han logrado que la genética sea ya una parte fundamental en mi vida.

Gracias a la Clínica de sobrevivientes Oncológicos del INP, por su invaluable colaboración.

ÍNDICE	Página
Resumen	II
Abstract	V
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Enfermedad de Hodgkin. Generalidades	1
1.2 Tratamiento	6
1.3 Consecuencias secundarias al tratamiento para EH	15
2. JUSTIFICACIÓN	24
2.1 A nivel clínico	24
2.2 A nivel de genética toxicológica	24
2.3 A nivel reproductivo	25
3. OBJETIVOS	26
4. HIPÓTESIS	26
5. MATERIAL Y MÉTODOS	27
5.1 Población de estudio	27
5.2 Análisis de calidad de semen	29
5.3 Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia multicolor	34
5.4 Estadística	40
6 RESULTADOS	41
6.1 Antecedentes personales	41
6.2 Tratamientos y edad de aplicación	46
6.3 Calidad de semen	49
6.4 Aneuploidías en espermatozoides	55
6.5 Clonas de células aneuploides	76
7. DISCUSIÓN	77
7.1 Antecedentes personales	77
7.2 Calidad de semen	79
7.3 Aneuploidías en espermatozoides	87
7.4 Extrapolación a genoma haploide	96
8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	99
9. REFERENCIAS	102
Anexo 1. Carta de consentimiento informado.....	109
Anexo 2. Cuestionario de Tamizaje	110
Anexo 3. Cuestionario principal	113
Anexo 4. Soluciones	118
Anexo 5. Hoja de captación de datos CytoScore, LLNL	119

Palabras Clave: Enfermedad de Hodgkin, Aneuploidías, hibridación *in situ* con fluorescencia, calidad de semen, genotoxicidad.

RESUMEN

Antecedentes. La enfermedad o linfoma de Hodgkin (EH) es una neoplasia maligna que afecta el sistema linfoide, presenta un pico de incidencia entre jóvenes de 20 a 25 años. En nuestro país este linfoma ocupa el tercer lugar en población pediátrica.

El tratamiento para EH permite una supervivencia libre de enfermedad mayor al 85%, incluye agentes tóxicos así como aneuploidógenos que no solo atacan a las células neoplásicas sino que también causan daño a células sanas y producen en ellas daño citotóxico y genotóxico letal y no letal. Muchos de los sobrevivientes a este tipo de cáncer son jóvenes en edad reproductiva, con un epitelio germinal que ha sido expuesto al efecto deletéreo de estos agentes.

En pacientes adultos con EH tratados con MOPP se encontró un incremento significativo en la frecuencia de hiperhaploidías 20 años después de haber concluido el tratamiento, sin embargo, a nivel mundial no hay trabajos que estudien el efecto de estas terapias cuando recibieron el tratamiento antes de la pubertad. En México hasta ahora no se habían realizado trabajos que evalúen el efecto que tienen estos tratamientos en la población, ni las consecuencias que puedan tener estos pacientes a nivel reproductivo.

Objetivos. Se evaluó la calidad del semen de sobrevivientes a EH tratados con quimioterapia MOPP, se determinó la frecuencia de aberraciones cromosómicas numéricas en sus espermatozoides y se comparó si el tratamiento antineoplásico aplicado antes o después de la pubertad tiene consecuencias citotóxicas y genotóxicas diferentes.

Metodología. La calidad de semen se evaluó mediante espermatobioscopia directa en 10 individuos sanos y 25 pacientes EH: 19 tratados antes y 6 tratados después de la pubertad, con quimioterapia MOPP sola o en combinación con alguna otra mezcla de agentes y con ó sin radioterapia. Se determinó la frecuencia de aneuploidías para los cromosomas X, Y, 18 y 21 con la técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH). Se analizaron 10,000 espermatozoides por individuo.

Resultados. La calidad de semen de los pacientes EH, se encontró significativamente afectada sin importar la edad a la que recibieron el tratamiento. 12 de 19 pacientes tratados en edad prepuberal (63%) fueron azoospermicos, 5 fueron oligospermicos severos y 2 tuvieron cuentas espermáticas normales. En el grupo tratado después de la pubertad 2 fueron azoospermicos, 2 oligospermicos y 2 normospermicos. El 88% de los pacientes incluidos en este estudio tuvieron por lo menos dos parámetros de la espermatobioscopía fuera de los rangos normales. Las aneuploidías se detectaron en aquellos pacientes con espermatozoides: 6 individuos tratados antes de la pubertad y 4 tratados después de la pubertad. Los pacientes tratados antes de la pubertad, no mostraron frecuencias de aneuploidías diferentes con respecto a los sujetos testigo; pero los pacientes EH tratados después de la pubertad presentaron mayor frecuencia de disomía XY con respecto a los sanos (sanos 4 vs 11 pospubertad) y tuvieron una frecuencia de alteraciones cromosómicas complejas significativamente elevada con respecto a los otros dos grupos (sanos y antes de la pubertad =1 vs 4 pospubertad $p \leq 0.05$). Se identificaron clonas celulares anormales en uno de 6 pacientes tratados antes de la pubertad y tres de cuatro tratados después de la pubertad, tuvieron clonas con disomía XY y uno de ellos aparte de esta clona presentó una segunda con disomía 21.

Discusión. La quimioterapia MOPP produce daño severo en la espermatogénesis de los pacientes expuestos 2 a 20 años antes, con densidad, movilidad y morfología espermática alteradas sin importar si recibieron o no radioterapia o si el tratamiento lo recibieron cuando su epitelio germinal estaba en división activa (post-pubertad) o no (pre- pubertad). En ambos grupos de pacientes el hecho de haber recibido la quimioterapia sola o en combinación con radioterapia no se vio reflejado en la frecuencia de alteraciones cromosómicas. En los pacientes tratados después de la pubertad se encontraron alteraciones cromosómicas complejas incrementadas y 3 de 4 individuos presentaron clonas con aneuploidías, sin embargo, es difícil determinar si las alteraciones cromosómicas son una consecuencia directa de la quimioterapia sobre el epitelio germinal en división activa, debido a que: a) no es posible determinar si las células con mayor daño

cromosómico murieron y una baja o nula cuenta espermática y b) es necesario analizar un mayor número de pacientes atendidos en edad adulta. Cabe señalar al respecto que en un estudio realizado por Van Hummelen y colaboradores en 1998 con pacientes adultos, se encontró que aún 23 años después de terminado el tratamiento 3 de cuatro individuos presentaron alteraciones cromosómicas en sus espermatozoides, lo cual apoya nuestros resultados.

Conclusiones. Con este trabajo se puede concluir que la quimioterapia MOPP produce citotoxicidad la cual se expresa como una disfunción gonadal severa la cual no se modifica si el tratamiento lo reciben antes o después de la pubertad. En cuanto a la genotoxicidad, el esquema MOPP genera en los pacientes tratados después de la pubertad daño genético expresado como la generación de clonas celulares anormales. En ambos grupos no se descarta la posibilidad de que exista daño cromosómico estructural y este tipo de daño genético sea el que provoque la disfunción gonadal.

1. ANTECEDENTES

1.1 ENFERMEDAD DE HODGKIN. Generalidades.

En 1832 Thomas Hodgkin describió clínica y patológicamente la enfermedad de Hodgkin (EH) la cual se consideraba como un proceso inflamatorio inespecífico de los órganos linfáticos (1). Actualmente la EH se considera como una neoplasia maligna que afecta al sistema linfoide y representa aproximadamente el 30- 40% de todos los linfomas malignos (2, 3, 4).

Según el Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos, la incidencia de la EH es de 2.8 por cada 100,000 individuos por año. La incidencia es mayor entre hombres que entre mujeres y se presenta mas en individuos de raza blanca que en negros. Existe una distribución epidemiológica bimodal característica de países desarrollados: pocos casos ocurren en la infancia, hay un rápido incremento en la incidencia en los adolescentes cuyo pico mayor es alrededor de los 20 años y luego una disminución con una meseta entre los 40 y 60 años después de la cual hay un segundo incremento hasta mostrar un segundo pico alrededor de los 70 años de edad (5, 6, 7, 8, 9).

A nivel mundial, la EH constituye el tercer cáncer más común en edad pediátrica. En México, en el Instituto Nacional de Pediatría, ocupa el tercer lugar dentro del grupo de las neoplasias malignas, antecedida por leucemias y tumores sólidos del

sistema nervioso central, y cuya media en población infantil es de alrededor de los 8 años de edad (4, 10, 11).

1.1.1 Clasificación.

A nivel celular, en 1898 Sternberg y en 1902 Reed realizaron la descripción histológica del linfoma de Hodgkin con la definición de una célula específica de este padecimiento: la célula de Reed-Sternberg (RS) (1). Éstas junto con un entorno de leucocitos reactivos y en algunos casos fibrosis, son características y diagnósticas de la enfermedad. Las células RS son células malignas gigantes (15-45µm) con citoplasma abundante, pueden ser multinucleadas o bien presentar un solo núcleo multilobulado, la membrana nuclear se tiñe intensamente, alrededor del núcleo se observa una zona clara que simula un halo y poseen nucleolos prominentes; estas células constituyen una pequeña proporción (2%) de las que se encuentran en el tejido afectado, lo que las hace difíciles de estudiar (2, 5, 9). Además existen variantes celulares que conservan la misma apariencia nuclear y nucleolar: unas son mononucleares regularmente llamadas células de Hodgkin y variantes de éstas denominadas lacunares, las cuales son típicas de la enfermedad con esclerosis nodular (5).

A nivel histopatológico, el linfoma Hodgkin clásico se clasifica en cuatro diferentes tipos celulares:

- Esclerosis nodular. Se encuentran principalmente células anormales y RS en su variante lacunar.

- Celularidad mixta. Se encuentran células RS y sus variantes. El nódulo linfático se encuentra difusamente borrado, se puede encontrar fibrosis fina e intersticial.
- Predominancia linfocítica. La arquitectura del nódulo linfático esta destruida y es necesario realizar una búsqueda exhaustiva de células RS para realizar el diagnóstico. No se encuentra fibrosis.
- Depleción linfocítica. Se encuentran principalmente células anormales con escasez de linfocitos. Es común encontrar fibrosis y zonas de necrosis difusas.

Esta clasificación es la propuesta por la Organización Mundial de la Salud (5, 9, 12, 13).

1.1.2 Diagnóstico.

Clínicamente del 60 al 90% de los pacientes inician con tumores grandes en el cuello o en la región supraclavicular que generalmente son asintomáticos y que frecuentemente se descubren por estudios radiológicos de rutina o cuando su tamaño es considerable. La presentación de masas inguinales o axilares de inicio son muy raras, de hecho se considera como enfermedad sistémica; lo mismo sucede con la infiltración a bazo e hígado lo cual es evidencia clara de enfermedad avanzada.

Alrededor del 25% de los pacientes presentan algunos síntomas como fatiga, fiebres intermitentes, pérdida de más del 10% de su peso en un periodo menor a seis meses, sudores nocturnos (diaforesis) y prurito (9, 10).

Para establecer el diagnóstico es necesario hacer biopsia de él ó los nódulos linfáticos afectados para determinar su histopatología. Las radiografías de tórax son informativas acerca de cuánta es la afección a nivel mediastinal; para tener un diagnóstico completo, es conveniente realizar pruebas de función hepática y renal, así como cobre sérico, velocidad de sedimentación globular y fosfatasa alcalina como indicadores directos e indirectos de actividad tumoral, así como pruebas basales de función tiroidea para determinar un posible daño tiroideo posterior al tratamiento. Al momento del diagnóstico se pueden encontrar alteraciones hematológicas como anemia y trombocitopenia. Todas estas pruebas muestran el estado general del paciente y ayudan al establecimiento preciso del diagnóstico (5, 10).

1.1.3 Estadificación.

La presencia de diversos factores como la edad del paciente, la madurez física, histología, estadio de la enfermedad, tamaño de la masa tumoral y presencia o ausencia de síntomas sistémicos pueden influir de manera directa al establecimiento de una terapia óptima para tratar la EH. Todas estas características, permiten clasificar al individuo, indicando si está en una fase de la

enfermedad favorable o desfavorable para poder iniciar la terapia, esto lleva a tomar una decisión, para asegurar mejores oportunidades de sobrevida libre de enfermedad a largo plazo y procurar un bajo riesgo de toxicidad causada por los agentes terapéuticos (2, 4, 7, 9, 14).

El sistema de estadificación aplicado actualmente es el descrito en Ann Harbor al inicio de la década de los 70's, este sistema se realizó con la finalidad de evitar el uso de laparotomías y esplenectomías como procedimientos para la estadificación (Tabla 1)(9, 10).

Tabla 1. Estadificación de la enfermedad de Hodgkin.

Estadio	Descripción
I	Involucro de una sola región-nódulo linfático o estructura linfoide
II	Dos o mas nódulos linfáticos afectados del mismo lado del diafragma
III	Nódulos linfáticos afectados a ambos lados del diafragma III-1: Con infiltración en bazo y nódulos portales. III-2: Con nódulos para-aórticos, iliacos o mesentéricos afectados.
IV	Infiltración en sitios extralinfáticos o tejidos asociados, lo cual se designará con E
A	Asintomático
B	Fiebre intermitente, sudores nocturnos, pérdida de peso.

1.2 Tratamiento.

Actualmente, los métodos terapéuticos utilizados para el tratamiento de EH, pueden producir una sobrevida libre de enfermedad en un 85-100% de los pacientes en estadio temprano o enfermedad localizada definida como IA o IIA y un 70-90% en individuos con EH en estadio avanzado o desfavorable IIB, III o IV (15, 16, 17).

Las modalidades de tratamiento utilizadas para este linfoma se pueden dividir en cuatro categorías: escisión de la masa tumoral mediante cirugía, radiación, quimioterapia y modalidad combinada (radioterapia + quimioterapia).

1.2.1 Radioterapia.

Inicialmente, la radioterapia fue el tratamiento más utilizado para el control de la EH. Después se observó que era conveniente su uso como único tratamiento sólo para pacientes en estadios tempranos, con esto se logró en ellos un control a largo plazo en un 80 a 85%. Posteriormente, la radiación se combinó con drogas quimioterapéuticas, especialmente en pacientes en estadios tardíos de la enfermedad y con pronóstico desfavorable (18).

Cuando la radioterapia es la única modalidad de tratamiento, se requieren dosis elevadas de 35 a 44Gy. En combinación con quimioterapia, se utilizan dosis más bajas de radiación: 20 - 30Gy (16, 18).

Campos de irradiación:

1. Manto: Para pacientes con EH supra-diafragmática.
2. Manto y para-aórtico con o sin campo esplénico: Conocida también como irradiación linfoide o subtotal. Se aplica en nódulos linfáticos para-aórticos en adición al campo de manto.
3. Irradiación total nodular o linfoide total: Incluye la mayor parte del tejido linfoide; manto y para-aórtico además del campo pélvico.
4. "Y" invertida: Usado en pacientes con EH infra-diafragmática, que incluya nódulos linfáticos para-aórticos y pélvicos (18).

1.2.2 Quimioterapia.

En la práctica clínica la combinación de regímenes quimioterapéuticos estándar se selecciona basado en el tipo de tumor que se haya encontrado, su histología y la extensión de la enfermedad (19). Estos tratamientos pueden tener efectos adversos a nivel reproductivo ya que algunos agentes pueden causar daño genético y/o citotoxicidad a nivel de las células germinales (20).

Para la EH la primera terapia sistémica efectiva fue el régimen MOPP (Mecloretamina, Oncovin, Procarbazina y Prednisona). Esta combinación en altas dosis, produce una sobrevida libre de enfermedad en el 50% de los pacientes. Para pacientes pediátricos, es importante tomar en cuenta los efectos tardíos de este tratamiento que son el incremento del riesgo de desarrollar leucemia

mieloide aguda e infertilidad. Del 80 al 90% de pacientes que recibieron seis ciclos de MOPP, desarrollaron azoospermia definitiva o transitoria, la cual puede persistir hasta 10 a 15 años después del tratamiento y posteriormente se pueden recuperar parcial o totalmente (16). Estos efectos colaterales pueden reducirse sustituyendo el uso de agentes alquilantes como la mostaza nitrogenada (Mecloretamina) por drogas como la ciclofosfamida.

La aparición de tratamientos basados en el uso de antraciclinas como ABVD (Adriamicina, Bleomicina, Vinblastina, Dacarbazina) y OPPA (Oncovin, Procarbazina, Prednisona, Adriamicina), redujo de manera importante los efectos tóxicos secundarios producidos por el uso de MOPP. Sin embargo, debido a las secuelas cardiopulmonares que se atribuyen a la adriamicina y bleomicina, su uso se limitó a pacientes con presentaciones clínicas favorables y con tratamientos que tuvieran menos ciclos de quimioterapia o se pudieran alternar con mezclas con agentes alquilantes como MOPP, COPP (Ciclofosfamida, Oncovin, Procarbazina, Prednisona) o ChIVPP (Clorambucil, Oncovin, Procarbazina, Prednisona), en pacientes con EH en estadios avanzados y pronóstico desfavorable (16).

1.2.3 Modalidad combinada.

El prototipo de quimioterapia combinada es MOPP/ABVD más radioterapia. Esta modalidad, ha probado ser muy efectiva en pacientes pediátricos, ya que permite reducir el campo de irradiación y la dosis, así como utilizar menos ciclos de

quimioterapia (≤ 6) y se observó que con esto se disminuía la aparición de secuelas a consecuencia de la terapia (8, 9, 16).

La quimioterapia se administra a intervalos semanales o mensuales, intercalando agentes por un periodo de 3 a 5 meses. Para estadios favorables de la enfermedad se recomienda el uso de terapia reducida de agentes químicos: sólo 4 ciclos de ABVD ó dos de MOPP mas dos de ABVD más 20Gy de radioterapia en campos comprometidos. Cuando la presentación de la enfermedad es no favorable se recomienda administrar seis ciclos de terapia combinada MOPP/ABVD con aplicación de dosis bajas y localizadas de radioterapia (de 15 a 25 Gy). De manera frecuente, la aplicación de radioterapia después de la quimioterapia tiene la finalidad de reducir el riesgo de recaídas (9, 16, 17, 18).

1.2.4 Agentes quimioterapéuticos usados en el tratamiento de la EH.

1.2.4.1 Agentes Alquilantes.

Estos compuestos son un importante grupo de drogas anticáncer con un amplio rango de actividad clínica. Ejercen su efecto citotóxico al formar un enlace covalente mediante un grupo alquilo con importantes moléculas celulares. Estos agentes pueden producir daño a las moléculas de DNA o bien inhiben su síntesis. Existen agentes alquilantes monofuncionales y bifuncionales; los primeros, tienen sólo un grupo alquilo para donar; entre éstos están la procarbazona y la dacarbazina, los cuales tienen actividad antitumoral sin causar enlaces cruzados en el DNA. Los segundos, como la mitomicina C (MMC) y el cisplatino, son

bifuncionales, tienen dos grupos alquilo, el daño producido es principalmente interhebra e intrahebra de DNA, además producen enlaces cruzados DNA-proteína (21).

Existen dos mecanismos diferentes de captación celular: uno que es dependiente de un acarreador, lo utilizan principalmente las drogas solubles en agua como la mecloretamina, el cis-platino y el melfalan. Este grupo es más citotóxico para células en ciclo celular activo. El segundo mecanismo son aquellas drogas liposolubles como la procarbazona y las nitrosureas, éstas entran a la célula por difusión pasiva por lo tanto son independientes de acarreadores; éstas drogas son igualmente tóxicas para células en ciclo celular activo o en reposo (19).

1.2.4.2 Antibióticos antitumorales.

Estas son sustancias que originalmente se aíslan de microorganismos como *Streptomyces*, en esta clase se incluyen las antraciclinas, la dactinomicina y la bleomicina. Estos antibióticos se unen al DNA insertándose en la doble hélice entre pares de bases; es entonces cuando ejercen su efecto citotóxico ya que interfieren en la replicación y la transcripción del DNA, actúan básicamente impidiendo la actividad de las RNA y DNA polimerasas así como de las topoisomerasas (19).

1.2.4.3 Aneuploidógenos.

Estos agentes son principalmente alcaloides derivados de la planta *Vinca*. Actúan como inhibidores mitóticos, su efecto lo ejercen al unirse a la tubulina, que es una

proteína dimérica que se polimeriza para formar los microtúbulos. Esto resulta en una disrupción de muchas de las funciones vitales de las células como son la mitosis, el mantenimiento de la estructura celular, así como el movimiento y transporte de solutos. El principal efecto citotóxico de estas sustancias se relaciona con la inhibición de la formación del huso mitótico (19).

1.2.5 Esquema MOPP/ABVD

MOPP

Mecloretamina (Mostaza Nitrogenada):

Pertenece al grupo de agentes alquilantes bifuncionales; es una droga química que provoca daño al DNA e inhibe la síntesis del mismo. Este tipo de agente, produce específicamente mutaciones en estadios post-meióticos como en espermátides y en espermatoцитos (20). Fue el primer tipo de agente alquilante utilizado para el tratamiento de cáncer.

Oncovin (Sulfato de Vincristina):

Es un alcaloide que interfiere con la polimerización de los microtúbulos o altera su estructura lo que provoca un bloqueo en la formación del huso mitótico, por lo que arresta las células en metafase, muchas de ellas mueren y en aquellas que sobreviven se puede generar alteraciones cromosómicas numéricas. En espermatogonias, inhibe la incorporación de timidina al DNA, así como la de uridina para la síntesis de RNA y bloquea la formación de fosfolípidos (19, 20, 22).

Procarbazona:

Es un agente alquilante que originalmente se sintetizó como un inhibidor de la monoamina oxidasa, pero posteriormente en animales, se le encontraron propiedades antitumorales. Es una prodroga que requiere de activación metabólica *in vivo* para expresar su actividad antineoplásica. Este compuesto inhibe la síntesis de proteínas, DNA y RNA. Es el tercer agente anticáncer (el primero es melfalan, el segundo la mitomicina C) que se ha demostrado, en ratón, que produce mutaciones en células madre del linaje espermático (espermatogonias) así como en espermatozoides. Además induce mutaciones dominantes letales en espermátides y en espermatoцитos lo cual provoca azoospermia temporal o definitiva (19, 20).

Prednisona:

Aunque no se considera como una droga anticancerígena, tiene un papel importante en el tratamiento de EH. Es un corticoesteroide sintético antiinflamatorio con menos actividad que el cortisol; tiene acción sobre la formación y distribución linfocítica, desde la circulación sanguínea hasta el tejido linfoide. Antagoniza fisiológicamente los procesos estimulados por las hormonas que son necesarios para la proliferación celular. No se han reportado efectos mutagénicos y/o carcinogénicos de esta sustancia (19, 23).

Ciclofosfamida:

En la combinación COPP, se usa en lugar de la Mecloretamina. Es un agente alquilante que produce daño al DNA y requiere de activación metabólica. En espermatoцитos causa disfunción del complejo sinaptonémico. Afecta las

secuencias de DNA centromérico, produce figuras aberrantes en diacinesis de Meiosis I y micronúcleos en espermátides (20).

ABVD

Adriamicina (Doxorubicina):

Es una antraciclina que se utiliza ampliamente como antibiótico anti-tumoral. Es un inhibidor de la topoisomerasa II que produce rupturas de cadena sencilla y doble. Se le relaciona con ciertos efectos secundarios como problemas cardiacos y efectos mutagénicos. En ratones, es claramente citotóxico en estados tempranos meióticos y en todos los espermátogónicos (19, 20, 24).

Bleomicina:

Es el único antibiótico que es una mezcla de glicopéptidos de bajo peso molecular. Es un radiomimético es decir, tiene la misma capacidad de dañar al DNA que la radiación ionizante, al unirse al DNA produce rupturas como resultado de la formación de un complejo de radicales libres, y sin necesidad de que haya síntesis de DNA. Se ha observado que la interacción de esta droga con la vincristina, incrementa el riesgo de toxicidad pulmonar y es posible desarrollar fibrosis pulmonar. Es altamente mutagénica en células germinales femeninas y menos en masculinas (19, 20, 25).

Vinblastina (Sulfato de):

Al igual que la vincristina, es un alcaloide inhibidor del ensamblaje del huso mitótico que se une directamente a la tubulina. Su actividad citotóxica puede observarse en todas las fases del ciclo celular. Estos alcaloides incrementan la tasa de síntesis a AMPc y reducen la formación de la DNA polimerasa, con lo cual se alteran muchos de los procesos fisiológicos de las células. En ratones tratados con este agente se observó que hay una mala segregación cromosómica en metafase I por lo que en espermatozoides evaluados en metafase II se encontraron hiperhaploidías (19, 20).

Dacarbazina:

Agente alquilante desarrollado como un inhibidor de la biosíntesis de purinas. A pesar de que se observan efectos tóxicos secundarios graves con su uso, aún no se conoce su potencial teratogénico y carcinogénico (19, 26).

En el Instituto Nacional de Pediatría en ocasiones se sustituye la dacarbazina por prednisona.

1.3 Consecuencias secundarias al tratamiento para EH.

Muchos investigadores piensan que la modalidad de terapia antineoplásica combinada es el tratamiento óptimo para el linfoma de Hodgkin, ya que los protocolos probados han tenido excelentes resultados y han disminuido la incidencia de secuelas secundarias al tratamiento, ya que se aplican bajas dosis y menores volúmenes de áreas irradiadas, así como pocos ciclos de QT menos tóxica. Estos tratamientos antineoplásicos han demostrado ser muy exitosos ya que resultan en una sobrevida a largo plazo libre de enfermedad que va del 85 hasta el 100% de los pacientes (7, 9, 16, 27). Sin embargo, existe el riesgo potencial de que los pacientes ya curados presenten efectos secundarios a largo plazo como consecuencia de éstos tratamientos. Estos efectos dependen del régimen terapéutico, número de ciclos aplicados, así como dosis total y campo irradiado (28, 17). Entre los efectos secundarios se incluyen toxicidad hematológica, infertilidad, desarrollo de enfermedades cardiacas, disfunción tiroidea y cáncer secundario.

1.3.1 Efectos secundarios a nivel somático.

Las dos causas más frecuentes de muerte en pacientes EH en remisión son el cáncer secundario, principalmente de pulmón, y enfermedades cardiacas (9, 17, 27). Las neoplasias secundarias más comunes son: Tumores sólidos (58%), leucemia aguda (25%) y linfoma no-Hodgkin (17%) (29, 30).

Los tumores sólidos son la mayor causa de mortalidad después del tratamiento con radioterapia y tienen una latencia de aproximadamente 10 años; algunos de estos tumores se desarrollan en los alrededores o dentro del campo irradiado. Los principales tumores son: mama, pulmón, piel, tiroides, tracto gastrointestinal y tejido conectivo (17, 18, 28).

La alta incidencia de leucemia aguda no linfoblástica y síndrome mielodisplásico (2-6%), se atribuye al uso de quimioterapia con agentes alquilantes e inhibidores de la topoisomerasa II (8, 9, 17, 28, 29, 31, 32, 33). Hay algunos reportes en donde se menciona que la esplenectomía en estos pacientes, antes del tratamiento con agentes alquilantes, incrementa también el riesgo de desarrollar leucemia (17, 31). La aparición de este tipo de leucemia, alcanza un pico de incidencia entre los 3 y 10 años post-tratamiento (31, 34). Es importante mencionar que este tipo de leucemias se asocia con anomalías cromosómicas con una frecuente participación de los cromosomas 5, 7 y 17 (28).

El riesgo de desarrollar linfoma No-Hodgkin, se incrementa durante los 10 primeros años hasta la segunda década después del tratamiento para EH (28). Se ha reportado que la aparición de este tipo de cáncer no está relacionada con algún tipo especial de terapia (34).

Alrededor de un 30% de los pacientes tratados con radiación de manto, desarrollan anomalías de la tiroides, principalmente hipotiroidismo, nódulos en tiroides y en menor proporción cáncer de tiroides (8, 17, 18). Los efectos

cardiacos se observan después del uso de radioterapia a dosis altas (>40Gy) o de quimioterapia con antraciclinas; se ha observado que estos efectos disminuyen con la terapia combinada, donde se reduce la dosis de estos antibióticos a aproximadamente la mitad de lo que se aplicaría como tratamiento único (28).

La función pulmonar también se puede ver afectada por el uso de drogas como la bleomicina y también con la radioterapia de manto (17). En un estudio que se llevó a cabo en 78 pacientes con EH tratados con ABVD y RT encontraron que el 4% de los pacientes tuvieron síntomas respiratorios adversos, el 23% desarrolló toxicidad pulmonar, la cual requirió de una reducción de la dosis de bleomicina; tres de los 78 desarrollaron cáncer secundario (dos de pulmón y uno de mama) a los 34, 36 y 48 meses después de terminar el tratamiento (27). Este mismo grupo de investigadores, demostraron que el riesgo de desarrollar leucemia es significativamente mayor en pacientes tratados con agentes alquilantes y procarbazona (régimen MOPP) combinada con RT que en individuos tratados solo con QT (31).

Por otro lado, Longo y colaboradores (35) analizaron una serie de 80 pacientes con EH a quienes se les administró ABVD alternado con MOPP combinado a su vez con RT; ellos encontraron una tasa de supervivencia libre de enfermedad a 15 años del 78%; 21% de los pacientes presentaron recaídas 2-8 meses después de haber concluido la terapia; 19 sujetos de esta serie murieron por diferentes causas: ocho no alcanzaron la remisión y murieron por EH, nueve por recaída, uno

en segunda recaída desarrolló cáncer secundario (leucemia) y uno por neumonitis producida por el tratamiento (35).

Estos y otros estudios más han despertado la necesidad de considerar cuidadosamente la selección de la terapia antineoplásica a aplicar para éste y otros tipos de cáncer; además de realizar seguimientos a largo plazo para lograr la detección de segundas neoplasias lo mas tempranamente posible.

1.3.2 Efectos secundarios a nivel germinal.

Como ya se ha visto, los pacientes con EH generalmente son jóvenes, la mayoría de ellos se encuentran en edad reproductiva o bien en la infancia; los tratamientos que se les suministran tienen efectos severos en el tejido testicular y más aún en el epitelio germinal lo cual afecta su potencial reproductivo (36).

Por otra parte, la terapia anticáncer afecta de manera importante el eje reproductivo hipotálamo-pituitaria-gónada, las consecuencias pueden observarse de manera inmediata o a largo plazo y resultan en la alteración de la función gonadal, la que incluye daño en las células de Leydig que afecta sus funciones y produce un desequilibrio hormonal lo que a su vez altera la espermatogénesis (37).

1.3.2.1 Espermatogénesis.

Algunos pacientes quedan con azoospermia después del tratamiento antineoplásico con agentes citotóxicos. Para que estos pacientes recuperen la espermatogénesis pueden pasar desde pocas semanas hasta inclusive varios años y no se puede predecir cuando llegará esta recuperación (36).

Da Cunha y colaboradores (37) observaron en pacientes a los que se les aplicaron menos de 3 ciclos de MOPP, que éstos recuperaban con mayor facilidad sus cuentas espermáticas a niveles normales, en comparación con aquellos cuya exposición fue de 5 ciclos o mas, en los que la recuperación fue prácticamente nula (37). Sin embargo, debido a la diversidad de los tratamientos aplicados, ha sido difícil encontrar cuáles son los factores primordiales que afectan a la producción espermática y la calidad del semen: número de ciclos/dosis aplicada, estadio de la enfermedad, edad al recibir la terapia, presencia/ausencia de síntomas, etc.(38, 39). Algunos estudios indican que del 87% de los individuos que son azoospermicos como consecuencia al tratamiento para EH, solo alrededor del 20 al 40% recuperan la espermatogénesis y se ha visto que dicha recuperación puede darse dentro de los cinco años posteriores al término de la terapia (38, 40, 41).

Es importante conocer las secuelas que pueden producir estos tratamientos con la finalidad de buscar mejores opciones para los pacientes tratados con ellos; se ha descrito que la combinación ABVD (que no incluye procarbazona) es mucho menos citotóxica a nivel germinal en comparación con MOPP ya que produce

oligospermia sólo en el 54% de los individuos tratados y no se ha asociado con disfunción gonadal permanente (42, 43).

1.3.2.2 Alteraciones cromosómicas en células germinales.

Las anomalías cromosómicas contribuyen de manera importante a las fallas reproductivas en humano. Aproximadamente el 20% de los embarazos terminan en abortos espontáneos y de estos alrededor del 50% tienen anomalías cromosómicas. Poco se conocía acerca de la contribución paterna en estas anomalías (44, 45, 46); sin embargo actualmente se sabe que más del 80% de las anomalías cromosómicas son eventos *de novo* que se originaron a partir de la línea germinal paterna. Las trisomías constitutivas de los autosomas 13, 18 y 21 generalmente son de contribución materna; mientras que las aneuploidías de los sexocromosomas en su mayoría son de contribución paterna, al igual que las mutaciones puntuales y rearrreglos estructurales ya que éstos se producen principalmente durante la espermatogénesis (45).

En estudios realizados en diferentes modelos animales se ha demostrado que tanto la radiación como los agentes quimioterapéuticos producen daño químico al DNA o interfieren en los procesos metabólicos e inducen mutaciones y rearrreglos cromosómicos en las células somáticas y germinales de los individuos sometidos a estos tratamientos (20, 47). En roedores se ha demostrado la contribución paterna de alteraciones cromosómicas a la descendencia: cuando se exponen ratones machos a mutágenos germinales y posteriormente se cruzan con hembras

no expuestas, los resultados son muerte embrionaria, translocaciones cromosómicas heredables, malformaciones y cáncer en la descendencia (45, 48).

Las aneuploidías cromosómicas son una forma de genotoxicidad que pueden provocar abortos o defectos al nacimiento. Alrededor del 30 al 50% de los abortos en humano son provocados por aneuploidías y aproximadamente el 0.6% de los nacidos vivos tienen anormalidades cromosómicas constitutivas (45, 47).

Al estudiar cepas de ratones cromosómicamente alterados con translocaciones recíprocas o robertsonianas y su transmisión por medio de la línea germinal masculina, se ha logrado establecer que existen frecuencias de aneuploidías similares en espermatoцитos y en embriones pre-implantación, lo que demuestra que un espermatozoide aneuploide es igualmente efectivo para llevar a cabo la fertilización que uno cromosómicamente normal (45, 46, 49).

Son pocos los estudios realizados en humano para conocer las frecuencias de alteraciones cromosómicas en células germinales, Brandiff en 1984 evaluó mediante la técnica de fecundación inter-específica de espermatozoides de humano con ovocitos de hámster (44); con esta técnica diez años después analizaron a 6 pacientes con EH para determinar los efectos genotóxicos de la QT MOPP, encontraron al comparar con individuos sanos, un incremento significativo en el porcentaje de aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales en individuos tratados 3 a 20 años antes, lo cual sugiere que este régimen es capaz

de causar anomalías cromosómicas en las células madre germinales de pacientes con EH (50).

La técnica del hámster produce información precisa en cuanto a daño cromosómico pero el análisis es extremadamente difícil, se revisa un bajo número de espermatozoides con trabajo intenso y solo se analizan complementos cromosómicos de aquellos espermatozoides que son capaces de fecundar a un ovocito de otra especie (51, 52). Recientemente se implementó para el estudio cromosómico en espermatozoides la técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) con sondas de DNA primero de un par de cromosomas y posteriormente hasta tres cromosomas, para detectar aneuploidías. Este procedimiento está validado para la detección de alteraciones cromosómicas numéricas e incluso estructurales por la técnica del hámster y se ha comprobado que con esta metodología y controlando de manera muy estricta las condiciones de la realización de la técnica y los criterios de análisis y evaluación, se pueden detectar eficientemente las aneuploidías y analizar un gran número de gametos por individuo (51, 53, 54, 55, 56).

Ambas técnicas han sido aplicadas en el estudio de espermatozoides de sujetos que han sido expuestos a diversos agentes antineoplásicos específicos para diferentes tipos de cáncer, con la finalidad de conocer sus efectos sobre las células germinales de estos pacientes (50, 51, 52, 53, 54, 55, 57).

Robbins en 1997 (52) y Frias en 2003 (58) analizaron las frecuencias de aneuploidías en células germinales de pacientes con EH antes, durante y después del tratamiento con NOVP; el primero de ellos analizó las frecuencias para los cromosomas X, Y y 8 en ocho individuos y el segundo analizó a los cromosomas X, Y, 18 y 21. Ambos estudios encontraron elevada la frecuencia de hiperhaploidías para los cromosomas X, Y, 8, 18 y 21 así como un incremento significativo de espermatozoides diploides en las muestras obtenidas de los pacientes durante el tratamiento; este incremento fue transitorio y aproximadamente 100 días después de terminada la QT, las frecuencias disminuyeron casi a los niveles de antes del tratamiento (52, 58).

Con estos datos, es importante considerar que la constitución aneuploide de un espermatozoide puede interferir en la maduración del gameto o en la reducción de la producción espermática (59).

Como ya se ha demostrado en trabajos previos los esquemas de tratamiento para EH NOVP y MOPP producen citotoxicidad y genotoxicidad en células sanas de individuos tratados en edad adulta. En este trabajo queremos conocer si al aplicar el tratamiento MOPP cuando el epitelio germinal esta en proliferación activa (después de la pubertad) se producen consecuencias citotóxicas y genotóxicas a largo plazo diferentes que si se aplica cuando el epitelio germinal no está aún en división activa (antes de la pubertad).

2. JUSTIFICACIÓN.

2.1 A nivel clínico:

La inducción de daño genético letal para las células puede ocasionar diversas enfermedades, por ejemplo en células sanguíneas, una baja en la cuenta de células (anemias, infecciones) y en células germinales oligospermia o azoospermia transitoria o definitiva. Sin embargo, es de gran preocupación el que se genere daño genético no letal para las células, ya que puede: a nivel somático, dar lugar a un incremento en el riesgo de enfermedades parcialmente genéticas, como segundos cánceres y a nivel germinal, generar abortos o a descendencia con síndromes genéticos. Aunque se han hecho varios estudios epidemiológicos (60, 61) no se ha podido demostrar la inducción de daño genético heredable en humanos ya que se requiere de poblaciones grandes. Para determinar el riesgo genético para las concepciones humanas es importante demostrar que la exposición a ciertos agentes produce genotoxicidad en las células germinales (62).

2.2 A nivel de Genética toxicológica:

Las alteraciones genéticas tienen un importante impacto en la salud humana: Se sabe que 8% de los humanos desarrollarán algún tipo de enfermedad total o parcialmente genética antes de la edad de 25 años (63). Una proporción desconocida de mutaciones *de novo* en línea germinal pueden ser causada por

exposición a agentes del medio ambiente, terapéuticos o por consumo personal. En humanos, las consecuencias genotóxicas por exposición a agentes externos sólo puede estudiarse en poblaciones modelo, como la formada por los pacientes tratados con agentes antineoplásicos.

2.3 A nivel reproductivo.

Hasta ahora, sólo existen dos trabajos sobre consecuencias de la quimioterapia MOPP y ambos se realizaron con los mismos pacientes, en uno se utilizó la técnica de fecundación interespecífica con óvulos de hámster (50) y con el advenimiento de la FISH, se abrió la posibilidad del segundo estudio citogenético en estos espermatozoides, de manera directa y en gran número; se encontraron aneuploidías, diploidías y alteraciones estructurales en 3 de 4 pacientes, lo cual indica que la FISH es una potente metodología para estudiar este problema (56). Los esquemas antineoplásicos usados actualmente son muy eficientes, se estimó que para el año 2002 uno de cada 700 adultos jóvenes serían sobrevivientes a algún tipo de cáncer (36), por lo que actualmente deben existir más de 1 en 700, muchos de ellos en edad reproductiva. Las terapias anticáncer poseen compuestos que producen daño a células tanto neoplásicas como sanas en cualquier fase del ciclo celular. De manera adicional, no se ha reportado si las consecuencias son diferentes de acuerdo con el estado de división celular del epitelio germinal, de ser así, tendría gran repercusión en la conducta terapéutica para estos pacientes y al mismo tiempo se aportaría conocimiento sobre la

variabilidad de respuesta a la exposición a agentes externos en niños vs adolescentes y adultos.

3. OBJETIVOS

3.1 Evaluar la calidad del semen de sobrevivientes a EH mayores de 18 años de edad que fueron tratados antes ó después de la pubertad con quimioterapia MOPP.

3.2 Determinar la frecuencia de alteraciones cromosómicas numéricas en espermatozoides de pacientes EH tratados con quimioterapia MOPP.

3.3 Determinar si el tratamiento antineoplásico aplicado antes de la pubertad tiene consecuencias genotóxicas diferentes a cuando se aplica después de la pubertad.

4. HIPÓTESIS

El tratamiento antineoplásico para EH produce un decremento en la calidad del semen de los sobrevivientes e induce alteraciones cromosómicas numéricas en las células madre germinales. Los sobrevivientes que fueron tratados antes de la pubertad presentan un menor grado de citotoxicidad y genotoxicidad en sus espermatozoides, comparados con aquellos tratados después de la pubertad.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Población de Estudio.

La población de estudio consistió en 25 pacientes diagnosticados con EH: 19 recibieron tratamiento antineoplásico en la infancia, seis lo recibieron después de los 13 años de edad. Todas las terapias aplicadas fueron MOPP (Mecloretamina, Oncovin, Procarbazina, Prednisona) solo o en combinación con algún otro agente quimioterapéutico, con o sin radioterapia. Además 10 individuos sanos con un rango de edades similar al de los pacientes a la toma de la muestra. Los pacientes fueron canalizados a través de la clínica de supervivientes de cáncer del Instituto Nacional de Pediatría, del Centro Medico 20 de Noviembre del ISSSTE, del Instituto Nacional de Cancerología y del Hospital General de México.

A todos los individuos que ingresaron al estudio se les solicitó que firmaran una carta de consentimiento informado (Anexo 1) y que respondieran dos cuestionarios (Anexo 2 y 3).

5.1.1 Criterios

5.1.1.1 Criterios De Inclusión.

- a) Individuos mayores de 18 años que hayan sido diagnosticados con EH y que hayan terminado su tratamiento antineoplásico con la mezcla MOPP ya fuera antes o después de la pubertad.
- b) Que firmaran una carta de consentimiento informado (Anexo 1).

- c) Que contestaran un cuestionario de tamizaje (Anexo 2), de datos personales y clínicos el cual incluía hábitos alimenticios, enfermedades, exposición a medicamentos y/o a agentes tóxicos, así como consumo de cigarro, drogas y alcohol (Anexo 3).
- d) Individuos sanos mayores de 18 años, que cubrieron los requisitos de los incisos b) y c), y se consideran el grupo de referencia.

5.1.1.2 Criterios De Exclusión.

- a) Individuos que tuvieran vasectomía.
- b) Aquellos que en los últimos tres meses hubieran desarrollado algún tipo de enfermedad crónica o infectocontagiosa.
- c) Aquellos que hubieran desarrollado algún cáncer secundario.

5.2 Análisis de calidad de semen

A cada individuo se le solicitó la donación de semen por masturbación, después de por lo menos tres días de abstinencia. El análisis de las muestras se realizó 60 minutos después de su obtención; durante este tiempo la muestra se mantuvo a temperatura ambiente (TA).

La espermatobioscopía consistió en la evaluación de parámetros físicos: volumen, color, licuefacción, viscosidad, pH, y citológicos: viabilidad, densidad celular, progresión y morfología.

Los parámetros macroscópicos como licuefacción y viscosidad del semen se evaluaron en el mismo recipiente en el que se recogió la muestra. Para medir el pH se usaron tiras reactivas medidoras de pH (SIGMA Chemical Company) con escala de 4.5 a 10.0. El volumen se midió con una pipeta serológica graduada de 2 ó 5 mililitros. Los valores considerados como normales fueron los propuestos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (64).

5.2.1 Viabilidad.

Se llevó a cabo con una mezcla volumen a volumen de semen fresco y una solución de eosina al 0.5% (5 g/l en solución de cloruro de sodio al 0.9%), se dejó incubar por 2 a 4 minutos a 37°C y después se cuantificaron 100 espermatozoides: los teñidos en rosa se registraron como muertos y los no teñidos como vivos.

5.2.2 Densidad celular.

Se realizó un conteo rápido de una mezcla 1:9 (semen: H₂O_d) en una cámara de Neubauer. Se contaron los espermatozoides que se localizaran en la cuadrícula central de 5X5 (Figura 1a) con un objetivo 40X en microscopio de luz. De acuerdo a los criterios de la OMS, si se contaran menos de 10 espermatozoides por cuadro se cuantificó el contenido de los 25 cuadros; si habían de 10 a 40 espermatozoides se analizaban 10 de los cuadros y si el contenido era mayor a 40 espermatozoides sólo se contaban los que se encontraran en 5 de los cuadros (Figura 1b).

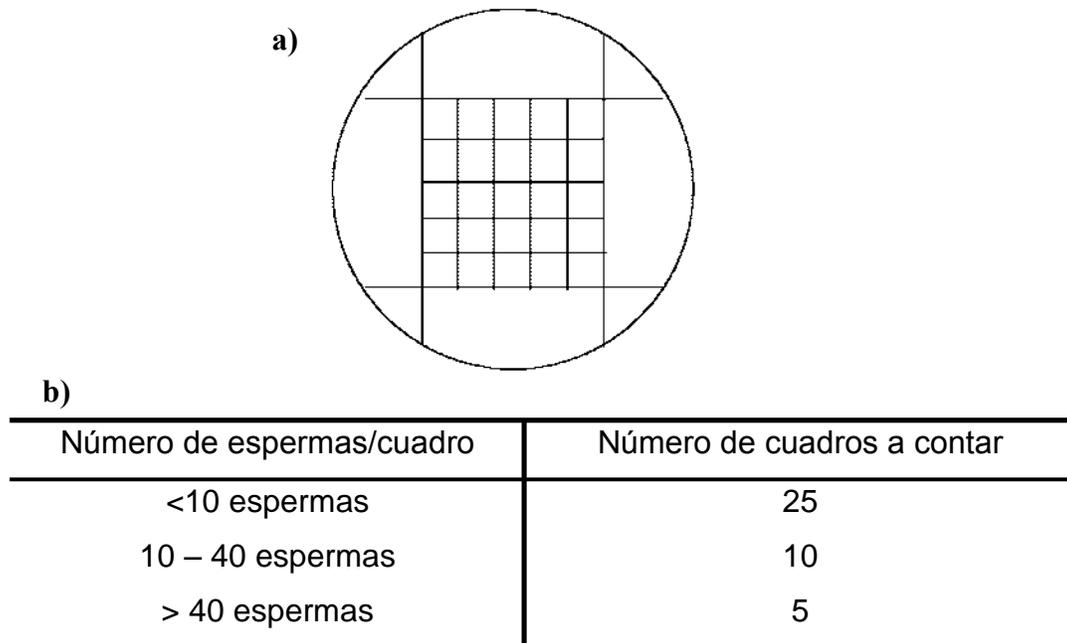


Figura 1. a) Cámara de Neubauer, cuadrícula a analizar. b) Cuadros a revisar según los espermatozoides que se encuentren en ellos (65).

Se realizaron 2 conteos, de encontrar una diferencia mayor al 10% entre ambos se realizó un tercer conteo. Se calculó el promedio de los conteos y la densidad espermática dividiendo el promedio entre el factor de conversión de acuerdo a la dilución usada y a los cuadros evaluados de acuerdo a la Tabla 2.

Tabla 2. Factores de conversión para calcular la densidad.

Dilución Semen :diluyente	Número de cuadros grandes contados		
	25	10	5
1 + 9	10	4	2
1 + 19	5	2	1

Después ese valor se multiplicó por 10^6 , este es el valor de la densidad espermática por mililitro de eyaculado. Este valor multiplicado por el volumen del eyaculado equivale a la cuenta espermática total (65).

5.2.3 Progresión.

Se evaluó considerando sólo los espermatozoides libres y no los que estuvieran aglutinados. Se registraron 4 tipos de progresión espermática:

- A)** Movimiento progresivo rápido. Aquellos que se desplazan de forma rectilínea y rápida.
- B)** Movimiento progresivo lento. Los que se desplazan más lentamente de forma recta o en curvas.

C) Movimiento no progresivo (en su lugar). Se mueven pero no cambian de posición.

D) Inmóviles. Sin ningún tipo de movimiento.

El resultado de la progresión se presenta como el porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo rápido y lento (**A + B**).

5.2.4 Morfología espermática.

Se valoró en una alícuota de semen fijada volumen a volumen con formaldehído al 10%. De ésta se tomaron 10µl y se analizaron en contraste de fases con objetivo 40X.

Los espermatozoides normales, según los criterios de la OMS, poseen una cabeza oval regular o ligeramente ahusada en la región postacrosómica, debe tener un acrosoma muy bien definido que ocupe entre el 40 y el 70% de la cabeza. La pieza media debe ser estrecha, unida axialmente a la cabeza y de presentar algún residuo citoplásmico éste no superará la tercera parte de la cabeza del espermatozoide. La cola ó flagelo debe ser uniforme, ligeramente más estrecha que la pieza media pero no enroscada; tampoco ha de mostrar residuos citoplásmicos. Todas las formas diferentes a lo anterior se clasifican como anormales (64).

5.2.5 Azoospermia.

Las muestras en las que el análisis reveló ausencia de espermatozoides se diluyeron con solución amortiguadora de fosfatos (PBS GIBCO), se centrifugaron a 600 -1000rpm durante 30 minutos y se analizó exclusivamente el contenido de los paquetes celulares obtenidos para confirmar la azoospermia.

5.3 Hibridación *In Situ* Con Fluorescencia Multicolor.

Se hicieron alícuotas del semen analizado y se guardaron en el ultracongelador (-80 °C) perfectamente bien etiquetadas con los siguientes datos:

Código del paciente
Densidad espermática
Fecha
Número de vial / numero de viales congelados

Una vez realizada la espermatobioscopia se llevó a cabo la selección de los pacientes en los que fue posible realizar la técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) Multicolor, los cuales debían contar con espermatozoides en su muestra de semen. De los 25 sobrevivientes que se incluyeron en este trabajo, 11 tuvieron espermatozoides, sin embargo sólo se pudieron analizar 10, debido a que en uno de ellos (MOPP 05) la muestra presentó una gran cantidad de detritus celulares y de acuerdo a los criterios usados para la lectura, no fue posible su evaluación.

La FISH es una técnica que se basa en la desnaturalización de un fragmento de DNA conocido marcado con fluorocromo que se obtiene de manera comercial ó se fabrica (sonda) y de un DNA blanco que es el de los cromosomas de la célula a analizar. Una vez abierta la doble cadena de ambos DNA's se ponen en contacto para que por complementariedad de bases tipo Watson y Crick ambos formen un híbrido. De esta manera, el DNA blanco quedará hibridado con el DNA conocido. Se utiliza también una contratinción de DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) el cual

facilita la visualización de toda la cromatina y de las señales fluorescentes de las sondas.

5.3.1 Frotis de Semen para FISH Multicolor.

En laminillas previamente lavadas y desengrasadas con etanol al 100% por 24 horas, se realizaron frotis de semen los cuales se dejaron secar a temperatura ambiente por lo menos 24 horas; posteriormente se guardaron a -20°C en cajas para laminillas con desecadores, gaseadas con nitrógeno y a su vez metidas dentro de bolsas de plástico con cierre hermético también gaseadas.

5.3.2 Preparación de sondas

El ensayo X, Y, 18, 21 multicolor se llevó a cabo con las siguientes sondas de DNA (Vysis):

Sonda	Región que localiza	Fluorocromo	Cantidad usada por ensayo
CEP X	α -satélite DXZ1. Centrómero del cromosoma X	Espectro Rojo + Espectro Verde	0.7 μl : 0.3 μl
CEP Y	β -satélite III. DYZ1. Heterocromatina Yq.	Espectro Aqua	1 μl
CEP 18	α -satélite D18Z1. Centrómero del cromosoma 18.	Espectro Verde	1 μl
LSI 21	Locus específico 21q22.13-22.2 D21S259, D21S341 Y D21S342	Espectro Rojo	1.5 μl

Se colocó la cantidad específica para cada sonda en un tubo de eppendorf de 1ml de volumen, se añadió además 1µl de DNA de salmón para reducir la hibridación inespecífica. Se agregó 0.5µl de acetato de sodio 3M y 20µl de etanol absoluto para precipitar el DNA de las sondas; se resuspendió el contenido y se centrifugó a 14,000 rpm a 4°C durante 30 minutos. Se eliminó todo el sobrenadante y se colocó el vial en un desecador conectado a vacío por una hora. Se rehidrató el contenido del vial con 3µl de H₂O inyectable y 7µl de solución de hibridación (Vysis). Las sondas se dejaron rehidratar 24 horas en refrigeración para su posterior uso.

5.3.3 Ensayo X, Y, 18, 21 en espermatozoides.

Para realizar este ensayo se sacaron las laminillas almacenadas en el congelador. Antes de abrir la caja se esperó a que estuviera a temperatura ambiente. Los frotis se fijaron con metanol al 100% por 15 minutos. Se dejaron secar y se colocaron por lo menos 30 minutos en incubadora a 37°C para asegurar la evaporación de todo el alcohol.

5.3.3.1 Descondensación de núcleos espermáticos.

Se colocaron las laminillas con frotis en una solución de ditioneitol 10 mM (DTT) en hielo por 30 minutos, inmediatamente se pasaron a una solución de ácido 3,5 diyodosalisílico 4mM (LIS) a TA durante 90 minutos (la temperatura ambiente generalmente no sobrepasó los 20°C) (Soluciones Anexo 4). Una vez fuera de esta solución y sin dejarlos secar, se revisaron los cambios estructurales de los

núcleos, estos se tienen que ver en contraste de fases como pequeños globos grises, con bordes nítidos y sin brillo procurando la homogeneidad de la laminilla, de no verse así se regresaron de 5 a 10 minutos más a la solución de LIS. Las laminillas se dejaron secar por lo menos 45 minutos a TA.

5.3.3.2 Desnaturalización de DNA.

Las laminillas se colocaron en formamida 70%/2XSSC a 78°C durante seis minutos, inmediatamente después se pasaron a alcoholes graduales fríos (70%, 80% y 100%) dos minutos en cada uno. Las laminillas se dejaron secar a TA por 30 minutos.

Se revisó el material del frotis y se delimitó el área en donde se colocó la sonda para su hibridación.

5.3.3.3 Hibridación.

La sonda se desnaturalizó a 78°C durante 6 minutos y de inmediato se colocó en la zona delimitada del frotis, se colocó un cubreobjetos limpio (22x22mm) y se aplicó sellador alrededor del mismo.

Las laminillas se colocaron en la oscuridad, en una cámara húmeda previamente calentada a 37°C donde permanecieron en incubación durante 12 a 36 horas.

5.3.3.4 Lavados y contratinción.

Las laminillas se sacaron de la cámara húmeda, se les retiró el sellador y se colocaron en un vaso con solución 2XSSC a TA para que el cubreobjetos se deslizara y no se maltratara el material biológico. Se colocaron en formamida 50%/2XSSC previamente calentada a 45°C durante 10 minutos, de ahí se pasaron a un vaso con 2XSSC a 37°C donde permanecieron por otros 10 minutos; por último en otra solución 2XSSC a TA por 10 minutos más. Cada laminilla se contratiñó con 10µl de DAPI 0.01µg/ml (4',6- diamino-2-fenilindol) diluido en medio de montaje para fluorescencia Vectashield (Vector, Labs. Inc.).

Todas las laminillas fueron codificadas por una persona no involucrada en la lectura.

5.3.4 Lectura y criterios de análisis para el ensayo X, Y, 18, 21.

El análisis de FISH se realizó en un microscopio de fluorescencia BX60 (Olympus) con un objetivo 100X U Plan FI Ph3 (Semi Apocromático Universal) con los siguientes filtros:

- DAPI
- FITC. Fluoresceína.
- Rodamina/ Rojo Texas.
- Aqua.
- Doble banda: FITC / Rojo Texas.
- Triple banda: DAPI / FITC / Rojo Texas.

Se analizaron 10 000 espermatozoides por laminilla. La lectura se registró en un programa de computadora CytoScore (LLNL, Anexo 5). Se analizaron espermatozoides con bordes nítidos, sin superposición de otros núcleos los cuales se revisaron con filtro de triple banda, asegurándose de revisar la célula en todos sus planos. Al encontrar un espermatozoide anormal se revisó con los filtros sencillos para cada fluorocromo y además en contraste de fases para asegurar que se trataba de una célula germinal anormal y no otro tipo celular. De encontrar señales múltiples de un mismo color se valoró que éstas fueran del mismo tamaño e intensidad y que estuvieran separadas por $\frac{1}{2}$ diámetro de una señal normal; excepto para la señal de la heterocromatina del cromosoma Y ya que ésta es muy grande y sólo entonces se acepta que la separación sea menor de $\frac{1}{2}$ diámetro.

En cada espermatozoide anormal se registraron características físicas como largo y ancho de la cabeza, presencia/ausencia de cola, el tipo de anomalía encontrada y en la mayoría de los casos se solicitó a un segundo observador que confirmara la alteración anotada.

5.4 Estadística

Los resultados se analizaron con estas pruebas estadísticas según las necesidades de comparación:

χ^2 de Pearson para comparar la calidad de semen de acuerdo a la cantidad de QT recibida, edad de aplicación de la misma, tipo de esquema recibido y si hubo o no RT dentro del esquema antineoplásico.

U de Mann-Witney para analizar las frecuencias de aneuploidías entre los diferentes grupos de sujetos estudiados.

Kruskall-Wallis para comparar más de dos muestras.

T de Student-Welch para muestras independientes para comparar las frecuencias de aneuploidías entre los diferentes tratamientos aplicados.

El límite estadístico de confianza fue $p \leq 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 Antecedentes personales.

De acuerdo a los datos referidos por los sujetos sanos en el cuestionario general, cuatro fuman menos de 10 cigarros al día, esos mismos sujetos beben una ó dos cervezas y ocho beben en promedio 4 tazas de café a la semana (Tabla 3). Ninguno de ellos consume drogas (datos no mostrados).

De los pacientes tratados antes de la pubertad: sólo tres fuman, todos menos de 10 cigarros por día; seis ingieren en promedio 4 cervezas a la semana, 11 toman 5 tazas de café ó refresco de cola a la semana. Como consecuencia de la radioterapia 12 pacientes desarrollaron hipotiroidismo y están en tratamiento médico con levotiroxina (Eutirox) (Tabla 4). Ningún individuo de este grupo consume drogas. Uno de ellos tuvo un bebé; el resto usa métodos anticonceptivos (datos no mostrados).

En cuanto a los 6 pacientes tratados después de la pubertad, ninguno fuma; tres beben menos de 5 cervezas a la semana y cinco toman en promedio 4 tazas de bebidas con cafeína a la semana. Uno desarrolló hipotiroidismo y está en tratamiento (Tabla 5). Ninguno consume drogas. Uno de ellos intentó tener un hijo sin lograrlo (ahora sabe que es azoospermico) el resto usa métodos anticonceptivos (datos no mostrados).

De acuerdo a lo anterior, ningún sujeto tiene hábitos personales de uso o consumo excesivos de agentes genotóxicos. El único paciente que consume 10 cigarros por día (MOPP05) no fue posible analizarlo con FISH.

Tabla 3. Consumo de cigarro, alcohol y bebidas con cafeína referido por donadores sanos.

	Fuma (cigarros al día)	Alcohol (ml* a la semana)	Cafeína (tazas** a la semana)
NL 01	—	—	3
NL 02	—	—	3
NL 03	1	330	5
NL 04	7	330	1
NL 05	1	330	5
NL 06	—	—	5
NL 08	2	660	4
NL 09	—	—	5
NL 11	—	—	—
NL 13	—	—	—

* ml de cerveza. 330ml equivalen a una cerveza.

** tazas de café o refresco de cola.

Tabla 4. Antecedentes personales referidos por pacientes tratados antes de la pubertad.

	Fuma (cigarros al día)	Alcohol (ml* a la semana)	Cafeína (tazas** a la semana)	Hipotiroidismo Con medicación
HD-1	—	330	5	No
MOPP 10	—	330	—	Si
MOPP 11	3	990	—	Si
MOPP 41	—	—	—	No
MOPP 09	—	—	—	No
MOPP 22	—	—	2	Si
MOPP 24	—	—	1	Si
MOPP 05	10	990	15	No
MOPP07	—	—	—	Si
MOPP12	—	—	—	Si
MOPP21	—	3300	—	Ni
MOPP 23	—	—	7	Si
MOPP 20	—	—	5	Si
MOPP 28	1	1980	1	No
MOPP 43	—	—	2	Si
MOPP 46	—	—	15	Si
MOPP 01	—	—	5	No
MOPP 13	—	—	—	Si
MOPP 15	—	—	1	Si

*ml de cerveza. 330ml equivalen a una cerveza.

** tazas de café o refresco de cola.

Tabla 5. Antecedentes personales referidos por pacientes tratados después de la pubertad.

	Fuma (cigarros al día)	Alcohol (ml* a la semana)	Cafeína (tazas** a la semana)	Hipotiroidismo Con medicación
MOPP 03	—	330	5	No
MOPP 17	—	330	—	No
MOPP 02	—	—	5	Si
MOPP 19	—	1650	5	No
MOPP 26	—	—	20	No
MOPP 30	—	—	2	No

* ml de cerveza. 330ml equivalen a una cerveza.

** tazas de café o refresco de cola.

6.2 Tratamientos y edad de aplicación.

Todos los pacientes fueron tratados con MOPP sólo o combinado: cuatro con MOPP sólo, diez en combinación con ABVP, ocho con ABVD y tres con COPP; la cantidad de ciclos de quimioterapia MOPP que recibieron oscila entre 2 y 11 ciclos. El tipo celular de la enfermedad fue variable: ocho individuos presentaron celularidad mixta, ocho esclerosis nodular, dos depleción linfocitaria, tres con predominio linfocítico y de cuatro pacientes no se cuenta con el dato específico. El estadio en el que presentaron la enfermedad al momento del diagnóstico fueron: tres EI, dos EII, diez fueron EIII, seis EIV, uno se identificó como linfoma Hodgkin extranodal no clasificable (NC) y de tres pacientes no se cuenta con el estadio (Tabla 6 a y b).

19 individuos recibieron tratamiento antes de la pubertad (2-10 años de edad, tabla 6a) y seis después de la pubertad (≥ 13 años, tabla 6b). Para incluirse en este estudio fue necesario que los pacientes EH tuvieran por lo menos dos años de haber terminado la terapia antineoplásica; de esta manera el rango de tiempo después del tratamiento al momento del estudio fue de 2 a 20 años después de concluirlo. En ocasiones la terapia anticáncer incluyó radiación: a 17 de los pacientes estudiados les fue aplicada a aorta-bazo o bien supradiafragmática (generalmente en cuello); las dosis aplicadas estuvieron en el rango de los 21.6 a los 60Gy (Tabla 6 a y b).

Tabla 6a. Tratamientos y edad de aplicación

Pacientes tratados en edad pre-puberal (n = 19)

	Paciente	HD Estadio	Inicio	Edad	Después	QUIMIOTERAPIA (ciclos)				RADIOTERAPIA (Gy)			
		Tipo Celular	QT	muestra	de QT	Tratamiento	MOPP	AVBP	COPP	AVBD	Supradiafrag.	P-aorta y bazo	Esperma
1	HD-1	EII A- PL	7a	27a	20a	MOPP	8				No	No	si
2	MOPP-10	EIII A - PL	7a	16a	9a	MOPP	6				30	30	no
3	MOPP-11	no hay exp.		20a		MOPP	11				40	No	si
4	MOPP-41	EIV-EN	8a	24a	16a	MOPP	9				No	No	no
5	MOPP-09	EIV - CM	8a	20a	12a	MOPP/ABVP	8	8			No	No	no
6	MOPP-22	EIII - EN	8a	20a	12a	MOPP/ABVP	4	5			45	30	no
7	MOPP-24	EI - EN	2a	15a	13a	MOPP/ABVP	4	6			20	30	no
8	MOPP-05	NC - DL	6a	19a	13a	MOPP/ABVP	8	5			35	No	si
9	MOPP-07	EIII - CM	8a	20a	12a	MOPP/ABVP	5	4			42	25	si
10	MOPP-12	EIII B - EN	3a	18a	15a	MOPP/ABVP	5	4			60	20	si
11	MOPP-21	EIII - DL	7a	20a	13a	MOPP/ABVP	6	6			No	30	si
12	MOPP-23	EI - CM	6a	19a	13a	MOPP/ABVP	5	1			20	No	si
13	MOPP-20	EIII - CM	9a	18a	9a	MOPP/ABVD	2			8	25	25	no
14	MOPP-28		8 a	17 a	9a	MOPP/ABVD							no
15	MOPP-43	EIII B - EN	10a	20a	10a	MOPP/ABVD	6			6	25	21,6	no
16	MOPP-46		5a	15a	10a	MOPP/ABVD							no
17	MOPP-01	E IV - CM	10a	19a	9a	MOPP/COPP	7		3		No	No	no
18	MOPP-13	EII A - CM	6a	16a	10a	MOPP/COPP	6		1		36	No	no
19	MOPP-15	EIV - EN	7a	17a	10a	MOPP/COPP	8		1		40	40	no

CM= Celularidad Mixta

PL=Predominio Linfocítico

DL= Depleción Linfocitaria

EN=Esclerosis Nodular

Tabla 6b. Tratamientos y edad de aplicación

Pacientes tratados en edad post-puberal (n = 6)

	Paciente	HD Estadio	Inicio	Edad	Después	Tratamiento	QUIMIOTERAPIA (ciclos)				RADIOTERAPIA (Gy)		
		Tipo Celular	QT	muestra	de QT		MOPP	AVBP	COPP	AVBD	Supradiafrag.	P-aorta y bazo	Esperma
1	MOPP-03	EI A- EN	16a	18a	2a	MOPP/ABVP	3	3			40	No	si
2	MOPP-17	EIII - CM	15a	25a	10a	MOPP/ABVP	6	6			No	No	si
3	MOPP-02	EIV B - CM	13a	21a	8a	MOPP/ABVD	2			4	No	25,2	si
4	MOPP-19	EIII-	15a	27a	12a	MOPP/ABVD	6					?	si
5	MOPP-26	EIII A- PL	14 a	16 a	2a	MOPP/ABVD	4				25,2	No	no
6	MOPP-30	EIV - EN	31a	38 a	7a	MOPP/ABVD	4				3	No	no

CM= Celularidad Mixta

DL= Depleción Linfocitaria

PL=Predominio Linfocítico

EN=Esclerosis Nodular

6.3 Calidad de semen.

6.3.1 Individuos sanos.

En las muestras de semen de los individuos sanos, los parámetros analizados de la espermatobioscopía tuvieron valores dentro de lo considerado como normal por la OMS (1999, en 64) (Tabla 7).

Algunos tuvieron volúmenes de eyaculado por debajo del valor normal, sin embargo, no comprometieron la cuenta espermática total debido a que tuvieron densidades celulares altas. En todos ellos los valores de licuefacción, viscosidad y color estuvieron normales. El valor de pH estuvo entre 8 y 8.5 en todos los sujetos. Todos los sujetos sanos mostraron viabilidad espermática mayor al 75%. La progresión de los espermatozoides en 7 donadores fue mayor al 50%, en dos fue menor al 50% y uno tuvo solo 14% de espermatozoides con movimiento progresivo. Nueve individuos presentaron más del 30% de espermatozoides morfológicamente normales, uno tuvo solo el 16% de formas normales. En cuanto a la densidad espermática, el sujeto con menor densidad tuvo 40.62 millones de espermatozoides / ml y la mayor fue de 236 millones de espermatozoides / ml todos ellos dentro del rango normal (Tabla 7).

Tabla 7. Espermatobioscopías en individuos sanos.

PACIENTE	Volúmen		Licuefacción	Color	pH	Viabilidad	Progresión	Morfología	Densidad	Observaciones
	ml	Viscosidad				%	% (A+B)*	% Normales	X 10 ⁶ /ml	
NL01	4,2	nl	completa	amarillento	8,5	83	55	41	77	
NL02	2,6	nl	completa	amarillento	8,5	81	14	47	176	Bacterias
NL03	4,5	nl	completa	amarillento	8	78	53	36	178	
NL04	1,5	nl	completa	amarillento	8,5	93	61	39	114	
NL05	1,8	nl	completa	blanquecino	8,5	96	71	43	215	Bacterias y leucocitos
NL06	5,9	nl	completa	amarillento	8	82	42	16	41	
NL08	3,4	nl	completa	amarillento	8,5	83	64	37	95	Bacterias y leucocitos
NL09	4,5	nl	completa	amarillento	8,5	89	84	52	94	Bacterias
NL11	5	nl	completa	blanquecino	8	80	71	61	236	
NL13	1,1	nl	completa	blanquecino	8,5	77	38	42	97	
OMS	2 a 6	nl -gota	completa	blanquecino amarillento	7.2-8	>60	>50	>30	20-250	

*OMS= A-progresivo rápido, B-progresivo lento, C-movimiento in situ, D-sin movimiento

6.3.2 Pacientes EH.

El análisis de calidad del semen reveló que todos los individuos sobrevivientes a EH independientemente del tratamiento antineoplásico que se les haya aplicado, tuvieron espermatobioscopías con más de dos parámetros anormales (Tablas 8 y 9).

6.3.2.1 Pacientes EH tratados antes de la pubertad.

Dentro de los parámetros macroscópicos: 13 individuos tuvieron volúmenes de eyaculado menores a dos mililitros; siete presentaron viscosidad aumentada; tres mostraron licuefacción incompleta; uno tuvo coloración grisácea del semen. El pH del semen de los pacientes estuvo en un rango de 7 a 10 (Tabla 8).

En cuanto a la densidad espermática: dos individuos tratados antes de la pubertad, tuvieron densidad normal pero presentaron progresión disminuida; cinco fueron oligospermicos severos (10 millones de espermatozoides por mililitro de semen ó menos), de éstos últimos, tres tuvieron densidades menores a un millón de espermatozoides por mililitro, el resto de los sujetos en estudio (12 individuos) fueron azoospermicos (Tabla 8).

De los individuos que tuvieron espermatozoides, dos presentaron viabilidad mayor al 60%, en cuatro estuvo entre el 38 y el 51% y en uno no se logró hacer la evaluación de este parámetro. Sólo uno tuvo progresión espermática mayor al 50%,

Tabla 8. Eespermatobioscopías de pacientes EH tratados antes de la pubertad.

n=19	Paciente	Volúmen				Viabilidad		Progresión	Morfología	Densidad	Observaciones
		ml	Viscosidad	Licuefacción	Color	pH	%	% (A+B)*	% Normales	X 10 ⁶ /ml	
MOPP											
1	HD-1	1,2	nl	completa	blanquecino	8	ND	80	ND	39,5	
2	MOPP-10	1,4	nl	completa	amarillento	8	Az	Az	Az	Az	
3	MOPP-11	1,1	aumentada	completa	blanquecino	8	47	2,5	46,5	10	
4	MOPP-41	0,6	nl	completa	amarillento	7,5	Az	Az	Az	Az	
MOPP/ABVP											
1	MOPP-09	2,9	aumentada	completa	amarillento	8,5	Az	Az	Az	Az	
2	MOPP-22	1,8	nl	incompleta	amarillento	8,5	Az	Az	Az	Az	
3	MOPP-24	1,2	nl	incompleta	amarillento	8	Az	Az	Az	Az	
4	MOPP-05	5,4	nl	completa	blanquecino	7	38	34,3	12,5	0,75	Proteínas, bacterias
5	MOPP-07	2,4	nl	completa	amarillento	8	51	26,66	36	72,25	Bacterias
6	MOPP-12	3,4	nl	completa	blanquecino	8,5	39	33,3	44	0,75	
7	MOPP-21	4	nl	completa	amarillento	8	86,6	0	39,2	0,04375	Bacterias, leucocitos
8	MOPP-23	0,8	nl	completa	blanquecino	8	83	30	35,5	7,5	
MOPP/ABVD											
1	MOPP-20	1,1	aumentada	completa	amarillento	8,5	Az	Az	Az	Az	Bacterias
2	MOPP-28	0,5	aumentada	completa	blanquecino	8,5	Az	Az	Az	Az	Bacterias, detritus, leucos
3	MOPP-43	1,5	nl	completa	blanquecino	8	Az	Az	Az	Az	
4	MOPP-46	1,1	aumentada	incompleta	blanquecino	8	Az	Az	Az	Az	
MOPP/COPP											
1	MOPP-01	2,2	nl	completa	grisáceo	10	Az	Az	Az	Az	Bacterias. detritus, leucos
2	MOPP-13	1,2	aumentada	completa	blanquecino	8,5	Az	Az	Az	Az	
3	MOPP-15	1,9	aumentada	completa	amarillento	8,5	Az	Az	Az	Az	Bacterias, detritus.
OMS		2 a 6	nl -gota	completa	blanquecino	7,2	>60	>50	>30	20-250	
					amarillento	8					

*OMS= A-progresivo rápido, B-progresivo lento, C-movimiento in situ, D-sin movimiento

Az = Azoospermico

ND = No Determinado

los otros seis mostraron movilidad progresiva disminuida y sólo 5 pacientes presentaron más del 30% de formas normales (Tabla 8).

6.3.2.2 Pacientes EH tratados después de la pubertad.

Las muestras de semen de los seis sujetos de este grupo tuvieron volumen y color normal. Dos de ellos presentaron viscosidad aumentada así como licuefacción incompleta. El pH entre los individuos de este grupo osciló entre 7 y 8.5 (Tabla 9).

Dos de estos pacientes fueron azoospermicos, uno presentó densidad espermática menor a 3 millones por mililitro, otro menor a un millón (oligospermicos severos) y los dos restantes tuvieron densidades normales de 42 y 130 millones de espermatozoides / ml respectivamente (Tabla 9).

A los dos individuos oligospermicos de este grupo no se les pudo realizar la evaluación de viabilidad celular ni de morfología espermática. Los otros dos pacientes con espermatozoides tuvieron alrededor del 70% de viabilidad; uno tuvo 40.5 y otro 15% de formas normales. El rango de movimiento progresivo que se encontró en estos sujetos fue del 16 a 52% (Tabla 9).

Tabla 9. Espermatobioscopías de pacientes EH tratados después de la pubertad.

n=6	Paciente	Volúmen ml	Viscosidad	Licuefacción	Color	pH	Viabilidad %	Progresión % (A+B)*	Morfología % Normales	Densidad X 10 ⁶ /ml	Observaciones
MOPP/ABVP											
1	MOPP-03	3,5	aumentada	incompleta	amarillento	7	70	23,3	15	42	bacterias
2	MOPP-17	3	nl	completa	blanquecino	8,5	ND	16	ND	2,8	bacterias
MOPP/ABVD											
1	MOPP-02	2,2	nl	completa	blanquecino	8	ND	52	ND	0,0021	bacterias, detritus
2	MOPP-19	2,4	nl	completa	amarillento	8	68,5	25,6	40,5	130	
3	MOPP-26	2,1	aumentada	incompleta	blanquecino	8	Az	Az	Az	Az	detri, epit, tejidos, leucos
4	MOPP-30	2,5	nl	completa	blanquecino	8,5	Az	Az	Az	Az	
OMS		2 a 6	nl -gota	completa	blanquecino amarillento	7,2 8	>60	>50	>30	20-250	

*OMS= A-progresivo rápido, B-progresivo lento, C-movimiento in situ, D-sin movimiento

Az = Azoospermico

ND = No Determinado

6.4 Aneuploidías en espermatozoides.

Se determinaron las aneuploidías para los autosomas 18 y 21 así como para los sexocromosomas X y Y. Se consideraron disomías, nulisomías, espermatozoides diploides así como la pérdida/ganancia de algún cromosoma en espermatozoides diploides y cualquier otro tipo de alteración cromosómica numérica (Figuras 2 y 3).

6.4.1 Individuos Sanos.

Los individuos sanos mostraron una frecuencia de aneuploidías para el cromosoma 21 (13/10000) significativamente mayor que la encontrada para el cromosoma 18 (2/10000) ($p < 0.001$). Las nulisomías del cromosoma 21 encontradas fueron el doble que las disomías (nul=9, dis=4); mientras que para el cromosoma 18 se encontraron las mismas frecuencias de disomías que de nulisomías (dis=1; nul=1) (Tabla 10).

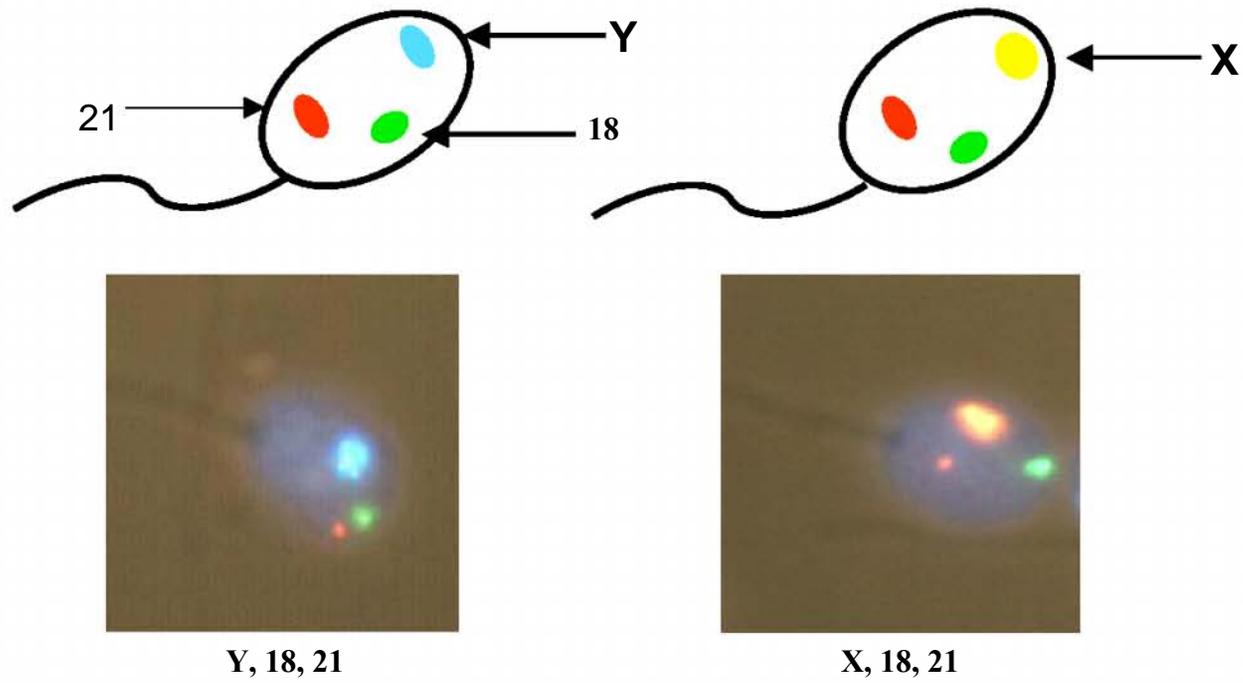
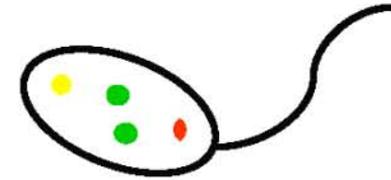
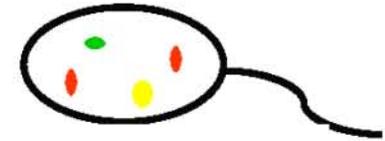


Figura 2. Fenotipos fluorescentes en espermatozoides normales.

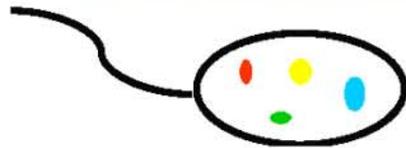
Anormalidades Numéricas *		Fenotipo fluorescente	Producto de fecundación con óvulo normal
Hiperhaploidía de autosomas	Disomía 18	X 18 18 21 Y 18 18 21	Síndrome de Edwards
	Disomía 21	X 18 21 21 Y 18 21 21	Síndrome de Down
Hiperhaploidía de sexocromosomas	Meiosis I	X Y 18 21	Síndrome de Klinefelter
	Meiosis II	X X 18 21 Y Y 18 21	Síndrome 47, XXX Síndrome 47, XYY
Diploidía	Meiosis I	X Y 18 18 21 21	No Viable
	Meiosis II	X X 18 18 21 21 Y Y 18 18 21 21	
Nulisomía		18 21	Síndrome de Turner



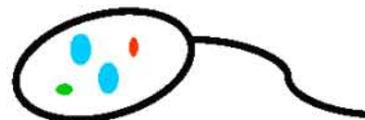
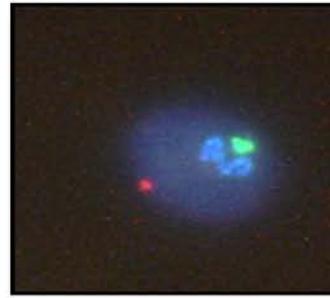
Disomía 18



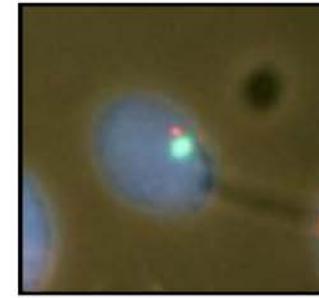
Disomía 21



Disomía XY



Disomía Y



Nulisomía de sexocromosomas

Figura 3. Anormalidades cromosómicas posibles de detectar con el ensayo X Y 18 21.

* En este cuadro no se consideraron las alteraciones complejas por ser un gran número.

Tabla 10. Aneuploidías de autosomas en espermatozoides de individuos sanos.

CODIGO	Dis 18	Nul 18	Aneupl. 18	Dis 21	Nul 21	Aneupl. 21	Aneupl. Autosomas
NL01	0	2	2	3	7	10	12
NL02	0	0	0	4	10	14	14
NL03	0	1	1	7	22	29	30
NL04	0	0	0	4	8	12	12
NL05	3	3	6	8	10	18	24
NL06	1	1	2	2	6	8	10
NL08	3	0	3	10	7	17	20
NL09	2	0	2	0	7	7	9
NL11	1	0	1	3	6	9	10
NL13	1	1	2	4	5	9	11
X ± DE	1 ± 1	1 ± 1	2 ± 2	4 ± 3	9 ± 5	13 ± 7	15 ± 7
Err Std.	0.4	0.3	1	1	2	2	2

Frecuencia de aneuploidía en 10 000 espermatozoides.

En cuanto a los cromosomas sexuales, todos los individuos sanos presentaron tanto disomías como nulisomías, sin haber diferencia estadística entre estos tipos de alteraciones. La nulisomía de cromosoma sexual fue la alteración que mostró una frecuencia mayor, 14 por cada 10 mil espermatozoides analizados. Las disomías producidas por un error tipo MI (Dis XY) tuvieron una frecuencia de 4, mientras que las producidas por error tipo MII (Dis XX ó YY) presentaron una frecuencia de 2 (Tabla 11).

En los testigos, fueron más frecuentes las diploidías producidas en MI que aquellas producidas en MII. Sólo un sujeto (NL-06) presentó una elevada frecuencia de espermatozoides diploides producidos por error tipo M II, el resto de los sujetos sanos mostraron bajas frecuencias de células diploides (Tabla 12).

En los testigos se encontraron las siguientes células con alteraciones complejas, que involucran más de un evento (Tabla 13):

NL01 : Y 18 21 21 21 [1]

NL02 : Y Y Y 18 21 [1], X Y Y 18 18 21 21 [1]

NL04 : X 18 18 21 21 [1] , X Y 18 18 21 21 21 [1]

NL05 : Y 18 18 21 21 [3]

NL06 : X Y 18 18 21 [1]

NL08 : Y 18 18 21 21 [1]

NL09 : Y Y 18 21 21 [1], X X Y 18 21 [1]

NL11 : 0 0 18 18 21 21 [1]

La frecuencia total de células con anomalía cromosómica encontrada en los sujetos testigo fue de 41 células en 10 000 (Tabla 13).

Tabla 11. Aneuploidías de sexocromosomas en espermatozoides de individuos sanos.

CODIGO	Dis XX+YY	Dis XY	Nulisomía Sexual	Aneupl. Sexuales
NL01	2	4	10	16
NL02	2	2	4	8
NL03	2	7	13	22
NL04	0	7	19	26
NL05	5	4	13	22
NL06	0	3	14	17
NL08	3	3	9	15
NL09	5	7	34	46
NL11	3	0	13	16
NL13	2	4	10	16
X ± DE	2 ± 2	4 ± 2	14 ± 8	20 ± 10
Err Std	1	1	3	3

Frecuencia de aneuploidía en 10 000 espermatozoides.

Tabla 12. Diploidías en espermatozoides de individuos sanos.

CODIGO	Diploide MI	Diploide MII	Total Diploides
NL01	2	0	2
NL02	2	1	3
NL03	2	0	2
NL04	6	1	7
NL05	5	0	5
NL06	0	1	1
NL08	5	9	14
NL09	1	2	3
NL11	4	0	4
NL13	4	1	5
X ± DE	3 ± 2	1 ± 3	5 ± 4
Err. Std	1	1	1

Frecuencia de aneuploidía en 10 000 espermatozoides.

Tabla 13. Anormalidades totales en espermatozoides de individuos sanos.

CODIGO	Aneuploidías Autosomas	Aneuploidías Sexuales	Total Diploides	Alteraciones complejas	Total Anormales
NL01	12	16	2	1	31
NL02	14	8	3	2	27
NL03	30	22	2	0	54
NL04	12	26	7	2	47
NL05	24	22	5	3	54
NL06	10	17	1	2	30
NL08	20	15	14	1	50
NL09	9	46	3	2	60
NL11	10	16	4	1	31
NL13	11	16	5	0	32
X ± DE	15 ± 7	20 ± 10	5 ± 4	1 ± 1	41 ± 12
Err. Std.	2	3	1	0.3	4

Frecuencia de aneuploidía en 10 000 espermatozoides.

6.4.2 Pacientes EH tratados antes de la pubertad.

En los pacientes EH tratados con quimioterapia antes de la pubertad se encontró una elevada frecuencia de espermatozoides con ganancia ó pérdida del cromosoma 21 significativamente mayor que las aneuploidías del cromosoma 18 ($p < 0.01$). Al igual que en los sujetos control, la nulisomía para el cromosoma 21 tuvo una frecuencia significativamente mayor que la disomía para el mismo (nul=12; dis=3; $p < 0.05$) y también fueron más los espermatozoides que tuvieron ganancia del cromosoma 18 que aquellos que tuvieron pérdida (dis=2; nul=1; $p = 0.2$) (Tabla 14).

Estos individuos presentaron frecuencias de aneuploidías para los cromosomas sexuales similares a las encontradas en los individuos sanos para disomías XX/YY, XY, (2 y 4 para sanos y 3 y 4 para tratados antes de la pubertad; $p > 0.2$). Las nulisomías de sexocromosomas fueron ligeramente mayores a las mostradas en los testigos (14 sanos, 16 tratados; $p > 0.05$) (Tabla 15).

Se encontraron 4 células germinales diploides en 10,000 en este grupo de pacientes (Tabla 16), mientras que en sanos la frecuencia fue de 5 en 10mil.

Las aneuploidías catalogadas como alteraciones complejas porque involucran más de un evento, encontradas en este grupo fueron (Tabla 17):

HD-1 : 0 18 0 [1]

MOPP11 : Y 18 18 21 21 [2]

MOPP07 : X Y 18 21 21 [1] , X X Y Y 18 18 21 21 [1].

MOPP21 : X X 18 0 [1]

MOPP12 : X Y 18 21 21 [1]

MOPP23 : X Y 18 21 21 [2]

La frecuencia de aneuploidías totales, que es la suma de todas las alteraciones encontradas fue de 47 en 10 000, esta frecuencia no es diferente a la encontrada en los espermatozoides de los individuos sanos la cual fue de 41 en 10,000 ($p=0.3$) (Tabla 17).

Tabla 14. Aneuploidías de autosomas en espermatozoides de individuos EH tratados antes de la pubertad

CODIGO	Dis 18	Nul 18	Aneupl. 18	Dis 21	Nul 21	Aneupl 21	Aneuploidía Autosomas
HD-1	5	1	6	4	21	25	31
MOPP-11	1	1	2	5	14	19	21
MOPP-07	1	1	2	2	10	12	14
MOPP-21	2	0	2	5	15	20	22
MOPP-12	0	0	0	1	6	6.9	7
MOPP-23	1	1	2	4	4	8	10
X ± DS	2 ± 2	1 ± 1	2 ± 2	3 ± 2	12 ± 6	15 ± 7	17 ± 9
Err Std	1	0.2	1	1	3	3	4

Frecuencia de aneuploidía en 10 000 espermatozoides.

Tabla 15. Aneuploidías de sexocromosomas en espermatozoides de individuos EH tratados antes de la pubertad.

CODIGO	Dis XX+YY	Dis XY	Nulisomía Sexual	Aneupl. Sexuales
HD-1	4	2	13	19
MOPP-11	2	6	14	22
MOPP-07	5	3	17	25
MOPP-21	3	2	13	18
MOPP-12	2	2	22	26
MOPP-23	4	11	20	35
X ± DS	3 ± 1	4 ± 4	16 ± 4	24 ± 6
Err. Std	0.5	1	1.5	3

Frecuencia de aneuploidía en 10 000 espermatozoides.

Tabla 16. Diploidías en espermatozoides de individuos EH tratados antes de la pubertad.

CODIGO	Diploide MI	Diploide MII	Total Diploides
HD-1	1	0	1
MOPP-11	7	1	8
MOPP-07	0	0	0
MOPP-21	2	0	2
MOPP-12	5	0	5
MOPP-23	4	6	10
X ± DS	3 ± 3	1 ± 2	4 ± 4
Err Std	1	1	2

Frecuencia de aneuploidía en 10 000 espermatozoides.

**Tabla 17. Anormalidades en espermatozoides de individuos
EH tratados antes de la pubertad**

CODIGO	Aneuploidías Autosomas	Aneuploidías Sexuales	Total Diploides	Alteraciones complejas	Total Anormales
HD-1	31	19	1	1	52
MOPP-11	21	22	8	2	53
MOPP-07	14	25	0	1	40
MOPP-21	21	18	2	2	43
MOPP-12	7	26	5	1	39
MOPP-23	10	35	10	2	57
X ± DS	17 ± 9	24 ± 6	4 ± 4	1 ± 0.5	47 ± 8
Err Std	4	3	2	0.2	3

Frecuencia de aneuploidía en 10 000 espermatozoides.

6.4.3 Pacientes EH tratados después de la pubertad.

Los individuos EH tratados después de la pubertad mostraron una mayor frecuencia de aneuploidías para el cromosoma 21 con respecto a aquellas en las que se involucra a el cromosoma 18 con diferencia estadísticamente significativa con $p < 0.01$; sin embargo, la desviación estándar en este grupo es muy elevada ya que dos de los individuos mostraron una alta frecuencia de células aneuploides para el 21 (MOPP03=16 y MOPP17=30), un tercer integrante de este grupo presentó pocas células aneuploides (MOPP19=5) y el cuarto no mostró ningún espermatozoide con ganancia o pérdida de este cromosoma (Tabla 18).

En cuanto a las alteraciones numéricas de los sexocromosomas, los pacientes EH tratados después de la pubertad mostraron frecuencias significativamente elevadas de disomías XY con respecto a los individuos sanos ($p < 0.05$) y con respecto a los tratados antes de la pubertad, sin embargo con este grupo la diferencia estadística quedó en el límite: $p = 0.05$. La falta de cromosoma sexual también se presentó con altas frecuencias pero no fueron significativamente diferentes a las encontradas en los demás grupos estudiados La frecuencia total de aneuploidías para los cromosomas sexuales encontrada en este grupo no fue diferente a las halladas en los sujetos sanos ni en los pacientes tratados antes de la pubertad (Tabla 19).

Tabla 18. Aneuploidías de autosomas en espermatozoides de individuos EH tratados después de la pubertad.

CODIGO	Dis 18	Nul 18	Aneupl. 18	Dis 21	Nul 21	Aneupl. 21	Aneuploidía Autosomas
MOPP-03	3	6	9	9	7	16	25
MOPP-17	0	2	2	17	13	30	32
MOPP-02	2	0	2	0	0	0	2
MOPP-19	1	1	3	1	4	5	8
X ± DE	1 ± 1	2 ± 3	4 ± 3	7 ± 8	6 ± 5	13 ± 13	17 ± 14
Err Std	1	1	2	4	3	7	7

Frecuencia de aneuploidía en 10 000 espermatozoides.

Tabla 19. Aneuploidías de sexocromosomas en espermatozoides de individuos EH tratados después de la pubertad.

CODIGO	Dis XX+YY	Dis XY	Nulisomía Sexual	Aneuploidía Sexuales
MOPP-03	1	12	20	33
MOPP-17	6	16	17	39
MOPP-02	2	14	9	25
MOPP-19	3	3	5	11
X ± DE	3 ± 2	11 ± 6	13 ± 7	27 ± 13
Err Std	1	3	4	6

Frecuencia de aneuploidía en 10 000 espermatozoides.

Las diploidías en los espermatozoides de estos individuos se presentaron con mayor frecuencia que en el resto de los grupos pero no hubo diferencia estadística. En este grupo también se observó una tendencia a presentar mayor cantidad de células diploides producidas por error tipo MI (Tabla 20).

Las aneuploidías complejas que se encontraron en los sujetos de este grupo fueron:

MOPP03 : Y 18 18 21 21 [2], 0 18 0 [1] .

MOPP17 : Estructural Y 18 21, X Y 18 21 21 [1] , X 0 0 [1].

MOPP02 : X Y 18 18 21 [1], X Y 18 21 21 [1] , X 0 0 [1], Y 18 18 21 21 [1],
X 18 18 21 21 [1] .

MOPP19 : Y 18 18 21 21 [1], Y Y 18 21 21 [1] .

Al comparar las alteraciones complejas encontradas en los pacientes tratados después de la pubertad con las de los individuos sanos y con los tratados antes de la pubertad, existen diferencias estadísticamente significativas con $p \leq 0.05$ (U de Mann-Whitney, Tablas 21 y 22). La frecuencia total de células anormales para este grupo fue la mayor encontrada en este estudio: 54/10,000 (Tabla 21) sin embargo debido al amplio rango de variabilidad entre los individuos, no fue diferente con respecto a la encontrada en los pacientes tratados antes de la pubertad (47; $p=0.6$) ni en los individuos sanos (41; $p=0.4$; U de Mann-Whitney) (Tabla 22).

Tabla 20. Diploidías en espermatozoides de individuos EH tratados después de la pubertad.

CODIGO	Diploide MI	Diploide MII	Total Diploides
MOPP-03	5	0	5
MOPP-17	7	4	11
MOPP-02	4	1	5
MOPP-19	3	1	4
$X \pm DE$	5 ± 2	1 ± 2	6 ± 3
Err Std	1	1	2

Frecuencia de aneuploidía en 10 000 espermatozoides.

Tabla 21. Anormalidades en espermatozoides de individuos EH tratados después de la pubertad.

CODIGO	Aneuploidías Autosomas	Aneuploidias Sexuales	Total Diploides	Alteraciones complejas	Total Anormales
MOPP-03	25	33	5	3	66
MOPP-17	32	39	11	8	90
MOPP-02	2	25	5	5	37
MOPP-19	8	10	4	1	23
X ± SD	17 ± 14	27 ± 13	6 ± 3	4 ± 3	54 ± 30
Err Std.	7	6	2	1	15

Frecuencia de aneuploidía en 10 000 espermatozoides.

Tabla 22. Anormalidades cromosómicas en espermatozoides de los tres grupos de estudio.

GRUPO	Aneuploidías Autosomas	Aneuploidias Sexuales	Células Diploides	Alteraciones complejas	Total Anormales
Sanos	15 ± 7	20 ± 10	5 ± 4	1 ± 1	41 ± 12
Tratados antes de la pubertad	17 ± 9	24 ± 6	4 ± 4	1 ± 0.5	47 ± 8
Tratados después de la pubertad	17 ± 14	27 ± 13	6 ± 3	4 ± 3*	54 ± 30

Promedios de frecuencia en 10,000 ± Desviación Estándar.

*diferencia significativa con respecto a los sujetos normales $p=0.03$ y con respecto a los tratados antes de la pubertad $p=0.05$ (U de Mann-Whitney).

6.5 Clonas de células aneuploides.

En citogenética de células somáticas, se considera clona celular aquella alteración cromosómica que se presenta en 2 o más células, si la alteración es la falta de un cromosoma, deberá presentarse en 3 o más células (66), sin embargo, debido a que en esta definición no se consideran células haploides, se tomó como valor de corte el promedio más dos desviaciones estándar de las frecuencias mostradas en la población de referencia. Cuando una misma alteración cromosómica superaba este valor de corte, se consideró como clona.

Así, se localizaron 1/6 pacientes tratados antes de la pubertad, con una clona celular con disomía XY (MOPP23) y 3/4 individuos tratados después de la pubertad con clonas portadoras de disomía XY (MOPP03, MOPP02 y MOPP17) y uno de éstos últimos además mostró una clona con disomía 21 (MOPP17) (Tabla 23).

Tabla 23. Clonas celulares detectadas entre los individuos analizados con FISH multicolor.

	Dis XY	Dis 21
SANOS X ± DE	4 ± 2	4 ± 3
MOPP/ABVP Pre		
MOPP23	11	
MOPP/ABVP Post		
MOPP03	12	
MOPP17	16	17
MOPP02	14	

Frecuencia de aneuploidías por 10000 células analizadas.

7. DISCUSIÓN

7.1 Antecedentes Personales.

De acuerdo al cuestionario general, los individuos sanos tuvieron un rango de edad de 18 a 24 años. Cuatro fuman, sin embargo la calidad de semen y frecuencia de aneuploidías de sus espermatozoides no fueron diferentes a las del resto de los sujetos testigo. Todos estuvieron libres de cualquier enfermedad al momento de la donación de la muestra y sin haber tomado ningún medicamento.

Los pacientes EH al momento de la toma de la muestra tuvieron un rango de 15 a 38 años de edad. Tres fuman, uno de ellos alrededor de 10 cigarros al día, en este paciente no se analizaron las aneuploidías con el ensayo de FISH porque presentó una cuenta espermática muy baja (menos de un millón de espermatozoides por mililitro), y a pesar de realizar grandes esfuerzos para concentrar y limpiar de restos celulares la muestra, no se pudo llevar a cabo el análisis de los espermatozoides. Existen varios trabajos que evalúan la calidad del semen en individuos fumadores por antecedentes de daño genotóxico, los dividen en fumadores de <10 cigarros y de >10 cigarros; en ninguno de los grupos se encontró que el hábito de fumar afectara la calidad del semen tomando en cuenta parámetros como densidad, movilidad y porcentaje de formas anormales (52, 67, 68). Con estos antecedentes se puede descartar la posibilidad de que en este paciente el hábito de fumar sea el responsable de la mala calidad de semen que

tuvo, por lo que es probable que esto sea una consecuencia del tratamiento antineoplásico que recibió.

En este estudio más del 70%, de los pacientes que fueron tratados con RT desarrollaron hipotiroidismo ($p < 0.01$) el cual controlan con levotiroxina. Esta disfunción tiroidea es una consecuencia común en pacientes EH que reciben RT, esta reportado que alrededor del 30% de los pacientes EH que recibieron RT desarrollan hipotiroidismo o tiroiditis aproximadamente después de seis años de haber concluido el tratamiento (18, 69, 70). Al comparar la calidad de semen de los pacientes con esta disfunción con respecto a los que no desarrollaron problemas tiroideos, no se encontraron diferencias significativas.

7.2 Calidad de Semen.

7.2.1 Individuos Sanos.

Los individuos sanos tuvieron muestras de semen con parámetros normales; a pesar de que algunos individuos mostraron volúmenes ligeramente menores a 2ml, la densidad espermática final no se vio afectada. Algunos de ellos tuvieron pH elevado (ej 8.5) sin embargo, al parecer esto no interfirió en la movilidad ni en la viabilidad de los espermatozoides en estas muestras.

7.2.2 Efecto de la quimioterapia MOPP sobre la calidad de semen.

A pesar de que los rangos que proporciona la Organización Mundial de la Salud para considerar como normal una muestra de semen son amplios (71), 21/25 (84%) individuos con EH tratados con esquemas antineoplásicos tuvieron por lo menos dos parámetros anormales, solo 11 (44%) tuvieron espermatozoides aunque de éstos 7 fueron oligospermicos severos (menos de un millón por mililitro) y 4 (16%) tienen densidad espermática normal. Se sabe que la mayoría de las sustancias aplicadas en los esquemas anticancerígenos, así como la radioterapia, son citotóxicos. Existen trabajos realizados en ratón, en donde se ha comprobado el efecto citotóxico de estos agentes sobre la espermatogénesis (20, 72).

Si bien no hay evidencias de que las dosis terapéuticas de los agentes antineoplásicos causen daño a células somáticas gonadales, las cuales influyen

en la producción de cuentas bajas espermáticas (73), es posible que en estos pacientes la mala calidad de semen encontrada se deba a dos razones principales: daño causado en células germinales y/o afección en células somáticas.

Cuando se irradian los testículos, se sabe que el impacto de la RT en la función testicular depende directamente de la edad a la que la recibe el paciente; particularmente se sabe que la radiación terapéutica afecta más las funciones de las células de Leydig en varones prepúberes que en adolescentes (36, 69). La RT aplicada a los pacientes en este trabajo fue en las regiones involucradas, ninguno de ellos recibió RT en la región inguinal o genital. En el Instituto Nacional de Pediatría al momento de aplicar la radiación, se cubre con delantales de plomo a los pacientes para no exponer a radiación tejidos libres de cáncer ó zonas genitales, con esto se evita al máximo la exposición de las células madre productoras de espermatozoides a la radiación; esto concuerda con el hecho de que no encontramos correlación entre la producción espermática y la aplicación o no de radiación ($p = 0.4$), sin embargo, no podemos descartar que ésta influya en la disfunción gonadal por daño producido a células somáticas.

Los grupos de pacientes estudiados en este trabajo (antes y después de la pubertad) mostraron una calidad de semen disminuida como consecuencia del tratamiento, sin embargo no se vio un grupo más afectado que otro, esto último rechaza al menos parcialmente nuestra hipótesis ya que nuestra propuesta fue que habría diferencias en cuanto a la citotoxicidad que producen estos

tratamientos cuando se aplican antes ó después de la pubertad y encontramos que el efecto citotóxico fue el mismo para ambos estados del desarrollo puberal.

En nuestros resultados no encontramos correlación entre la dosis de tratamiento recibida y la duración de la azoospermia sin embargo, existen trabajos con poblaciones de estudio tratados con MOPP y/o ABVD en donde analizan a los pacientes de acuerdo a la cantidad de ciclos de QT recibidos y encuentran una relación directa entre la disminución de la densidad espermática y el número de ciclos de MOPP recibidos, uno de estos trabajos (37) separa a su población de estudio en pacientes que reciben 3 o menos ciclos de MOPP y los que recibieron más de 6 ciclos; ellos encontraron que en los pacientes que recibieron menos ciclos de QT, se redujo la cuenta espermática considerablemente, y aquellos sujetos que recibieron más de 6 ciclos desarrollan azoospermia (27, 37, 38). En nuestra población de estudio encontramos pacientes azoospermicos y con espermatozoides tanto en los pacientes que recibieron <6 ciclos de MOPP como en aquellos que recibieron ≥ 6 ciclos y al contrastarlos no encontramos diferencias estadísticas entre ambos grupos. Observamos que existen individuos que 18 años después de haber recibido <6 ciclos de MOPP continúan azoospermicos y otros con cuentas menores a un millón de espermatozoides por mililitro sin mostrar recuperación a lo largo del tiempo; por otro lado también hubo un paciente con ≥ 6 ciclos de MOPP que aún 16 años después de concluido el tratamiento continúa azoospermico, mientras que dos con 20 años en remisión tienen cuenta espermática normal.

Se sabe que la dacarbazina (D), es un clastógeno para células germinales y somáticas de ratón (73), además de la mecloretamina (M) y la procarbazona (P) y que este daño al DNA puede producir muerte celular. Entre los pacientes tratados después de la pubertad hay individuos con 2 esquemas de QT diferentes: MOPP/ABV**Dacarbazina** y MOPP/ABV**Prednisona**; por lo que se buscó si existía una correlación entre estos dos esquemas y la presencia/ausencia de espermatozoides, sin importar la edad a la que recibieron el tratamiento. El 75% de los pacientes que recibieron M, P y además D (MOPP/ABVD) son azoospermicos, sin embargo esto no fue estadísticamente significativo.

En este trabajo fue claro el hecho de que la quimioterapia MOPP redujo o nulificó la producción espermática en mas del 80% de los pacientes estudiados. Este esquema de tratamiento contiene agentes que se sabe causan daño directo al ADN y producen mutaciones que generan daño celular letal en las células madre: la Mecloretamina (mostaza nitrogenada) es un agente que produce mutaciones letales en estados post-meióticos y en espermatozoides, no así en células madre (20). En este estudio las muestras analizadas no están expresando el daño producido por este agente ya que no llega a las células madre y las que se afectaron al momento del tratamiento ya no están en las muestras estudiadas.

Está reportado que la Procarbazona es la única de los componentes de esta mezcla, que se sabe afecta de manera directa al ADN de células germinales progenitoras (espermatogonias) lo que produce un daño duradero a largo plazo

manifestado como falla en la espermatogénesis con la consecuente reducción en la densidad espermática, este daño es difícil de revertir incluso años después del tratamiento. Esto puede resultar de la muerte de espermatogonias o bien en daño producido a los mecanismos parácrinos que mantienen y estimulan la diferenciación de todo el linaje de células germinales (74).

En cuanto a las células somáticas, se ha reportado que los niños que reciben QT como único tratamiento tienen un desarrollo puberal y función de células de Leydig normales, sin embargo, se sabe que el epitelio germinal es sensible a agentes quimioterapéuticos y en general se piensa que los testículos púberes son los más vulnerables (36, 75).

Se ha documentado que la exposición de las células de Sertoli a este tipo de agentes afecta a la producción de FSH debido básicamente a la pérdida de células germinales aledañas por daño citotóxico (72). Por otra parte, existen reportes que mencionan que el aplicar radiación en regiones como cerebro, cabeza y cuello produce daño al eje hipotálamo-hipofisis-gónada, este tipo de daño es difícil evaluar ya que los efectos se desarrollan gradualmente y además este eje puede afectarse en varios de sus componentes (36). Para conocer más acerca de la afección somática de estos tratamientos es necesario conocer los niveles hormonales del paciente al momento de la realización del estudio.

Finalmente en este trabajo es probable que la alteración en la producción espermática sea una consecuencia de la exposición de las células madre

germinales a la Procarbazona y no tanto al resto de los componentes de la mezcla antineoplásica; en niños y hombres jóvenes con EH tratados con un régimen antineoplásico que contiene procarbazona se observó que la mayoría presentan azoospermia después del tratamiento, es por eso que actualmente se buscan tratamientos sin este compuesto, que sean antineoplásicos igual o más efectivos, pero menos gonadotóxicos para alterar lo menos posible su futura fertilidad (27, 36, 37, 40, 43, 75, 76, 77, 78, 79).

7.2.3 Efecto de la edad al tratamiento sobre la calidad de semen.

En un estudio realizado por Chemes y colaboradores se encontró que el epitelio germinal tiene cierto grado de actividad mitótica e incluso meiótica en la infancia temprana, por lo que el pensar en un epitelio germinal no proliferativo por ser prepuber, no aplica en edades tempranas, por esto la exposición a agentes genotóxicos en varones en este momento del desarrollo causaría daño en espermatogonias y células de Sertoli en división activa, sin embargo, estos autores postulan que la mayoría de las células dañadas se reabsorberán o no concluirán la espermatogénesis, de manera que los espermatozoides inmaduros se eliminarán en las primeras oleadas de espermatozoides producidos una vez iniciada la pubertad (80).

La mayoría de los estudios que evalúan las consecuencias citotóxicas en varones tratados con QT se llevan a cabo en sujetos que fueron tratados contra cáncer en la edad adulta; se ha postulado que los varones tratados antes de la pubertad

tienen cierta protección ante el daño gonadal que pudiera producir la QT (79, 81), no obstante, en nuestro estudio encontramos que el 84% de los pacientes tratados antes de la pubertad tuvieron daño gonadal severo representado por azoospermia y oligospermia severa.

Al comparar las espermatobioscopías, los pacientes tratados antes de la pubertad no fueron estadísticamente diferentes a los pacientes tratados después de la misma. Aunque mas de la mitad de los sujetos tratados antes de la pubertad fueron azoospérmicos, no encontramos diferencia estadística entre la edad a la que recibieron la QT y la presencia o ausencia de espermatozoides en el semen (Tabla 8). Esto es compatible con estudios recientes que han evaluado la disfunción gonadal en estos sujetos y se ha visto que existe daño severo en individuos que recibieron tratamiento quimioterapéutico en la niñez y que éste puede durar muchos años o incluso ser irreversible después de terminados los tratamientos (40, 75, 76, 77, 78).

En este trabajo encontramos que aún 16 años después de haber terminado el tratamiento los pacientes EH no recuperan la espermatogénesis. Reportes previos mencionan que la recuperación de la espermatogénesis puede observarse tan rápido como en los primeros cinco años posteriores al tratamiento, o tan lento como 20 años después (38, 40, 41, 43, 82); aunque está reportado que sólo del 20 al 40% de los pacientes tratados que presentan azoospermia u oligospermia recuperan su fertilidad (38, 39).

En cualquier caso, el que tengan espermatozoides temprana o tardíamente con respecto al tratamiento, es importante tomar en cuenta que sus gametos pueden estar genéticamente alterados a consecuencia del tratamiento antineoplásico.

7.3 Aneuploidías en espermatozoides.

En nuestro estudio se obtuvo una eficiencia de hibridación para el ensayo de FISH del 99%. Los criterios para el análisis se siguieron de manera muy estricta y siempre se consideró a un segundo y en ocasiones a un tercer observador para dar mayor certeza y validez al análisis, de manera que en este aspecto el margen de error es mínimo.

7.3.1 Individuos sanos.

Se analizaron las aneuploidías para los cromosomas X, Y 18 y 21 en 10 individuos sanos. Los porcentajes de espermatozoides con cromosoma X ó Y corresponde a la proporción esperada de 50:50 según lo reportado por múltiples autores (44, 59, 82, 83, 84, 85, 86).

La frecuencia total de aneuploidías que encontramos para este grupo es semejante a lo reportado por Frias y colaboradores (59) con este mismo ensayo en sujetos sanos.

Al analizar los autosomas de manera independiente se encontró que el cromosoma 21 tiene frecuencias de aneuploidía por lo menos dos veces mayores que la encontradas para el cromosoma 18 en estos mismos individuos, con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$); ésta elevada frecuencia de aneuploidías en este cromosoma ha sido reportado previamente por varios autores, en trabajos en donde analizan los cariotipos de espermatozoides

humanos obtenidos mediante fusión gamética hámster-humano en individuos sanos (44, 83, 85, 87). Ellos encontraron frecuencias de aneuploidías elevadas para los cromosomas pertenecientes al grupo G (21 y 22), en comparación con el resto de los autosomas.

Se ha postulado que las características morfológicas del cromosoma 21, como el tamaño, la región de organización nucleolar y las regiones heterocromáticas, sean las que lo hagan más susceptible a la no disyunción. En una revisión realizada por Guttenbach y colaboradores en 1997, se demostró que ni el tamaño ni la región organizadora nucleolar son factores responsables de la frecuencia elevada de hiperhaploidías del cromosoma 21; sin embargo no se puede excluir que los grandes bloques de heterocromatina pericentromérica influyan en la no disyunción meiótica masculina de este cromosoma (88).

Por otra parte, algunas características del ensayo de FISH multicolor que se utilizó en este estudio pueden ser factores importantes para estos resultados: el tipo de sonda para detectar el cromosoma 21 (secuencia única en posición distal); los criterios de análisis aplicados para su lectura, ya que puede haber una ganancia aparente de señales fluorescentes debido a rupturas cromosómicas que aparten la región blanco del resto del cromosoma y que durante la meiosis el fragmento con la señal se quede en la misma célula que el cromosoma 21 normal, esto se vería como dos dominios fluorescentes y se puede registrar como una célula disómica completa, la cual correspondería en realidad a una aneuploidía segmental (56).

Pocos son los trabajos que analizan las aneuploidías de los sexocromosomas en un mismo ensayo. Debido a las dificultades técnicas para lograr un buen bandeo cromosómico, los estudios de cariotipos de células germinales realizados por la técnica de fusión gamética entre hámster y humano, hacen mayor énfasis en las aberraciones cromosómicas estructurales y algunos cuantifican las hipo e hiperhaploidías sin determinar cuáles son los cromosomas involucrados (44, 83). No fue sino hasta el inicio de la década de los 90's con la introducción de la técnica de FISH como una metodología para el estudio de alteraciones cromosómicas en espermatozoides, que se comenzó a enfatizar acerca de las disomías y las nulisomías de los cromosomas sexuales (89, 90).

Los porcentajes de disomías XY, XX y YY encontramos que en general coinciden con los reportados en la literatura por Robbins (52), Chevret (91), Frias (58) y Martin (51, 57), aunque otros autores (92, 93, 94) reportan una alta frecuencia de disomías de sexocromosomas; es importante señalar que en los trabajos que no hay coincidencia con nuestros datos, la cantidad de espermatozoides analizados por individuo fue mucho menor a los que se analizaron en éste trabajo y que en aquellos con los que encontramos coincidencia en las aneuploidías también coinciden en el análisis de un alto número de espermatozoides.

Las frecuencias de células disómicas XY (MI) son del doble de aquellos espermatozoides con disomía producida en MII. El comportamiento de células disómicas para sexocromosomas representan la distribución esperada si tomamos

en cuenta que un evento de no disyunción en MI producirá 2 células disómicas mientras que un error en MII solo producirá una célula disómica (92).

Los sujetos sanos presentaron más células diploides producidas por error en la primera división meiótica (MI = 3) que aquellas producidas por errores en la segunda división (MII = 1), sin embargo esta diferencia no es significativa, esto mismo se ha encontrado en otros trabajos realizados con FISH en individuos normales (58, 86).

En lo que respecta a las alteraciones complejas, teóricamente pudieron haberse originado por eventos de no disyunción en células diploides o incluso por la pérdida de más de un cromosoma en una misma célula; en cualquier situación corresponden a más de un evento por célula. Estos eventos son mucho menos frecuentes. Frias y colaboradores (58) reportaron una suma de la frecuencia de alteraciones complejas en el grupo testigo de 13, este valor no es diferente al 14 que encontramos en nuestro grupo control.

7.3.2 Efecto de la edad al tratamiento sobre la frecuencia de aneuploidías en espermatozoides de pacientes tratados con MOPP.

El grupo de los pacientes tratados antes de la pubertad recibieron el tratamiento antes de los 8 años de edad, esto implica que su epitelio germinal no estaba en división celular activa; mientras que el grupo tratado después de la pubertad lo recibió después de los 13 años para asegurar la división celular del epitelio

germinal. Hasta la fecha no hay estudios que evalúen las anomalías cromosómicas en espermatozoides de personas que hayan recibido tratamiento antineoplásico de cualquier modalidad en edad prepuberal, los pocos estudios realizados se han efectuado en individuos tratados en edad adulta con diferentes tipos de cáncer y con un número reducido de donadores de semen.

El total de aneuploidías encontrado en el grupo de pacientes tratados después de la pubertad fue mayor que el encontrado tanto en el grupo tratado antes de la pubertad como en los sujetos sanos, sin embargo, no hubo diferencia estadística entre los grupos (Tabla 22). En los grupos estudiados no se encontró correlación entre la cantidad de QT recibida ó entre recibir o no RT, y la frecuencia total de alteraciones cromosómicas. Tampoco se encontró correlación en cuanto a los años después de haber terminado el tratamiento y la frecuencia total de aneuploidías.

Tanto las hiper como las hipohaploidías de los autosomas que se encontraron en los espermatozoides de estos individuos son parecidas a las encontradas en los sujetos sanos sin diferencias estadísticas. En ambos grupos de pacientes EH las aneuploidías del cromosoma 21 fueron significativamente mayores a las encontradas para el cromosoma 18 ($p < 0.05$); en el estudio realizado por Thomas *et al* (94), analizaron las aneuploidías en los espermatozoides de 3 pacientes EH mayores de 36 años tratados 2 y 5 años antes con MOPP-ABV; encontraron una frecuencia de disomía 21 de 0.20% mientras que para el cromosoma 18 fue de 0.04%; aunque en este trabajo en el grupo tratado después de la pubertad

encontramos frecuencias menores ($dis_{21}=0.07\%$, $dis_{18}=0.01\%$), la razón entre una y otra alteración fue semejante entre ambos estudios y es comparable con el comportamiento de nuestro grupo testigo; por lo que se hace evidente la mayor susceptibilidad del cromosoma 21 a sufrir eventos de no disyunción.

Al analizar las aberraciones numéricas para los sexocromosomas, las obtenidas en el grupo de pacientes tratados antes de la pubertad y las que presentaron los sujetos de referencia, fueron menores a las encontradas en los tratados después de la pubertad sin diferencia estadística; sin embargo en este último grupo las disomías XY fueron más elevadas con respecto al grupo de los individuos sanos y a los tratados antes de la pubertad. Nuestros datos concuerdan con lo reportado por Brandiff, Frias y Monteil que encuentran incrementos significativos con respecto a su grupo de referencia, en la frecuencia de disomías XY en espermatozoides de pacientes EH tratados con MOPP, NOVP y vinblastina respectivamente (50, 58, 95). Se encontró que las nulisomías encontradas en el grupo tratado después de la pubertad son equitativas con respecto a las disomías de cromosoma sexual (Tabla 19). Se sabe que una división celular con un evento de no disyunción produce una célula con un cromosoma extra y por otro lado otra célula en la que falta ese cromosoma, esto produce un equilibrio entre la cantidad de células disómicas y nulisómicas para un mismo cromosoma; según lo anterior, se esperaría que las nulisomías para los sexocromosomas fueran equivalentes a la suma de las células disómicas; no obstante en el presente estudio encontramos que en el grupo control y en el grupo tratado antes de la pubertad las nulisomías para los cromosomas sexuales son más frecuentes que las células disómicas

(Tablas 11, 15), por lo que en este trabajo no podemos descartar la posibilidad de que por otro mecanismo diferente a la no disyunción, como el rezago anafásico, se produzcan más células con nulisomía; tal es el caso del sujeto NL09 quien presentó una frecuencia de 34/10,000 para la nulisomía de cromosoma sexual, mientras que las disomías fueron 12/10,000.

La frecuencia de diploidías fue ligeramente mayor en individuos tratados después de la pubertad que en los pacientes tratados en edad prepuberal y en los sujetos sanos pero sin diferencia estadística. Vale la pena mencionar que existe una gran variabilidad individual y que las desviaciones estándar encontradas entre los individuos son muy amplias.

Al comparar los resultados de alteraciones complejas obtenidos para los grupos estudiados, encontramos que los tratados después de la pubertad tuvieron una frecuencia significativamente mayor que los tratados antes de la pubertad y los del grupo testigo. Las alteraciones complejas encontradas en los tratados después de la pubertad las conformaron células diploides que perdieron un cromosoma, algunas con ganancia y en ocasiones muy raras la pérdida de más de un cromosoma en una célula haploide, este tipo de alteraciones concuerdan con las reportadas previamente por Frias *et al* (58). Estos eventos son raros ya que para producirse una trisomía o una monosomía en una célula diploide deben ocurrir por lo menos dos errores diferentes, que pueden ser una falla en meiosis I, II o ambas.

7.3.3 Clonas de células aneuploides.

Al ver el comportamiento de las frecuencias de aneuploidías y realizar la búsqueda de clonas, detectamos que tres pacientes tratados después de la pubertad mostraron clonas anormales con disomía XY y uno de ellos además tuvo una clona con disomía del cromosoma 21, uno de los pacientes tratados antes de la pubertad presentó una clona disómica XY; el hecho de encontrar estas clonas, apoya la propuesta de que el daño que observamos en este trabajo se produjo en las células madre de la línea germinal.

Es muy posible que estos eventos estén relacionados con la actividad proliferativa del epitelio germinal, ya que son 3 de 4 pacientes tratados después de la pubertad los que presentan clonas celulares aneuploides. El cuarto individuo no presentó clonas anormales, aunque debe considerarse que con esta metodología sólo observamos alteraciones en 4 de los 24 cromosomas del complemento humano y es posible que este individuo sea menos susceptible a la exposición a estos agentes o bien que sus sistemas de reparación estén en mejor condición, ya que este paciente a pesar de haber recibido 6 ciclos de MOPP, tiene densidad espermática y frecuencia de aneuploidías normales. Muchos de los pacientes tratados antes de la pubertad son azoospermicos, uno de los seis que tuvieron espermatozoides presentó una clona celular con disomía XY.

Uno de los objetivos de este trabajo fue conocer si la aplicación de la QT antes de la pubertad protege de la formación de aneuploidías en los espermatozoides, debido a que el epitelio germinal no está en división celular activa en la infancia;

con los datos aquí obtenidos observamos que efectivamente hay más alteraciones cromosómicas en los espermatozoides de pacientes que fueron tratados después de la pubertad, pero en aquellos tratados antes hay una menor producción de gametos y esto también podría relacionarse con genotoxicidad de células germinales, sin embargo con la metodología utilizada en el presente trabajo no es posible conocer esto.

La posibilidad de que un espermatozoide disómico fecunde a un óvulo con complemento cromosómico normal, incrementa el riesgo de producir un individuo con algún síndrome genético o bien un producto no viable. Al dividir la frecuencia de clona disómica entre la frecuencia de disomía que presentó el grupo de los sujetos sanos se calculó el cociente de incremento de riesgo (llamado en inglés fold change), que tenga cada paciente para la clona presentada. De este modo podemos decir que, por ejemplo el paciente tratado después de la pubertad MOPP03 tiene 2.9 veces más riesgo de generar un embrión con síndrome de Klinefelter que la población sana (Tabla 24).

Tabla 24. Incremento en el riesgo de producir un individuo con síndrome genético con respecto a los sanos, para cada paciente con clona aneuploide.

	MOPP03 Post	MOPP17 Post	MOPP02 Post	MOPP23 Pre
Síndrome de Klinefelter Dis XY	2.9	3.9	3.3	2.7
Síndrome de Down Dis 21		4.2		

7.4 Extrapolación a Genoma Haploide.

Debido a que en los estudios de FISH se analizan sólo una parte del complemento cromosómico, fue necesaria la extrapolación de los resultados a genoma haploide de acuerdo a la fórmula propuesta por Frias *et al* (58):

$$\left[\frac{\text{frecuencia de aneuploidías de los autosomas}}{2} \right] \times 22 \text{ autosomas} + \frac{\text{frecuencia de aneuploidías de sexocromosomas}}{2} + \frac{\text{frecuencia de diploidías}}{100}$$

Con la extrapolación a genoma haploide encontramos que 1.9% de los espermatozoides de los sujetos sanos tienen alteraciones cromosómicas, esto es semejante al 1.6% reportado por Brandiff (83) quien realizó el análisis directamente sobre los cromosomas gaméticos de 9 individuos sanos; también es semejante a lo reportado por diversos autores quienes analizan los espermatozoides de sujetos sanos con FISH (51, 58, 92) (Tabla 25).

Tabla 25. Comparación de aneuploidías totales obtenidas por otros autores en espermatozoides de individuos sanos. Extrapolación a genoma haploide.

Referencia	Metodología utilizada / cromosomas analizados	Porcentaje de aneuploidías por genoma haploide
Brandiff, 1985.	Hámster-humano Todos los cromosomas	1.6
Bischoff, 1994.	FISH / X, Y, 3,4,6,7,8,10,12,16,17,18	1
Martin, 1993.	FISH / Y,15,16	2.4
Frias, 2003.	FISH / X-Y-18-21	2.6
Presente trabajo	FISH / X-Y-18-21	1.9

Al realizar la extrapolación a genoma haploide de las aneuploidías encontradas en los tres grupos estudiados, encontramos que los sujetos sanos tienen 1.9% de células germinales con alteración, 2.19% para los tratados antes de la pubertad y 2.15% para los tratados después de la misma (Tabla 26). Estos valores no son diferentes entre sí, aunque como se analizó anteriormente, aparecen clonas aneuploides en tres de cuatro de los sujetos tratados después de la pubertad vs uno de seis sujetos tratados antes de la pubertad, y el estudio realizado por Van Hummelen (56) con dos metodologías de FISH, el mismo número de pacientes y los mismos números de células analizadas que en este estudio, indicaron una proporción de pacientes con clonas, exactamente igual a la nuestra (3 de 4).

Tabla 26. Comparación de aneuploidías totales obtenidas en espermatozoides de los grupos estudiados. Extrapolación a genoma haploide.

Sanos	Prepuberales	Postpuberales
1.9%	2.19%	2.15%

Estos datos sugieren que el epitelio germinal en división activa puede ser una condición que favorezca la acción genotóxica del tratamiento antineoplásico y aunque es necesario estudiar un mayor grupo de pacientes tratados después de la pubertad para confirmarlo, parece evidente que el tratamiento MOPP además de eliminar el cáncer, produce aneuploidías en las células madre germinales, ya que encontramos alteraciones incluso 20 años después del tratamiento esto concuerda

con lo reportado previamente sobre la Procarbazona, que junto con el Melfalan y la Mitomicina C, es una de las tres drogas anticancerígenas que se ha comprobado que induce daño específico a nivel de las células madre espermatogoniales (20). Por otra parte, con las técnicas utilizadas no podemos estudiar la presencia de alteraciones cromosómicas estructurales y dentro del esquema MOPP, se sabe que la Mecloretamina (mostaza nitrogenada) es un agente alquilante que produce mutaciones letales dominantes a nivel de espermatocitos, lo cual se ha relacionado directamente con aberraciones cromosómicas inestables presentes en espermatozoides, por otro lado se sabe que las translocaciones cromosómicas presentes en los gametos masculinos son heredables directamente al embrión y esta característica es compatible con la vida (96); debido a esto es necesario realizar estudios en donde se realice la búsqueda de alteraciones cromosómicas estructurales para conocer más acerca de los efectos adversos de los tratamientos y la situación genética en la que quedan estos pacientes.

8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

Este trabajo proporcionó información sobre la condición en la que quedan los pacientes sobrevivientes a EH en nuestro país, luego de haber recibido tratamiento antineoplásico con MOPP, el cual es considerado altamente eficiente para eliminar este linfoma. Encontramos que la calidad de semen se deteriora significativamente en los pacientes tratados, sin importar si la terapia la recibieron antes o después de la pubertad, lo cual les produce infertilidad, que en la mayoría de los casos no ha revertido aún 20 años después de terminada la terapia; otros más afortunados son subfértiles quizás con mayor posibilidad de recuperación y con el uso de técnicas de fertilización asistida es probable que puedan concebir un hijo.

La hipótesis de este trabajo fue que el tratamiento antineoplásico iba a producir una menor citotoxicidad en los individuos tratados antes de la pubertad; sin embargo observamos que no confiere ninguna ventaja biológica el hecho de que las células germinales no se encuentren en división celular activa y aunque captamos pocos pacientes tratados después de la pubertad, encontramos que la QT es igualmente tóxica para las células en división que para las que están en reposo.

El estudio de las aneuploidías aportó información acerca de cuál es la condición genética en la que se encuentran los espermatozoides de los pacientes luego de

haber recibido QT. Al extrapolar los datos encontrados a genoma haploide total encontramos que los donadores sanos tienen el porcentaje más bajo de espermatozoides con aneuploidías (1.9%), mientras que los pacientes tratados antes y después de la pubertad mostraron sólo un ligero incremento, a expensas sobre todo de un aumento en las disomías XY.

Encontramos que algunos cromosomas como el 21 y los cromosomas sexuales tienen mayor susceptibilidad a la no disyunción, y que la mayor parte de los errores que aquí encontramos se produjeron en la primera división meiótica.

El daño genotóxico que genera clones anormales, se encontró tanto en pacientes tratados antes de la pubertad como en los tratados después, pero fue más frecuente en estos últimos, esto aunado a las diferencias significativas encontradas en la presencia de disomía XY y de alteraciones complejas, permite pensar que el daño genotóxico detectado por esta metodología indica una mayor susceptibilidad del epitelio germinal en división activa.

Con esta metodología no es posible detectar alteraciones cromosómicas estructurales, no obstante es importante en un futuro buscarlas intencionadamente en las células germinales de estos pacientes para determinar si existen diferencias en el daño producido a este nivel.

Con todo lo anterior es posible que estos pacientes tengan un asesoramiento genético adecuado y puedan acceder a los diferentes cuidados prenatales y a las metodologías de diagnóstico prenatal para lograr concebir un hijo sano.

Los estudios de inducción de aneuploidías en poblaciones expuestas son complicados debido a problemas de dosis recibidas, variabilidad y susceptibilidad individual, sin embargo son de mucha utilidad debido a la información epidemiológica que proporcionan.

Los riesgos reproductivos de los pacientes expuestos a quimioterapia MOPP son muchos ya que no sólo ponen en riesgo su fertilidad próxima y a largo plazo. La posibilidad de producir clonas aneuploides incrementa de manera importante el riesgo de tener descendencia con alteraciones cromosómicas, que de llegar a término, pueden reducir significativamente la calidad de vida de ese producto.

9. REFERENCIAS

1. **Martínez-Avalos A. Enfermedad de Hodgkin (1994)** en: Diagnóstico del niño con cáncer. Cap 15. Rivera-Luna Editor. Mosby/Doyma libros, Madrid, pp143-150.
2. **Diehl V, Stein H, Hummel M, Zollinger R y Connors JM (2003)**. Hodgkin's lymphoma: Biology and treatment strategies for primary, refractory and relapsed disease. American Society of Hematology. Education Program Book. Hematology 2003. San Diego, California, december 6 – 9. Pp 225-247.
3. **Santoro A y Viviani S. Hodgkin's disease (1993)** en: Cvitkovic E, Droz JP, Armand JP y Khovry S (eds). Handbook of chemotherapy in clinical oncology. Rhone-Poulenc Rorer, segunda edición Scientific Communication International, Ltd, Paris. pp.695-701.
4. **Magrath IT, Johnson JF. Lymphoma in children (1993)** en: Cvitkovic E, Droz JP, Armand JP y Khovry S (eds). Handbook of chemotherapy in clinical oncology. Rhone-Poulenc Rorer. segunda edición. Scientific Communication International, Ltd, Paris. pp.708-715.
5. **Leventhal BG y Donaldson S. Hodgkin's Disease. (1993)**. en: Pizzo PA y Poplack DG (eds). Principles and practice of pediatric oncology. Cap 24. 2nd edition. JB Lippincott, Philadelphia, pp 577-594.
6. **Mueller NE, (1996)**. Hodgkin's disease en: Principles and Practice of Medical Genetics. Churchill Livingston, NY. 3rd edition. pp 893 – 919.
7. **Hudson MM y Donaldson SS (1997)**. Hodgkin's disease. *Pediatr Oncol* 44: 891-906.
8. **Pao WJ y Kun LE (1989)**. Hodgkin's disease in children. *Hematol/Oncol Clin North America* 3: 345-363.
9. **Yung L y Linch D (2003)**. Hodgkin's lymphoma. *Lancet* 361: 943-951.
10. **Rivera-Luna R. Principios Generales de Quimioterapia (1994)** en: Diagnóstico del niño con cáncer. Cap 4. Rivera-Luna editor. Mosby/Doyma libros. Madrid, pp.27-58.
11. **Rivera-Luna. Factores pronósticos de la neoplasias malignas en pediatría. (2002)** en: Oncología Pediátrica. Conceptos básicos y clínicos. Cap 16. Rivera-Luna Ed. Intersistemas SA de CV.México. pp. 303-335.
12. **Harris NL (1999)**. Hodgkin's lymphoma: classification, diagnosis and grading. *Sem Hematol* 36: 220-232.
13. **Mesa J-RC, Espinosa EM, Hernández CP, Losada RB, Plasencia AT y Hernández PR (1999)**. Enfermedad de Hodgkin: nuevos conceptos clínico-patológicos. *Rev Cubana Inmunol Hemoter* 16: 21-29.
14. **Thomson AB y Wallace WHB (2002)**. Treatment of paediatric Hodgkin's disease: a balance of risks. *Eur J Cancer* 38: 468-477.
15. **Connors JM, Noordijk EM y Horning SJ (2001)**. Hodgkin's lymphoma: basing the treatment on the evidence. American Society of Hematology.

Education Program Book. Hematology 2001, Orlando Florida, december 7-11. pp 178-193.

16. **Hudson MM y Donaldson SS (1999)**. Treatment of pediatric Hodgkin's lymphoma. *Semin Hematol* 36: 313-323.
17. **Advani RH y Horning SJ (1999)**. Treatment of early-stage Hodgkin's disease. *Semin Hematol* 36: 270-281.
18. **Ng AK y Mauch PM (1999)**. Radiation therapy in Hodgkin's lymphoma. *Semin Hematol* 36: 290-302.
19. **Balis MF, Holcenberg JS y Poplack DG. General principles of chemotherapy (1993)** en: Pizzo PA y Poplack DG (eds). Principles and practice of pediatric oncology. Segunda edición. JB Lippincott, Philadelphia. pp 197-245.
20. **Witt KL and JB bishop. (1996)** Mutagenicity of anticancer drugs in mammalian germ cells. *Mutat Res* 355:209-234.
21. **Vassal G. Alkylating agents: cyclophosphamide, ifosfamide, melphalan, thiotepa, chlorambucil, busulfan (1993)** en: Cvitkovic E, Droz JP, Armand JP y Khovry S (eds). Handbook of chemotherapy in clinical oncology. Rhone-Poulenc Rorer, segunda edición. Scientific Communication International, Ltd, Paris. pp.221-232.
22. **Pouillart P. Vincristine (1993)** en: Cvitkovic E, Droz JP, Armand JP y Khovry S (eds). Handbook of chemotherapy in clinical oncology. Rhone-Poulenc Rorer, segunda edición. Scientific Communication International, Ltd, Paris. pp.309-311.
23. **Lares-Assef. Agentes antineoplásicos (2002)** en: Oncología Pediátrica. Conceptos básicos y clínicos. Cap. 3. Rivera-Luna Ed. Intersistemas SA de CV. México. pp 33 - 62
24. **Muggia FM, Chachoua A y Hoshster M. Doxorubicin (1993)** en: Cvitkovic E, Droz JP, Armand JP y Khovry S (eds). Handbook of chemotherapy in clinical oncology. Rhone-Poulenc Rorer, segunda edición. Scientific Communication International, Ltd, Paris. pp.277-280.
25. **Sikic BI. Bleomycin (1993)** en: Cvitkovic E, Droz JP, Armand JP y Khovry S (eds). Handbook of chemotherapy in clinical oncology,. Rhone-Poulenc Rorer, Segunda edición. Scientific Communication International, Ltd, Paris. pp.296-298.
26. **Chollet P. Dacarbazine (1993)** en: Cvitkovic E, Droz JP, Armand JP y Khovry S (eds). Handbook of chemotherapy in clinical oncology. Segunda edición. Rhone-Poulenc Rorer, Scientific Communication International, Ltd, Paris. pp.236-239.
27. **Brussamolino E, Lunghi F, Orlandi E, Astori C, Passamonti F, Baraté C, Pagnucco G, Baio A, Franchini P, Lazzarino M, Bernasconi C (2000)**. Treatment of early stage Hodgkin's disease with four cycles of ABVD followed by adjuvant radiotherapy: analysis of efficacy and long term toxicity. *Haematologica*. 85: 1032-39.
28. **Linch DC, Gosden RG, Tulandi T, Tan S-L y Hancock SL (2000)**. Hodgkin's lymphoma: choice of therapy and late complications. American Society of Hematology. Education Program Book. Hematology 2000. San Francisco, California, december 1-5. pp 205-221.

29. **Jenkin D, Greenberg M y Fitzgerald A (1996).** Second malignant tumours in childhood Hodgkin's disease. *Med Pediat Oncol* 26: 373-379.
30. **Hudson MM, Poquette CA, Lee J, Greenwald CA, Shah A, Luo X, Thompson EI, Williams JA, Kun LE y Crist WM. (1998).** Increased mortality after successful treatment for Hodgkin's disease. *J Clin Oncol* 16: 3592-3600.
31. **Tura S, Fiacchini M, Zinzani PL, Brusamolino E y Gobbi PG (1993).** Splenectomy and the increasing risk of secondary acute leukemia in Hodgkin's disease. *J Clin Oncol* 11:925-930.
32. **Gyger M, Forest L, Vuong TE, Perreault C, Lavallee C, Lacombe M, Boileau J y D'Ángelo G (1984).** Therapy-induced preleukaemia in patients treated for Hodgkin's lymphoma: clinical and therapeutic relevance of sequential chromosome banding studies. *Br J Haematol* 58: 61-69.
33. **Van Leeuwen FE, Klokman WJ, Van't Veer MB, Hagenbeek A, Krol ADG, Vetter UAO, Schaapveld M, van Heerde P, Burgers JMV, Somers R y Aleman BMP (2000).** Long-term risk of second malignancy in survivors of Hodgkin's disease treated during adolescence or young adulthood. *J Clin Oncol* 18: 487-497.
34. **Abrahamsen AF, Andersen A, Nome O, Jacobsen AB, Holte H, Abrahamsen JF y Kvaloy S (2002).** Long-term risk of second malignancy after treatment of Hodgkin's disease: the influence of treatment, age and follow-up time. *Ann Oncol* 13: 1786-1791.
35. **Longo DL, Glatstein E, Duffey PL Young RC, Ihdue DC, Welin BA, Wilson WH, Wittes RE, Jaffe ES, Hubbard Smand VT De Vita, Jr. (1997).** Alternating MOPP and ABVD Chemotherapy plus mantle-field radiation therapy in patients with massive mediastinal Hodgkin's disease. *J Clin Oncol*; 15: 3338-46.
36. **Müller J. (2003).** Impact of cancer therapy on the reproductive axis. *Horm Res*; 59 (suppl1):12-20.
37. **da Cunha MF, Meistrich ML, Fuller LM, Cundiff JH, Hagemeister FB, Velasquez WS, McLaughlin P, Riggs SA, Cabanillas FF and PG Salvador. (1984).** Recovery of spermatogenesis after treatment of Hodgkin's disease: limiting dose of MOPP chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2: 571-577.
38. **Viviani S, Ragni G, Santoro A, Perotti L, Caccamo E, Negretti E, Valagussa P and G Bonadonna. (1991).** Testicular dysfunction in Hodgkin's disease before and after treatment. *Eur J Cancer*; 27: 1389-92.
39. **Botchan A, Hauser R, Gamzu R, Yogev L, Lessing JB, Paz G and H Yavetz. (1997).** Sperm quality in Hodgkin's disease versus non-Hodgkin's lymphoma. *Hum Reprod*; 12: 73-76.
40. **Shafford EA, Kingston JE, Malpas JS, Plowman PN, Pritchard J, Savage MO, Eden OB. (1993)** Testicular function following the treatment of Hodgkin's disease in childhood. *Br J Cancer*; 68: 1199-204.
41. **Marmor D and F Duyck. (1995).** Male reproductive potential after MOPP therapy for Hodgkin's disease: a long-term survey. *Andrologia*; 27: 99-106.

42. **Bonadonna G, Santoo A, Viviani S, Lombardi C, Ragni G. (1984).** Gonadal damage in Hodgkin's disease from cancer chemotherapeutic regimens. *Arch Toxicol Suppl*; 7:140-5.
43. **Viviani S, Santoro A, Ragni G, Bonfante V, Bestetti O, Bonadonna O. (1985).** Gonadal toxicity after combination chemotherapy for Hodgkin's disease. Comparative results of MOPP vs ABVD. *Eur J Cancer Clin Oncol*; 21: 601-5.
44. **Brandiff B, Gordon L, Ashworth L, Wathmaker G, Carrano A, and A Wyrobeck. (1984).** Chromosomal abnormalities in human sperm: Comparisons among four healthy men. *Hum. Genet.* 66:193-201.
45. **Marchetti F and AJ Wyrobek. (2005).** Mechanisms and consequences of paternally –transmitted chromosomal abnormalities. *Birth defects Res*; (part C) 75: 112-129.
46. **Marchetti F, Lowe X, Bishop J and AJ Wyrobek. (1999).** Absence of selection against aneuploid mouse sperm at fertilization. *Biol Reprod* 61:948-954.
47. **Bishop JB, Dellarco VL, Hassold T, Ferguson LR, Wyrobek AJ y JM Friedman. (1996).** Aneuploidy in germ Cells. Etiology and Risk Factors. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 28:159-166.
48. **Shelby MD. (1996).** Selecting chemicals and assays for assessing mammalian germ cell mutagenicity. *Mutat Res*; 325: 159-167.
49. **Ford CE. (1972).** Gross genome unbalance in mouse spermatozoa: does it influence the capacity to fertilize? In: Beatty RA, Gluecksohn-Waels S, editors. Edinburgh symposium on the genetics of the spermatozoon; proceeding of an international symposium held at the University of Edinburgh, Scotland on August 16-20, 1971. Edinburgh: Department of Genetics, University of Edinburgh. Pp 359-369.
50. **Brandiff B, Meistrich ML, Gordon LA, Carrano AV y JC Liang. (1994).** Chromosomal Damage in sperm of patients surviving Hodgkin's disease following MOPP (nitrogen mustard, vincristine, procarbazine and prednisone) therapy with and without radiotherapy. *Hum Genet.* 93:295-299.
51. **Martin RH, Ko E and K Chan. (1993).** Detection of aneuploidy in human interphase spermatozoa by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Cytogenet Cell Genet.* 64:23-26.
52. **Robbins WA, Meistrich ML, Moore D, Hagemeister FB, Weier HU, Cassel MJ, Wilson G, Eskenazi B and AJ Wyrobek. (1997).** Chemotherapy induces transient sex chromosomal and autosomal aneuploidy in human sperm. *Nat Genet.* 16: 74-78.
53. **Martin RH, Ernst S, Rademaker A, Barclay L, Ko E, and N Summers. (1997).** Analysis of human sperm karyotypes in testicular cancer patients before and after chemotherapy. *Cytogenet Cell Genet.* 78:120-123.
54. **Martin RH, Ernst S, Rademaker A, Barclay L, Ko E, and N Summers. (1997).** Chromosomal abnormalities in sperm from testicular cancer patients before and after chemotherapy. *Hum Genet*; 99: 214-218.
55. **Martin RH. (1998).** Human sperm chromosome complements in chemotherapy patients and infertile men. *Chromosoma*; 107: 523-527.

56. **Van Hummelen P, Lowe X and AJ Wyrobek. (1996).** Simultaneous detection of structural and numerical chromosome abnormalities in sperm of healthy men by multicolor fluorescence *in situ* hybridization. *Hum Genet*; 98: 608-615.
57. **Martin RH, Rademaker AW and NJ Leonard. (1995).** Analysis of chromosomal abnormalities in human sperm after chemotherapy by karyotyping and fluorescence in situ hybridization (FISH). *Cancer Genet Cytogenet.* 80:29-32.
58. **Frias S, Van Hummelen P, Meistrich ML, Lowe X, Shelby MD and AJ Wyrobek. (2003).** NOVP chemotherapy for Hodgkin's disease transiently induces sperm aneuploidies associated with the major clinical aneuploidy syndromes involving chromosomes X, Y, 18 and 21. *Cancer Res*; 63: 44-51.
59. **Fait G, Yogev L, Botchan A, Paz G, Lessing JB and H Yavetz. (2001).** Sex chromosome aneuploidy in sperm cells obtained from Hodgkin's lymphoma patients before therapy. *Fertil and steril.*; 75: 828-829.
60. **Mulvihill JJ, McKeen EA, Rosner F, Zarrabi MH. (1987).** Pregnancy outcome in cancer patients. Experience in a large cooperative group. *Cancer*; 60:1143-1150.
61. **Byrne J, Rasmussen SA, Steinhorn SC, Connelly RR, Myers MH, Lynch CF, Flannery J, Austin DF, Holmes FF, Holmes GE, Strong LC and JJ Mulvihill. (1998).** Genetic disease in offspring of long-term survivors of childhood and adolescent cancer. *Am J Hum Genet*; 62:45-52.
62. **Wyrobek AJ. (1993)** Methods and concepts in detecting abnormal reproductive outcomes of paternal origin. *Reprod Toxicol*; 7:3-16.
63. **Baird PA, Anderson TW, Newcombe HB, Lowry RB. (1988).** Genetic disorders in children and young adults: a population study. *Am J Hum Genet.*; 42:677-93.
64. **Gómez E, Amorocho B, Martínez MC, Sánchez R, Quesada-Quintana B, Landeras J, Ballesteros A y J Remohi. 2000.** Análisis básico del semen. En: Remohi J, Romero JL, Pellicer A, Simón C, Navarro J (eds). Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. McGraw Hill-Interamericana. 1ª Edición, Madrid, España. pp 185-198.
65. **Slotter ED. (1998)** Semen processing and analyses protocols. Lawrence Livermore National Laboratory. Comunicación Personal.
66. **ISCN (1995):** An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Mitelman F (ed): S. Karger; Basel. 114p.
67. **Marshburn PB, Sloan CS, Hammond MG. (1989).** Semen quality and association with coffee drinking, smoking, and ethanol consumption. *Fertil Steril* 52: 162-165.
68. **Oldereid NB, Rui H and K Purvis. (1992).** Life styles of men in barren couples and their relationship to sperm quality. *Int Fertil* 37: 343-349.
69. **Robbins WA, Vine MF, Truong KY and RB Everson. (1997).** Use of fluorescence in situ hybridization (FISH) to assess effects of smoking, caffeine and alcohol on aneuploidy load in sperm of healthy men. *Environ Mol Mutagenesis* 30:175-183.
70. **Cohen LE. (2003).** Endocrine late effects of cancer treatment. *Curr Opin Pediatr* 15: 3-9.

71. **WHO Laboratory Manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 1999.** Published on behalf of the World Health Organization. Cap 2. Fourth edition. Cambridge University Press UK. pp 4-33.
72. **Soriano Guillen L, Muñoz Calvo MT, Pozo Román J, Contra Gómez T, Buño Soto M y J Argente Oliver. (2000).** Alteraciones en la función gonadal en varones pospuberales supervivientes de leucemia linfoblástica aguda y enfermedad de Hodgkin. *An Esp Pediatr* 53: 318-323.
73. **Adler ID, Kliesch U, Jentsch I and MR Speicher. (2002).** Induction of chromosomal aberrations by dacarbazine in somatic and germinal cells of mice. *Mutagenesis* 17: 383-89.
74. **Meistrich ML, Wilson G, Ye W-S, Thrash C and I Huhtaniemi. (1996).** Relationship among hormonal treatments, suppression of spermatogenesis, and testicular protection from chemotherapy-induced damage. *Endocrinology* 137:3823-3831.
75. **Meistrich ML. (1993).** Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis. *Eur Urol* 23:136-142.
76. **Heikens J, Behrendt H, Adraanse R, Berghout A. (1996).** Irreversible gonadal damage in males survivors of pediatric Hodgkin's disease. *Cancer* 78:2020 – 24.
77. **Mustieles C, Munoz A, Alonso M, Ros P, Yturriaga R, Maldonado S, Otheo E, Barrio R. (1995).** Male gonadal function after chemotherapy in survivors of childhood malignancy. *Med Pediatr Oncol* 24: 347-51.
78. **Papadakis V, Vlachopapadopoulou E, Van Syckle K, Ganshaw L, Kalmanti M, Tan C, Sklar C. (1999).** Gonadal function in young patients successfully treated for Hodgkin's disease. *Med Pediatr Oncol* 32: 366 –72.
79. **Matus-Ridley M, Nicosia SV, Meadows AT. (1985).** Gonadal effects of cancer therapy in boys. *Cancer* 55: 2353 – 63.
80. **Chemes HE. (2001).** Infancy is not a quiescent period of testicular development. *Int. J Androl* 24:2-7.
81. **Meistrich ML, Chawla SP, Da Cunha MF, Johnson SL, Plager C, Papadopoulous NE, Lipshultz LI, Benjamin RS. (1989).** Recovery of sperm production after chemotherapy for osteosarcoma. *Cancer* 63: 2115 – 23.
82. **Das PK, Das BK, Sahu DC, Mohanty GN and RN Rath. (1994),** Male gonadal function in Hodgkin's disease before and after treatment. *J Assoc Physicians India*, Aug; 42:604-5.
83. **Brandiff B, Gordon L, Ashworth L, Wathmaker G, Moore D, Wyrobeck AJ and A Carrano. (1985).** Chromosomes of human sperm: Variability among normal individuals. *Hum. Genet.* 70:18-24.
84. **Rueffer U, Breuer K, Josting A, Lathan b, Sieber M, Manzke O, Grotenhermen FJ, Tesch H, Bredenfeld H, Koch P, Nisters-Backers H, Wolf J, Engert A, Diehl V. (2001).** Male gonadal dysfunction in patients with Hodgkin's disease prior to treatment. *Ann Oncol* 12: 1307-1311.
85. **Gandini L, Lombardo F, Salacone P, Paoli D, Anselmo AP, Culasso F, Dondero F and A Lenzi. (2003).** Testicular cancer and Hodgkin's disease: evaluation of semen quality. *Hum Reprod* 18: 796-801.

86. **Martin RH, Balkan W, Burns K, Rademaker A, Lin C, Rud DN. (1983).** The chromosome constitution of 1000 human spermatozoa. *Hum Genet* 63: 305-309.
87. **Martin RH, Ko E, Rademaker A. (1991).** Distribution of aneuploidy in human gametes: comparison between human sperm and oocytes. *Am J Med Genet* 39: 321-31.
88. **Guttenbach M, Wolfgang E, Schmid M. (1997).** Analysis of structural and numerical chromosome abnormalities in sperm of normal men and carriers of constitutional chromosomal aberrations. A review. *Hum Genet* 100:1-21.
89. **Martin RH and A Rademaker. (1990).** The frequency of aneuploidy for individual chromosomes in 6,821 human sperm chromosome complements. *Cytogenet Cell Genet* 53: 103-107.
90. **Brandiff B and L Gordon. (1990).** Human sperm cytogenetics and the one-cell zygote, en: Allen JW, Bridges BA, Lyon MF, Moses MJ, Russell LB, (eds). *Biology of mammalian germ cell mutagenesis*. Banbury No. 34, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA. pp183-194.
91. **Chevret E, Rosseaux S, Monteil M, Usson Y, Cozzi J, Pelletier R, Séle B. (1997).** Meiotic behaviour of sex chromosomes investigated by three colour FISH on 35,142 sperm nuclei from two 47,XYY males. *Hum Genet* 99: 407-412.
92. **Bischoff FZ, Nguyen DD, Burt KJ and LG Shaffer. (1994).** Estimates of aneuploidy using multicolor fluorescence in situ hybridization on human sperm. *Cytogenet Cell Genet.* 66: 237-243.
93. **Han TL, Ford JH, Webb GC, Flaherty SP, Correl A, Matthews CD. (1993)** Simultaneous detection of X- and Y- bearing human sperm by double fluorescence in situ hybridization. *Mol Reprod Devel* 34: 308-313.
94. **Thomas C, Cans C, Pelletier R, De Robertis C, Hazzouri M, Sele B, Rousseaux S, and Hennebicq. (2004).** No long-term increase in sperm aneuploidy rates after anticancer therapy: sperm fluorescence in situ hybridization analysis in 26 patients treated for testicular cancer or lymphoma. *Clin Cancer Res* 10: 6535-6543.
95. **Monteil M, Rousseaux S, Chevret E, Pelletier R, Cozzi J and B Sèle. (1997).** Increased aneuploid frequency in spermatozoa from a Hodgkin's disease patient after chemotherapy and radiotherapy. *Cytogenet Cell Genet* 76:134-138.
96. **Marchetti F, Lowe X, Bishop J and A Wyrobek. (1997).** Induction of chromosomal aberrations in mouse zygotes by acrylamide treatment of male germ cells and their correlation with dominant lethality and heritable translocations. *Environ Mol Mutagen*; 30:410-417.

Anexo 1



Instituto Nacional de Pediatría

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

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

Fecha _____
Nombre _____
Edad _____

1. El que suscribe voluntariamente acepto donar una muestra de semen y una muestra de 20 ml de sangre para ser utilizadas exclusivamente para propósitos de investigación y la muestra de semen no será usada para fertilizar ningún óvulo humano.
2. Mi participación en este estudio no implica ningún tratamiento médico.
3. Se me ha informado que las muestras donadas se usarán para realizar investigación, específicamente en semen, se determinará la cantidad de semen, el número, forma y motilidad de espermatozoides. Tanto en sangre como en semen, se determinará el número y el tipo de anormalidades cromosómicas que se encuentren en las células de las muestras.
4. La Dra. Sara Frías Vázquez será la responsable de la investigación de que las muestras y la información que estoy aportando se manejen de manera confidencial. se responsabiliza de que las muestras se manejen codificadas (sin saber el nombre) y que si se utilizan en futuras investigaciones o publicaciones siempre se mantendrá el anonimato.
5. Entiendo que este estudio puede no tener beneficios directos para mi, pero puede contribuir al conocimiento de los efectos que tiene la exposición a medicamentos para tratar el cáncer.
6. Se me ha informado que se me entregará una copia de esta carta de consentimiento y que si tengo alguna queja sobre el manejo de muestras o información, podré dirigirme al Dra. Victoria del Castillo, Jefa del Departamento de Investigación en Genética Humana del INP, al teléfono 10 84 09 00 ext. 1331, para presentar mi queja.

Firma del donador _____

Testigo (nombre y firma) _____

Médico Tratante (nombre y firma) _____

Responsable del Proyecto: Dra.Sara Frias Vázquez _____

Anexo 2

Cuestionario de tamizaje

1. Fecha de nacimiento _____
Día/mes/año

2. Fuma? Si _____ No _____

Cuántos cigarrillos por día en los últimos 6 meses. _____

3. Ha tenido fiebre de más de 38°C en los últimos 6 meses?

Si _____ No _____

4. Qué enfermedades ha tenido en los últimos 3 meses _____

5. Tiene vasectomía? Si _____ No _____

6. Ha padecido o se le ha practicado:

a) Testículos no descendidos? Si _____ No _____

b) Varicocele (venas varicosas en escroto)? Si _____ No _____

c) Otra enfermedad urinario o genital? Si _____ No _____

Especifique _____

d) Alguna enfermedad endócrina u hormonal? Si _____ No _____

Especifique _____

e) Cáncer Si _____ No _____

Especifique:

Tipo _____

Quimioterapia _____

Radioterapia _____

7, Se ha tomado radiografías, o practicado algún examen que involucre radiación en los 3 últimos meses? Si _____ No _____

8. ¿Se ha practicado un examen de semen antes? Si _____ No _____
Especifique la razón _____

9. ¿Tiene algún problema de fertilidad? Si _____ No _____
Si es informativo, especifique _____

10. ¿Se le ha hecho una transfusión sanguínea en los últimos tres meses?
Si _____ No _____
Especifique la razón _____

**CRITERIOS DE EXCLUSION DE ACUERDO AL ANEXO 2.
CUESTIONARIO DE TAMIZAJE**

Pregunta:

1. Menor de 18 años, se excluye.
2. Si fuma más de 5 cigarrillos al día, se excluye.
3. Si es positiva, esperar tres meses para tomar muestras.
4. Si ha tenido enfermedades virales y/o de transmisión sexual en los últimos tres meses, esperar para tomar muestras. En caso de SIDA, se excluye.
5. Afirmativo, se excluye.
6. Afirmativo, se excluye. La excepción sería que el cáncer fuera EH, con lo que Se incluiría como paciente.
7. Afirmativo, esperar para tomar muestras.
8. Y 9. Si se sospecha alguna enfermedad de origen cromosómico, se excluye.
10. Afirmativo, esperar para tomar muestras.

ANEXO 3

CUESTIONARIO PRINCIPAL

Por favor contesta las siguientes preguntas.

1. Fecha _____
2. Fecha de nacimiento _____
3. Peso del paciente _____, _____ kgs.
4. Talla del paciente _____, _____ mts.
5. Edo. Civil

- soltero
- casado
- unión libre
- separado
- divorciado
- viudo

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

- no
- si

Con cuáles agentes has tenido contacto _____

7. Fumas regularmente?

- no
- si

8. Anota el número promedio de cigarrillos por día, fumados durante los últimos 5 años; _____

9. Tomas bebidas alcohólicas regularmente

- no
- si

Qué cantidad promedio por semana en los últimos 5 años _____

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

10. Tomas Drogas regularmente?

- no
- si

Qué tipo de drogas y con qué frecuencia

11, Tomas bebidas que contienen cafeína

- no
- si

12. Aparte de enfermedad de Hodgkin ¿qué enfermedades has padecido?

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

**Menciona que medicamentos
Cuántos días**

Porqué razón lo tomaste

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____

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

- no
- si

¿Qué tipo de examen?

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

- no
- sí

¿Cuál (anótalo)?

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

Testículos sin descender al nacimiento. si no

Varicocele. si no

Fimosis. si no

Infección de vías urinarias. si no

Enfermedades de transmisión sexual. si no

Paperas. si no

Cuando presentaste papera ¿presentaste inflamación dolorosa de los testículos. si no

Secreción anormal por el pene?. si no

Sensación de ardor al orinar? si no

Dolor severo o hinchazón de los testículos que requirió tratamiento médico? si no

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

- no
- sí, en los últimos 12 meses.
- sí, antes de los últimos 12 meses.

Cuando? 19____.

17. Durante los últimos tres meses, cuántas veces en promedio ha eyaculado?
_____ veces por mes.

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

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

- no
- si

Hace cuanto tiempo presentaste fiebre _____ días

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

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

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

- boxer.
- Pants
- Ninguna
- Otra especificar).

23. Durante los últimos 3 meses has usado sauna o baños de tina

- no
- si

Cuántas veces al mes?

_____ veces al mes.

Cuánto has durado en promedio

_____ minutos.

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

Expediente #:

Fecha de Nacimiento:

Edad al Diagnóstico:

Enfermedad de Hodgkin estadio:

Tipo Celular:

Fecha de Inicio de Quimioterapia:

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

Fecha de Inicio de Radioterapia:

Dosis Aplicada y Zona de Aplicación:

Fecha de término de quimioterapia:

Observaciones:

Médico Tratante (Nombre y Firma):

Anexo 4. Soluciones.

Tris HCl 1M pH 7.8

15.76 g de Tris (Trizma hydrochloride) SIGMA
97 ml de agua destilada estéril, ajustar a pH 7.8
Aforar a 100 ml con agua estéril. Conservar en refrigeración.

DTT 10 mM

0.0617 gr de DTT (dithiothreitol) SIGMA
36 ml de agua destilada estéril
4 ml de Tris HCl 0.1M pH 7.8
Disolver por completo y mantener la solución en hielo. Usar nueva para cada ensayo.

LIS 4mM

0.0633 gr de LIS (3,5-acido diyodosalicílico) SIGMA
36 ml de agua destilada estéril
4 ml de Tris HCl 0.1M pH 7.8.
Disolver por completo. Usar nueva para cada ensayo.

Formamida 70%/2XSSC pH 7.0

35 ml de formamida (ONCOR, GIBCO)
5 ml de solución 20XSSC
7 ml de agua destilada esteril
Ajustar pH 7.0 y aforar a 50 ml con agua estéril. Conservar a 4°C por un mes

Formamida 50%/2XSSC pH 7.0

25 ml de formamida (ONCOR, GIBCO)
5 ml de solución 20XSSC
15 ml de agua destilada
Ajustar pH 7.0 y aforar a 50 ml con agua estéril. Conservar a 4°C por un mes.

Solución 20XSSC

132gr 20XSSC (solución salina de Citrato de Sodio)
400 ml de agua destilada estéril
Ajustar pH 5.3, aforar a 500 ml con agua destilada y filtrar.

Solución 2XSSC

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

DAPI/Vectashield

0.1µl de DAPI stock + 2000 µl de Vectashield (VECTOR)
Tomar 7-9 µl por laminilla. Conservar en Congelación cubierto de la luz.

Anexo 5
Hoja de captación de datos para espermatozoides anormales.
CYTOSCORE, LLNL.

File Edit Ayuda

Anomaly Page 1: Required Info

Coordinates Cell Type:

Length and Width

File/Photo # Second Opinion:

Anomaly

Distance \leq 0.5 [Except for YY phenotypes]

Domain sizes differ

Domain intensities differ

Domain sizes differ from surrounding cells

Other

Next Page

OK Cancel

Page 1

File Edit Ayuda

Anomaly Page 2: Features and Comments

Tail

Cell Shape

Domains

Domain Dist.

Hook

Next Page

OK Cancel

Page 2