



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

**Frecuencia de translocaciones cromosómicas
balanceadas en linfocitos de sobrevivientes a
enfermedad de Hodgkin tratados con quimioterapia
MOPP**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

M en C. Consuelo Salas Labadía

Tutora: Dra. Sara Frias Vázquez – Instituto Nacional de Pediatría

Comité Tutorial:

Dr. Miguel Bentancourt Rule – Universidad Autónoma Metropolitana

Dr. Mario Altamirano Lozano – Facultad de Estudios Superiores
Zaragoza, UNAM

Invitado:

Dra. Alessandra Carnevale Cantoni - INMEGEN

MÉXICO, D.F.

Enero, 2013



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de agosto de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **SALAS LABADÍA CONSUELO** con número de cuenta **91585914** con la tesis titulada **"FRECUENCIA DE TRANSLOCACIONES CROMOSÓMICAS BALANCEADAS EN LINFOCITOS DE SOBREVIVIENTES A ENFERMEDAD DE HODGKIN TRATADOS CON QUIMIOTERAPIA MOPP"**.

realizada bajo la dirección de la DRA. SARA FRÍAS VÁZQUEZ.

Presidente: DRA. ALESSANDRA CARNEVALE CANTONI
Vocal: DRA. PATRICIA OSTROSKY SHEJET
Secretario: DR. MIGUEL BETANCOURT RULE
Suplente: DRA. PATRICIA PÉREZ VERA
Suplente: DR. MARIO ALTAMIRANO LOZANO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 25 de octubre de 2012

Maria del Coro Arizmendi

DRA. MARIA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

Agradecimientos:

Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Beca alumna de Doctorado, CONACYT: registro 14426.

Tutora:

Dra. Sara Frias Vázquez

Comité tutorial:

Dr. Miguel Betancourt Rule

Dr. Mario Altamirano Lozano

Dra. Alessandra Carnevale Cantoni.

Agradezco con todo mi corazón las enseñanzas, apoyo y cariño de todas las personas que estuvieron conmigo durante este largo camino.

Frecuencia de translocaciones cromosómicas balanceadas en linfocitos de sobrevivientes a enfermedad de Hodgkin tratados con quimioterapia MOPP

CONTENIDO

Resumen	11
1. Introducción	15
1.1 Linfoma Hodgkin	15
1.2 Biología del LH	17
1.3 Alteraciones genéticas en LH	18
1.4 Etiología del LH	18
1.5 Tratamiento	19
1.6 Consecuencia del tratamiento antineoplásico	21
1.7 Antecedentes directos	22
2. Objetivos	24
2.1 Objetivo general	24
2.2 Objetivos particulares	24
2.2.1 Análisis por citogenética convencional	24
2.2.2 Análisis molecular	25
3. Hipótesis	25
4. Materiales y métodos	25
4.1 Clasificación de la investigación	25
4.2 Población de estudio	25
4.2.1 Para el análisis citogenético	25
4.2.2 Para el análisis molecular	26
4.3 Criterios de inclusión	26
4.4 Criterios de exclusión	27
4.5 Esquema de tratamiento para pacientes con LH	28
4.6 Diseño experimental	29
4.7 Técnicas	30
4.7.1 Cultivo celular y laminillas para estudio citogenético	30
4.7.2 Separación celular y cultivo para estudio Molecular	30
4.7.3 Extracción de RNA	31
4.7.4 Cuantificación e integridad	31
4.7.5 Síntesis de cDNA	31
4.7.6 PCR GAPDH	31
4.7.7 PCR en tiempo real	32
4.7.8 PCR anidado	34
4.8 Análisis de resultados	35
4.8.1 Análisis citogenético	35
4.8.2 Análisis molecular	36
4.8.3 PCR tiempo real	38
4.8.4 PCR anidado	42
4.8.5 Análisis estadístico	43
5. Resultados	43
5.1 Análisis citogenético	43
5.1.1 Población de estudio	43
5.1.2 Aneuploidías en sangre periférica de pacientes MOPP en individuos sanos	46

5.1.3 Rupturas cromosómicas y GCR en sangre periférica de pacientes MOPP e individuos sanos -----	48
5.2 Análisis molecular -----	52
5.2.1 Población de estudio -----	52
5.2.2 Obtención de cDNA -----	55
5.2.3 PCR tiempo real t(9;22) -----	56
5.2.4 PCR tiempo real t(8;21) -----	57
5.2.5 PCR tiempo real t(15;17) -----	57
5.2.6 PCR anidado t(9;22) -----	59
5.2.7 PCR anidado t(8;21) -----	61
5.2.8 PCR anidado t(15;17) -----	62
6. Discusión -----	64
6.1 Análisis citogenético -----	64
6.1.1 Daño cromosómico numérico: Aneuploidías (CIN) -----	64
6.1.2 Daño cromosómico estructural: Rupturas de doble hebra de DNA -----	66
6.1.3 Daño cromosómico estructural: Rearreglos cromosómicos mayores (GCR) --	66
6.2 Análisis molecular -----	71
7. Conclusión -----	75
Referencias -----	77

Resumen

Introducción. Los avances en el tratamiento del cáncer han llevado a un incremento importante en la supervivencia de los pacientes. Sin embargo, la exposición a agentes genotóxicos relacionados con la quimioterapia y la radiación ionizante pueden inducir daño genético persistente en los supervivientes a cáncer. **Objetivo.** En este trabajo, se estudió la frecuencia y tipo de inestabilidad genómica en linfocitos de sangre periférica de pacientes con linfoma Hodgkin (LH), hasta 17 años después del tratamiento con quimioterapia MOPP (mostaza nitrogenada, Oncovin, procarbazona y prednisona) sólo o en combinación con radioterapia. **Metodología.** Las muestras fueron obtenidas de 3 diferentes grupos: 11 individuos sanos, 5 pacientes LH pre-tratamiento y 20 pacientes LH post-tratamiento. Se hizo análisis por citogenética convencional con bandeo GTG; el análisis molecular se realizó mediante PCR tiempo real y PCR anidado sobre RNA de linfocitos para identificar las translocaciones cromosómicas balanceadas t(9;22), t(8;21) y t(15;17), como herramientas para detección de genotoxicidad y por su relación con cáncer secundario al tratamiento. El análisis citogenético con bandas GTG, se realizó en 1,000 metafases por individuo para identificar inestabilidad genómica, que incluyó aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales a una resolución de 10 Mb, lo cual permitió analizar el genoma completo. **Resultados.** El tratamiento anti-cáncer, no indujo diferencias en la frecuencia de aneuploidías entre los tres grupos estudiados. Sin embargo, 1 de 11 individuos sanos y 13 de 20 pacientes post-tratamiento, presentaron una alta frecuencia de rupturas cromosómicas y rearrreglos cromosómicos mayores. Los resultados del análisis molecular mostraron que dos pacientes post-tratamiento, fueron positivos para la t(9;22), sin embargo esta alteración no se observó nuevamente al año y dos años de seguimiento.

Discusión. Con el análisis citogenético se observaron aberraciones cromosómicas complejas y al azar, consistentes con inestabilidad genómica persistente inducida por el tratamiento antineoplásico. La expansión clonal de células con lesiones cromosómicas se observó sólo en un paciente post-tratamiento. Los hallazgos muestran que el tratamiento antineoplásico induce inestabilidad genómica persistente, pero no aneuploidía. Los resultados moleculares dan evidencia de que solo la generación de la fusión génica, no es suficiente para que se presente el proceso maligno, se requiere la producción de una proteína funcional con propiedades oncogénicas y además, debe ocurrir en una célula precursora hematopoyética con capacidad de auto-renovación.

Conclusión. La quimioterapia puede afectar genes relacionados con la vigilancia y reparación de daño en el DNA, que como consecuencia permitirá la acumulación de daño cromosómico estructural sin blancos específicos, en las futuras generaciones celulares. Esta inestabilidad genómica puede facilitar el desarrollo de segundas neoplasias en los supervivientes a LH. Los análisis por citogenética convencional y genética molecular, pueden utilizarse como herramientas complementarias para el estudio de los efectos genotóxicos del tratamiento antineoplásico en pacientes LH.

Abstract

Background. Advances in cancer treatment have led to an increase in patient survival. However, exposure to genotoxic chemotherapeutic agents and ionizing radiation may induce persistent genetic damage in cancer survivors. **Purpose.** In this study, we investigate the frequency and type of genomic instability in peripheral blood lymphocytes from Hodgkin lymphoma (HL) patients, 2–17 years after MOPP (nitrogen mustard, Oncovin, procarbazine, and prednisone) chemotherapy with or without radiotherapy. **Methods.** Samples were obtained from 3 different groups: 11 healthy individuals, 5 pre-treatment patients, and 20 post-treatment patients. The cytogenetic analysis was done with GTG banding; molecular analysis was developed with real-time PCR and nested PCR on lymphocytes RNA to identify balanced chromosomal alterations: t(9;22), t(8;21) and t(15;17), as a genotoxicity identification tools and because are secondary treatment cancer related translocations. Cytogenetic analysis with GTG banding was performed on 1,000 lymphocyte metaphases per donor to identify genomic instability, including numerical and structural chromosomal aberrations, at a resolution of 10 Mb across the entire genome. **Results.** Our results showed that anticancer treatment did not induce significant differences in the frequency of aneuploidy among the three study groups. However, 1 of the 11 healthy individuals, and 13 of the 20 post-treatment patients had a high frequency of chromosomal breaks and gross chromosomal rearrangements. With the molecular analysis we observed that only two HL post-treatment patients, was positive for t(9;22), however we didn't observe this alteration after one and two follow-up years. **Discussion.** The cytogenetic analysis showed random and complex chromosomal aberrations, consistent with persistent genomic instability that was induced by cancer treatment. Clonal expansion of cells with

chromosomal lesions was observed in one post-treatment patient only. These findings show that anticancer treatments induce persistent genomic instability, but not aneuploidy. The molecular results observed, provide evidence that only the generation of specific gene fusions is not sufficient to cause a malignant process, requires the production of a functional protein with oncogenic properties and must occur in an early precursor cell with self-renewal capacity. **Conclusion.** We observed that chemotherapy may affect genes with a role in DNA damage surveillance or repair, which in turn allows the accumulation of non-targeted structural chromosomal damage in future generations of cells. This genomic instability may facilitate the development of second malignancies in Hodgkin lymphoma survivors. The cytogenetic and molecular analysis can be used as complementary tools for the study of genotoxic effects of antineoplastic treatment in HL patients.

1. INTRODUCCION

1.1. Linfoma Hodgkin

El linfoma de Hodgkin (LH) es una neoplasia maligna que afecta al sistema linfoide y representa del 30 al 40% de todos los linfomas malignos y cerca de la mitad de las neoplasias hematológicas (1-6).

El LH tiene una incidencia de alrededor de 2-3 por cada 100,000 individuos por año en Estados Unidos y Europa con una presentación bimodal con respecto a la edad: el primer pico ocurre entre los 20-30 años y el segundo pico después de los 50 años de edad (3, 7-11). En el Instituto Nacional de Pediatría en México, ocupa el tercer lugar dentro del grupo de las neoplasias malignas y su presentación es frecuente en pacientes en edad pediátrica (menores de 10 años) (12).

Dependiendo del tipo celular presente en el infiltrado tumoral, el LH se clasifica en:

1) LH clásico. Definido por la presencia de las células Reed/Sternberg (HRS). Se caracterizan por presentar un inmunofenotipo CD20-/+, CD30+ y CD15+. Una característica importante de esta entidad, es la detección en alrededor del 40% de los casos, de proteínas nucleares y de membrana del virus Epstein-Barr (9,13).

2) LH con predominancia nodular linfocítica. Representa el 5% de los casos con linfoma Hodgkin. A nivel celular tienen una variante de las células HRS, llamadas células linfocíticas/histiocíticas (L&H). El inmunofenotipo es una parte importante de la definición de esta entidad; expresan antígenos asociados a células B (CD20) y es negativo para CD30 y CD15 (9,13).

En ambas entidades, las células malignas solo representan el 1% de la masa tumoral (3, 9-11,13-15).

El LH clásico se divide en 4 subtipos:

a) Esclerosis nodular (NSHL)

Es frecuente en países desarrollados (60-80% de los casos con LH) y afecta individuos entre 20-30 años de edad.

b) Celularidad mixta (MCHL)

Representa del 15-25% de los casos con LH y es frecuente en adultos jóvenes.

c) Predominancia linfocítica (LRCHL)

Clínicamente se presenta como una enfermedad localizada, representa del 4-15% de los casos con LH y es frecuente en niños.

d) Disminución linfocítica (LDHL)

Es el subtipo que se presenta con menor frecuencia (menos del 1%). Rara vez se presenta en niños y con frecuencia en individuos infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (HIV) (3, 6, 7, 9, 13, 16).

Clasificación Ann Harbor

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

- Estadio I

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

- Estadio II

Participación de dos o más regiones de nódulos linfáticos del mismo lado del diafragma (II) o localizada en un órgano o sitio extranodular del mismo lado del diafragma (II_E).

- Estadio III

Participación de regiones de nódulos linfáticos a ambos lados del diafragma (III), que puede estar acompañado por el bazo (III_S) o localizada en sólo un sitio extranodular (III_E) o con el bazo (III_{SE}).

- Estadio IV

Extensión difusa o diseminada con la participación de uno o más órganos o tejidos extranodulares con o sin presencia de nódulos linfáticos afectados (7-9, 16).

1.2. Biología del LH

Las células HRS, características del LH derivan de células B, desde el centro germinal (GC) de diferenciación. Los GC de células B son estructuras especializadas de los tejidos linfoides secundarios, que surgen por expansión clonal de células B antígeno-específicas, y durante esta expansión, los genes de inmunoglobulinas (Ig) de las células B, hipermutan dentro de estos centros y así incrementan su afinidad por los anticuerpos. Las células HRS presentan rearrreglos en los genes de inmunoglobulinas, con lo que se puede demostrar su naturaleza clonal y es esta alta carga de mutaciones somáticas, lo que refuerza su derivación desde el GC (principalmente pre-apoptótico) (3-6, 10, 11, 14, 17-19). Si dentro del GC se presentan fallas durante el proceso de

diferenciación celular, se encienden los mecanismos de apoptosis y la célula no puede salir del GC. En el caso de las células HRS, se propone que son células pre-apoptóticas que por infección viral o mutaciones somáticas, adquieren la propiedad de escapar a la apoptosis, lo que genera una clona anormal maligna (20).

A nivel molecular, las alteraciones en el factor nuclear κ B (NF- κ B) son importantes en la transformación de las células HRS, las cuales pueden presentar una actividad constitutiva de este factor en el núcleo como resultado de diversos mecanismos como, la amplificación génica de *c-rel*, la activación de receptores de superficie celular como CD30 y CD40, así como la activación del receptor de NOTCH1 (15, 18). De esta forma, NF- κ B activado, puede inducir en las células HRS, la expresión de genes anti-apoptóticos como *c-FLIP*, *XIAP* y *BclXL* , que les confiere resistencia a la apoptosis (15, 17).

1.3. Alteraciones genéticas en LH

La gran diversidad de alteraciones genéticas en las células HRS, refleja su inestabilidad genómica. Mediante estudios de Hibridación Genómica Comparativa (CGH), se han observado desbalances cromosómicos que incluyen ganancias de 2p (oncogén *REL*), 9p (*JAK2*), 16p, 17p y pérdida de 13q. Se han detectado alteraciones cromosómicas estructurales con puntos de ruptura que afectan 7q22, 11q23 y 14q32 y en un tercio de los casos con LH se presentan mutaciones puntuales en $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ (11, 15).

1.4. Etiología del LH

Diversos estudios serológicos han demostrado la presencia del genoma viral del virus Epstein-Barr (EBV) en las células HRS en el 30-50% de los casos con LH (4, 10,

14, 19, 21, 22-26). La relación de LH con la presencia de EBV, es más frecuente en niños menores de 10 años y en adultos mayores (más de 50 años) y está más frecuentemente relacionado con el subtipo MCHL (11, 25). Los pacientes LH EBV+, expresan 3 proteínas virales: a) EBNA1 (antígeno nuclear EBV), importante para la replicación del episoma viral en células en proliferación b) LMP1, que actúa de la misma manera que el receptor de CD40 activado, y juega un papel importante en la interacción de células B y T y en la supervivencia de células HRS-EBV+ en los GC c) LMP2A, que puede sustituir la función del receptor de células B (BCR); las células precursoras B que expresan LMP2A, pueden sobrevivir sin BCR (4, 25, 27).

Es importante recordar que las células HRS derivan del GC y provienen de células B que han adquirido mutaciones desfavorables en los genes Ig; las células B con dichas mutaciones, y por lo tanto sin Ig funcionales, sufren apoptosis. Esto sugiere que las células HRS o sus precursores, han adquirido mecanismos alternos para su supervivencia. En los GC, la apoptosis de las células B puede retrasarse mediante señales de Ig de superficie y a largo plazo, por señalización vía CD40; LMP1 actúa como CD40 y LMPA2 actúa como BCR activo en el estadio de desarrollo pro o pre-B. Se especula que la expresión de los genes EBV puede facilitar el escape de las células HRS o los precursores de su destrucción en los GC (25).

1.5. Tratamiento

Los factores pronósticos asociados a LH que pueden ser determinantes en la elección de la terapia, como el estadio de la enfermedad, la presencia de síntomas sistémicos y la presencia de enfermedad extranodular pueden tomarse en cuenta para establecer el tratamiento adecuado para cada paciente (28).

La estrategia de tratamiento para pacientes con LH, consiste en una combinación de quimioterapia y radioterapia que por un lado, reduce considerablemente la dosis de radiación y campos irradiados y por otro, reduce también la dosis de cada uno de los agentes quimioterapéuticos. La utilización del llamado protocolo híbrido: dos regímenes diferentes de quimioterapia alternados, es otra manera de evitar las secuelas relacionadas a la terapia (29).

Los pacientes con este tipo de cáncer se tratan frecuentemente con una combinación de agentes quimioterapéuticos como: MOPP (mostaza nitrogenada, vincristina (Oncovin), procarbazona y prednisona); COPP (ciclofosfamida, Oncovin, procarbazona y prednisona) y ABVD/P (adriamicina, bleomicina, vinblastina y dacarbazina o prednisona). Se puede aplicar una combinación de estos esquemas, así como radioterapia en la mayoría de los casos (30). Tomando en cuenta el estadio clínico de la enfermedad y la presencia de síntomas sistémicos, además de la presencia de algún factor de riesgo como: múltiples sitios involucrados en la enfermedad, elevados valores de sedimentación de eritrocitos, enfermedad extranodular y edad avanzada, se puede obtener para cada paciente, la combinación de agentes con o sin radioterapia y la dosis de cada uno, clasificando a los pacientes en tres grupos de riesgo:

- 1) Temprana favorable (Estadios I- II, con síntomas B)
- 2) Temprana no-favorable (Estadios I- II, con al menos un factor de riesgo)
- 3) Avanzada (Estadios III- IV, con enfermedad intra-abdominal) (28, 31).

1.6. Consecuencias del tratamiento antineoplásico

El gran avance que ha tenido el campo de la oncología en lo que respecta al tratamiento por quimioterapia y radioterapia ha incrementado la supervivencia de los pacientes; se estima que el porcentaje de supervivencia 10 años después del tratamiento es de más del 80% (2, 32, 33, 34). Sin embargo, es importante reconocer que cuando se utilizan estos esquemas, la terapia no es específica para las células tumorales, también las células normales se ven afectadas, por lo que como resultado del tratamiento antineoplásico, los pacientes con LH pueden presentar efectos adversos. Varias de las drogas utilizadas como parte del esquema de quimioterapia, son clastógenos y mutágenos probados y se ha observado que pueden provocar daño a largo plazo tanto en células somáticas como germinales de modelos animales (35, 36). Algunas de ellas como la mostaza nitrogenada, la procarbazona y la dacarbazina, son agentes alquilantes o radiomiméticos como la bleomicina, que provocan rupturas en el DNA y son inductores de inestabilidad genómica (2, 37-42). A nivel de células somáticas esto puede tener serias consecuencias, entre ellas la aparición hasta en el 20% de los pacientes con LH, de un cáncer secundario, como leucemia (25%), linfoma no-Hodgkin (17%) y diversos tumores sólidos (58%) (29, 43-45) y en células germinales, se ha reportado citotoxicidad que se presenta como azoospermia y oligospermia que pueden ser transitorias o definitivas (29, 46, 47, 48).

La inestabilidad genómica (GIN) comprende un amplio espectro de anomalías que incluyen desde mutaciones puntuales hasta alteraciones cromosómicas. Dependiendo del tipo de defecto genómico que se presente se clasifica en: a) Inestabilidad cromosómica (CIN), pérdida o ganancia de uno o más cromosomas sin llegar a un set haploide completo (aneuploidía); b) Inestabilidad micro y mini-satélite

(MIN), que se refiere a contracciones y expansiones de secuencias de DNA repetitivas; y c) Rearreglos cromosómicos mayores (GCR), que son eventos que involucran defectos en el procesamiento y ligamiento genético de fragmentos de DNA, que llevan a deleciones, duplicaciones, inversiones, translocaciones y otras anomalías estructurales (49). En diversos estudios se ha reportado la presencia de GIN *in vitro* como consecuencia de la exposición a radiación ionizante y agentes químicos (50-53).

1.7. Antecedentes directos

Existen muy pocos trabajos en los que se haya estudiado el efecto genotóxico de agentes quimioterapéuticos con o sin radioterapia en pacientes con LH cuyo régimen de tratamiento haya incluido el esquema MOPP. M'Kacher y cols. en 2003, realizaron Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) con sondas de tinción completa para los cromosomas 1, 3 y 4 y observaron que inmediatamente después de finalizado el tratamiento, se presentaba un incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas de tipo estructural, que incluían translocaciones recíprocas, dicéntricos, anillos y aberraciones complejas con un mínimo de tres o más rupturas en dos o más cromosomas; estas alteraciones permanecieron constantes por más de 2 años después de finalizado el tratamiento (54). Smith LM y cols. en 1992, utilizando FISH con sondas de tinción completa para el cromosoma 4, observaron que en los pacientes que fueron tratados con radioterapia y quimioterapia MOPP, 12 a 24 años antes del estudio, se incrementaba la frecuencia de translocaciones recíprocas que involucraban al cromosoma 4 (55). En un último estudio, realizado en 2001 por Bilban-Jakopin C y Bilban M, analizando cromosomas teñidos con Giemsa para la búsqueda de daño cromosómico estructural del tipo de rupturas cromosómicas, fragmentos acéntricos,

dicéntricos y anillos, encontraron un incremento significativo en la frecuencia de alteraciones estructurales, hasta 6 meses después de finalizar el tratamiento (56).

Es importante mencionar, que gran parte del daño cromosómico que se detectó en estos estudios como resultado del tratamiento antineoplásico, fue principalmente de tipo desbalanceado es decir, hubo pérdida o ganancia de material, ya que es un tipo de daño evidente y que comúnmente se detecta en los estudios de este tipo. Sin embargo, se debe tomar en cuenta la importancia de la identificación de alteraciones cromosómicas estructurales de tipo balanceado, en donde no hay pérdida o ganancia de material genético, ya que su detección es difícil y se trata de un tipo de daño que puede ser subletal pero altamente peligroso como cuando se presentan en células somáticas, donde frecuentemente se asocian con neoplasias secundarias al tratamiento. En este trabajo, se analizó este tipo de alteraciones cromosómicas como una herramienta para detectar daño genotóxico y que además, son alteraciones que se presentan en cáncer secundario relacionado a la terapia antineoplásica. En pacientes LH, la leucemia secundaria al tratamiento, principalmente leucemia mieloide aguda (t-AML), constituye el 25% del cáncer que se desarrolla como resultado del tratamiento, por lo que la búsqueda de algunas de las alteraciones relacionadas a esta entidad, como las translocaciones recíprocas: t(9;22), t(8;21) y t(15;17), es de gran importancia para este grupo de pacientes (57, 58). Hasta ahora, nadie ha utilizado estas translocaciones como marcadores para detectar genotoxicidad derivada del tratamiento, en este grupo de pacientes. Esta estrategia puede generar información sobre la presencia de poblaciones celulares en vías de desarrollo de neoplasias, con rapidez, alta precisión y analizando el mayor número de células posibles. Además la información puede ser útil de manera individual, para realizar pronóstico o diagnóstico

temprano de neoplasia, con el consecuente beneficio de generación de conocimiento básico y aplicado a la clínica, al mismo tiempo.

En el presente trabajo, se detectó daño cromosómico desbalanceado y también balanceado haciendo énfasis en translocaciones, mediante citogenética convencional con bandeo GTG, PCR cuantitativo y PCR anidado, en linfocitos de sangre periférica de pacientes con LH que han recibido tratamiento antineoplásico que incluya el esquema MOPP (59).

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

- Determinar si el tratamiento MOPP/ABVP o D con o sin radioterapia, incrementa la frecuencia de alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales de tipo balanceado en linfocitos de sobrevivientes a linfoma Hodgkin.

2.2. Objetivos particulares

2.2.1. Análisis por citogenética convencional

- Determinar si existen diferencias en la frecuencia de aneuploidías entre los grupos de pacientes con LH antes y después del tratamiento antineoplásico con el grupo de individuos sanos.
- Determinar si la terapia anti-cáncer induce alteraciones cromosómicas estructurales, en sobrevivientes de LH.
- Determinar si existen diferencias en la frecuencia de alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales entre sobrevivientes de LH azoospermicos y con producción de espermatozoides.

2.2.2. Análisis molecular

- Determinar si el tratamiento con quimioterapia MOPP/ABVP o D con o sin radioterapia, incrementa la frecuencia de translocaciones cromosómicas de tipo balanceado en linfocitos de sobrevivientes a LH.

3. Hipótesis

El tratamiento antineoplásico utilizado para pacientes con linfoma Hodgkin induce alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales de tipo balanceado en linfocitos de sangre periférica.

4. Materiales y métodos

4.1 Clasificación de la Investigación.

En base a la clasificación de acuerdo a los ejes de trabajo se propone realizar un estudio: observacional, comparativo, transversal y prospectivo.

4.2. Población de estudio.

El tamaño de muestra fue a conveniencia, dependiendo de la posibilidad de captación de pacientes y del costo de los análisis por individuo.

La población se dividió en dos grupos, uno para estudio citogenético y otro para estudio molecular:

4.2.1 Para el análisis citogenético

Se incluyeron 3 grupos de individuos:

a) Un grupo de 11 individuos sanos

b) Un grupo de 5 pacientes de la clínica de sobrevivientes a LH del Instituto Nacional de Pediatría (INP) antes del tratamiento antineoplásico.

c) Un grupo de 20 pacientes de la clínica de sobrevivientes a LH del INP que fueron tratados 2-17 años antes con quimioterapia MOPP/ABVP/D con o sin radioterapia: 10 azoospermicos y 10 con producción de espermatozoides.

4.2.2 Para el análisis molecular

Se estudiaron 2 grupos de individuos:

a) Un grupo de 14 individuos sanos

b) Un grupo de 11 pacientes de la clínica de sobrevivientes a LH del INP tratados con quimioterapia MOPP/ABVP/D con o sin radioterapia: 3 azoospermicos y 8 con producción de espermatozoides.

4.3. Criterios de Inclusión.

Para individuos sanos:

1. Edad de 18 a 30 años
2. Que aceptaron participar en el estudio voluntariamente y firmaron carta de consentimiento informado (anexo 1).
3. Que contestaron adecuadamente el cuestionario que se encuentra en el anexo 2.

Para pacientes con LH antes del tratamiento:

1. Pacientes diagnosticados con LH, siguiendo estrictos criterios clínicos y de laboratorio.
2. Que no hubieran recibido ningún tipo de tratamiento antineoplásico.

3. Que aceptaron participar en el estudio voluntariamente y firmaron carta de consentimiento informado (anexo 1).

4. Que contestaron adecuadamente el cuestionario que se encuentra en el anexo 2.

Para sobrevivientes a LH tratados con MOPP/ABVP/D con o sin radioterapia:

1. Pacientes que tenían por lo menos dos años de haber concluido la terapia antineoplásica

2. Edad de 18 a 30 años

3. Que aceptaron participar en el estudio voluntariamente y firmaron carta de consentimiento informado (anexo 1).

4. Que contestaron adecuadamente el cuestionario que se encuentra en el anexo 2.

4.4. Criterios de Exclusión

Para individuos sanos:

1. Que fumaran 10 o más cigarros al día.

2. Que consumieran drogas.

3. Que presentaran alguna enfermedad reproductiva, hormonal o urogenital, o algún tipo de cáncer.

Para pacientes con LH antes del tratamiento:

1. Que no cumpliera con los criterios clínicos y de laboratorio necesarios para ser diagnosticado como LH.

2. Que hubieran recibido algún tipo de tratamiento antineoplásico.

Para sobrevivientes a LH tratados con MOPP/ABVP/D con o sin radioterapia:

1. Que fumaran 10 o más cigarrillos al día.
2. Que hubieran recibido alguna transfusión sanguínea durante los 6 meses previos al estudio.
3. Que el paciente tuviera historia de recaída de cáncer primario o presentara algún cáncer secundario.

4.5. Esquema de tratamiento para pacientes con LH

Los pacientes incluidos en este estudio fueron tratados con: MOPP (mostaza nitrogenada $6\text{mg}/\text{m}^2$ días 1 y 8, Oncovin $1.5\text{mg}/\text{m}^2$ días 1 y 8, procarbazona $100\text{mg}/\text{m}^2$ días 1-14 y prednisona $40\text{mg}/\text{m}^2$ días 1-14. Repetido cada 28 días), o el esquema combinado MOPP/ABVD/P (mostaza nitrogenada $6\text{mg}/\text{m}^2$ día 1, Oncovin $1.5\text{mg}/\text{m}^2$ día 1, procarbazona $100\text{mg}/\text{m}^2$ días 1-7 y prednisona $40\text{mg}/\text{m}^2$ días 1-7; adriamicina $25\text{mg}/\text{m}^2$ día 15, bleomicina $10\text{U}/\text{m}^2$ día 15, vinblastina $6\text{mg}/\text{m}^2$ día 15 y dacarbazina $375\text{mg}/\text{m}^2$ día 15 o Prednisona $40\text{mg}/\text{m}^2$ día 15. Repetido cada 28 días) o régimen COPP (ciclofosfamida $600\text{mg}/\text{m}^2$ días 1 y 8, Oncovin $1.5\text{mg}/\text{m}^2$ días 1 y 8, procarbazona $100\text{mg}/\text{m}^2$ días 1-14 y prednisona $40\text{mg}/\text{m}^2$ días 1-14. Repetido cada 28 días). Los pacientes que se analizaron recibieron uno de los siguientes 5 esquemas MOPP: 1) MOPP (9 ciclos), 2) MOPP combinado (4-8 ciclos)/ABVP (1-8 ciclos), 3) MOPP combinado (2-6 ciclos)/ABVD (3-8 ciclos), 4) MOPP combinado (6-8 ciclos)/COPP (1-3 ciclos) y 5) MOPP combinado (1 ciclo)/COPP (1 ciclo)/ABVD (4 ciclos). El tratamiento con radioterapia consistió de 20-60 Gy con Co^{60} en área supradiaphragmática (SD) y/o para-aórtica (PA).

4.6. Diseño experimental

1. A cada individuo se le solicitó donación de 20 ml de sangre periférica.

2. Se hicieron alícuotas de cada muestra:

La primera alícuota, sirvió para establecer un banco de DNA y RNA, para realizar el análisis molecular. La segunda alícuota, se utilizó para hacer cultivos celulares y obtener cromosomas en metafase y la tercera alícuota, se congeló para hacer un banco de células en nitrógeno líquido preservando la viabilidad.

3. Se realizó un monitoreo de daño cromosómico numérico y estructural de la siguiente manera:

a) Mediante análisis cromosómico con bandas GTG, se hizo un barrido completo del genoma para conocer el tipo de daño cromosómico que presentaban los pacientes con LH después de recibir el tratamiento antineoplásico.

b) En base a lo obtenido mediante el análisis citogenético y tratando de establecer una manera más rápida y sensible de detectar principalmente alteraciones estructurales balanceadas, se utilizó PCR en tiempo real y PCR anidado, tomando como indicadores las translocaciones que se asocian con LANL: t(9;22), t(8;21) y t(15;17). El monitoreo se realizó sobre cDNA. Se decidió utilizar estas metodologías porque permiten detectar una mínima cantidad de células con rearrreglos genómicos (de 1 célula con alteración en 10^5 células negativas, hasta 1 entre 10^6 células negativas), lo cual es importante porque en individuos sanos se ha reportado la presencia de estos rearrreglos con frecuencias basales muy bajas (60, 61, 62, 63).

4.7. Técnicas

4.7.1 Cultivo celular y laminillas para estudio citogenético: 1ml de sangre periférica se sembró en 10ml de medio RPMI 1640 (Gibco, EUA) suplementado con suero fetal de bovino (Gibco, USA) al 10% y 0.2ml de fitohemaglutinina (Gibco,EUA). Los cultivos se incubaron a 37°C y fueron cultivados después de 48h. Para la cosecha, se agregaron 0.2ml de colchicina (1mg/ml; Sigma, EUA) durante 3h para lograr el arresto mitótico. Las células se trataron con solución hipotónica KCl (0.075M; Sigma, EUA) a 37°C/25min; posteriormente las células se fijaron con una solución de metanol/ácido acético (v/v, 3:1; Merck, Alemania). Las células fijadas se gotearon sobre laminillas frías y se dejaron secar. Para obtener cromosomas con bandas GTG, las laminillas se trataron con una solución con 0.015g de tripsina (Gibco, EUA) y 0.01g de EDTA (Sigma, EUA), diluído en “buffer” sörensen (KH₂PO₄, Na₂HPO₄; Sigma, EUA). Los cromosomas se tiñeron con Giemsa (Gibco, EUA) al 5%. Cada laminilla se codificó por un investigador independiente para asegurar una lectura a doble ciego.

4.7.2 Separación celular y cultivo para estudio molecular: 4 ml de sangre periférica se centrifugaron durante 30 min a 1500rpm para separar eritrocitos, células blancas y plasma. Tanto los eritrocitos como el plasma se congelaron para estudios posteriores. La capa de células blancas se diluyó en 4 ml de solución de Hanks (Gibco, EUA) y se agregaron a 4 ml de un gradiente de densidad Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, EUA) y se centrifugó 30 min/1500 rpm. Se obtuvo la capa de leucocitos y se hicieron dos lavados con solución de Hank. Dependiendo del número de células que se obtuvo, la muestra se congeló a -80°C en “buffer” de lisis (1ml de trizol por cada 5 X 10⁶ células) (Invitrogen, EUA) para la posterior extracción de RNA.

4.7.3 Extracción de RNA: Se descongelaron las muestras, se agregaron 200µl de cloroformo (Merck, Alemania) y se agitaron en vortex durante 15s y se incubaron a temperatura ambiente durante 2-3min. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 11000 rpm/15min a 4°C, se retiró la fase acuosa y se agregaron 500µl de isopropanol frío (Gibco, EUA), se mezcló por inversión y se incubó a -80°C/1h o 4°C/24h. Se centrifugó a 11000 rpm/30min, y se quitó sobrenadante; se agregó 1ml de etanol frío (Merck, Alemania) al 75% y se resuspendió por inversión. Se centrifugó a 10000 rpm/10min a 4°C, se retiró sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente 5-10m; el paquete de RNA, se disolvió en 50 µl de agua libre de RNAsas (Invitrogen, EUA).

4.7.4 Cuantificación e Integridad: El RNA se cuantificó (ng/µl) en un espectrofotómetro (BioPhotometer, eppendorf) y la pureza fue evaluada mediante la relación 260nm/280nm: se utilizaron las muestras con una pureza ≥ 1.8 . La integridad del RNA fue analizada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en "buffer" TBE 1x, teñido con Bromuro de Etidio.

4.7.5 Síntesis de cDNA: La síntesis de cDNA se realizó a partir de 1µg de RNA y se utilizó el kit "Transcriptor First Strand cDNA Synthesis" de Roche.

4.7.6 PCR GAPDH: Para conocer la calidad del cDNA y poder llevar a cabo la reacción de RT-PCR, se realizó una reacción de PCR para GAPDH a partir de 2µl de cDNA. Para cada reacción, de 25µl se utilizaron: 2.5µl de "buffer" 10x, 1.5µl de MgCl₂ (50mM), 0.5µl de "primers" (10mM), 0.5µl de dNTPs (10mM) y 0.2µl de Taq DNA pol I (10u/µl).

La reacción se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf) con las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial a 94°C/2min; 28 ciclos de amplificación: desnaturalización 94°C/30s, alineamiento 62°C/30s y extensión 72°C/30s, y una última fase de extensión a 72°C/5min. Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TBE 1x, teñido con Bromuro de Etidio.

4.7.7 PCR en tiempo real: Para la t(9;22) se utilizó un kit para cuantificación relativa: “LightCycler t(9;22) quantification” de Roche. Para la t(8;21) y t(15;17), se utilizó el kit “Light Mix for the detection of *AML1-ETO* t(8;21)” y “LightMix for the detection of *PML-RARA* mRNA” de Roche.

Para la t(9;22), las reacciones fueron realizadas en capilares independientes y por duplicado. Para realizar los ensayos de cuantificación se utilizó un control positivo de expresión para la translocación (línea celular K562) y un control negativo (H₂O); y a la par se corrió la reacción por separado para cada muestra, de un gen constitutivo (G6PDH) para crear la curva estándar (diluciones seriadas I – III) como control interno de reacción. Para un volumen final de reacción de 20µl se utilizaron: 6.2µl del “mix” de detección, 6.8µl de agua grado PCR, 2µl de mezcla de reacción 10x y 5µl de cDNA de cada una de las muestras. Las condiciones de reacción fueron las siguientes:

Análisis	Ciclos		Temperatura °C	Tiempo en seg
Ninguno	1	Desnaturalización	95	30
	45	PCR-Amplificación		
Desnaturalización		95	1	
Alineamiento		64	10	
Cuantificación		Extensión	72	26
		Enfriamiento		
Ninguno	1		40	60

Para las t(8;21) y t(15;17), las reacciones fueron realizadas en capilares independientes y por duplicado. Para realizar los ensayos de cuantificación se utilizó un control positivo de expresión para cada translocación (diluciones seriadas $10^{-1} - 10^{-7}$), que además sirvió para crear la curva estándar y un control negativo (H_2O), y a la par para cada muestra, se corrió la reacción por separado de un gen constitutivo (G6PDH) como control interno de reacción. Para un volumen final de reacción de 20 μ l se utilizaron: 4 μ l de la mezcla de reacción, 2.4 μ l de $MgCl_2$, 6.6 μ l de agua grado PCR, 2 μ l de mezcla “Faststart” de detección y 5 μ l de cDNA de cada una de las muestras. Las condiciones de reacción fueron las siguientes:

Análisis	Ciclos		Temperatura °C	Tiempo
Ninguno	1	Pre-Incubación	95	10min
		PCR-Amplificación		
Cuantificación	45	Desnaturalización	95	10s
		Alineamiento	55	20s
		Extensión	72	25s
Curvas Melting	1	Curvas Melting		
		Desnaturalización	95	0s
		Alineamiento	5	30s
		Melting	0.1/	0s
Ninguno	1	Enfriamiento	40	60s

4.7.8 PCR anidado: Se utilizaron los siguientes “primers” para cada una de las translocaciones analizadas.

Translocaciones	“Primers”*
t(9;22)	<u>BCR-b1-A</u> GAAGTGTTTCAGAAGCTTCTCC <u>ABL-α3-B</u> GTTTGGGCTTCACACCATTC <u>BCR-b2-C</u> CAGATGCTGACCAACTCGTGT <u>ABL-α3-D</u> TTCCCCATTGTGATTATAGCCTA <u>ABL-α3-E3'</u> TGACTGGCGTGATGTAGTGTCTT
t(8;21)	<u>AML1-A</u> CTACCGCAGCCATGAAGAACC <u>ETO-B</u> AGAGGAAGGCCCATGCTGAA <u>AML1-C</u> ATGACCTCAGGTTTGTCTGGTGC <u>ETO-D</u> TGAAGTGGTCTTGGAGCTCCT <u>AML1-E5'</u> TGGCTGGCAATGATGAAACTACT
t(15;17)	<u>PML-A1</u> CAGTGACGCCTTCTCCATCA <u>PML-A2</u> CTGCTGGAGGCTGTGGAC <u>RARA-B</u> GCTTGTAGATGCGGGGTAGA <u>PML-C1</u> TCAAGATGGAGTCTGAGGAGG <u>PML-C2</u> AGCGCGACTACGAGGAGAT <u>RARA-D</u> CTGCTGCTCTGGGTCTCAAT <u>RARA-E3'</u> GCCCACTTCAAAGCACTTCT

*Van Dongen JJM y cols. 1999 (76).

Para el primer PCR y un volumen de reacción final de 50µl, se utilizaron “primers” a 400nM de concentración final, dNTP’s 200µm. PCR “buffer” 20mM, MgCl₂: 2.5mM, enzima Taq Gold una unidad y 3µl de cDNA, bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial 95°C/30s; 35 ciclos de amplificación: desnaturalización 94°C/30s, alineamiento 65°C/60s, extensión 72°C/60s.

Para el segundo PCR se repitieron las mismas condiciones y se tomaron 5µl de muestra del primer PCR.

Para analizar los resultados se hicieron geles de agarosa al 3% en “buffer” TBE, teñido con Bromuro de Etidio.

4.8. Análisis de resultados

4.8.1 Análisis citogenético.

En este estudio, como un primer abordaje de búsqueda de alteraciones cromosómicas, se realizó un análisis citogenético de genoma completo con una resolución de 10Mb, que permite detectar aberraciones cromosómicas estructurales y numéricas. Se analizaron 1000 células en metafase por individuo y se obtuvo el cariotipo de 15 metafases. Cada metafase se analizó con una resolución de 450-500 bandas (64), para detectar alteraciones cromosómicas. Para evitar falsos positivos de células con cromosomas perdidos o extra (aneuploidía), se aplicaron los siguientes criterios de lectura: a) las metafases analizadas debieron tener una adecuada separación de los cromosomas, b) se analizaron células no-adyacentes, y c) cuando se identificó alguna célula con alteraciones numéricas, a la par se analizaron las metafases que se encontraron a una distancia de 10 veces el tamaño del campo analizado, para corroborar la ausencia o presencia del cromosoma involucrado en la alteración de la célula original. Si el cromosoma se encontraba en alguna célula cercana, ninguna de las dos células se consideró como aneuploide. Se utilizó este estricto criterio de lectura, para evitar los artefactos que se pudieron haber presentado durante la preparación de las laminillas.

Las alteraciones estructurales, fueron detectadas al analizar el patrón de bandas G específico para cada cromosoma; se cuantificó daño cromosómico estructural inestable, como rupturas cromatídicas y cromosómicas, fragmentos acéntricos, rearrreglos cromosómicos gruesos (GCR), como translocaciones, deleciones, inversiones, duplicaciones, marcadores cromosómicos y figuras complejas (3 o más rupturas en 2 o más cromosomas).

4.8.2 Análisis molecular

Para llevar a cabo el análisis de resultados mediante PCR tiempo real y PCR anidado, es necesario conocer las características génicas de las translocaciones seleccionadas. La t(9;22) da como resultado la fusión de la región 3' del gen *ABL1* sobre el cromosoma 9 con la región 5' del gen *BCR* en el cromosoma 22. Se han descrito varios transcritos de fusión *BCR-ABL1* que son resultado de la localización en diferentes intrones, de los puntos de ruptura sobre el gen *BCR*. Sobre el gen *ABL*, el punto de ruptura siempre se localiza en la región intrónica entre los exones 1b y 2 (Figura 1A) (65). El kit utilizado para esta translocación, detecta principalmente las fusiones b3a2, b2a2 y e1a2, que abarcan más del 95% de las translocaciones descritas (Figura 1B) (66).

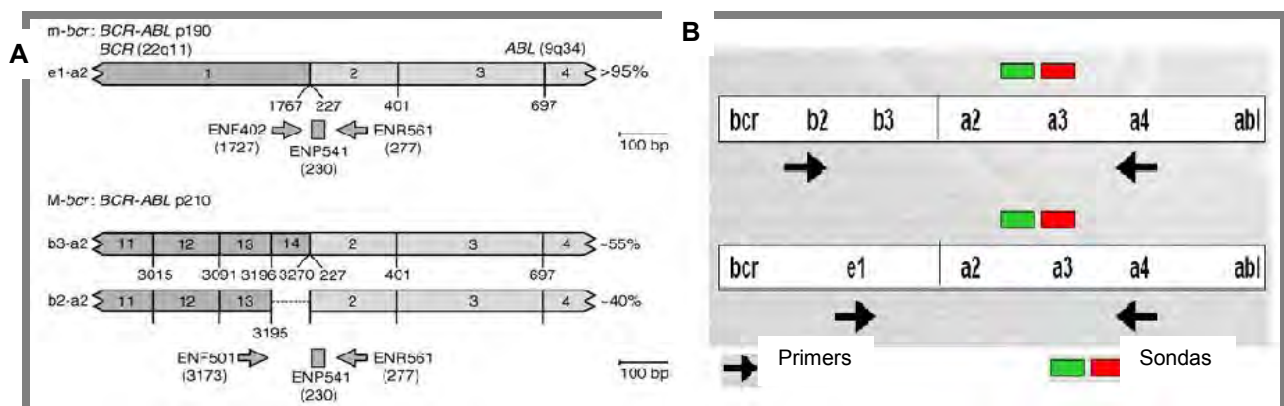


Figura 1. (A) Representación esquemática de la estructura exón/intrón de la fusión *BCR-ABL1*. Se muestran las 3 principales fusiones resultado de la diferente localización de los puntos de ruptura sobre el gen *BCR*; el punto de ruptura sobre el gen *ABL* no es variable. **(B)** Localización sobre el amplicón de los primers y sondas utilizadas para detectar mediante PCR tiempo real, las fusiones b3a2, b2a2 y e1a2.

Con respecto a la t(8;21), se caracteriza por la fusión génica *ETO-AML1*. En este caso, no se presentan puntos de ruptura alternativos por lo que sólo hay un tipo de transcrito, resultado de la fusión del exón 5 de *AML1* en el cromosoma 21 con el exón 2 de *ETO* sobre el cromosoma 8 (Figura 2) (65, 66).

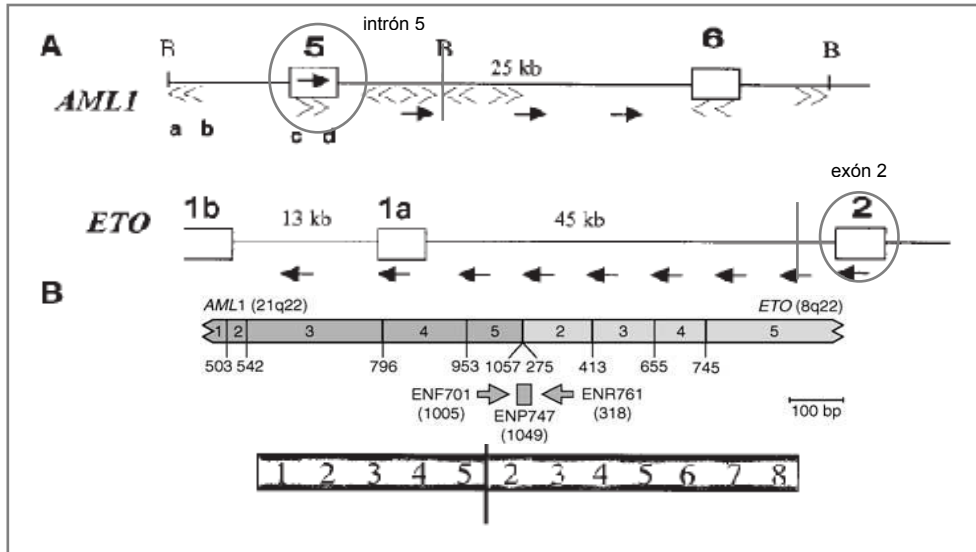


Figura 2. (A) Representación esquemática de la estructura exón/intrón de la fusión *ETO-AML1*. **(B)** Se muestra el transcrito resultado de la exacta localización de los puntos de ruptura sobre cada uno de los genes.

Los dos genes que participan en la t(15;17), son *PML* en el cromosoma 15 y el gen *RARA* en el 17. El punto de ruptura sobre *RARA* siempre se da sobre el intrón 2, mientras que para el gen *PML* se han descrito 3 puntos de ruptura alternativos: bcr1, en el intrón 6; bcr2 en el exón 6 y bcr3 en el intrón 3, lo que da como resultado la presencia de 3 posibles productos de PCR para la fusión *PML-RARA*. El kit utilizado para su detección, permite caracterizar las 3 variantes por lo que queda cubierta casi al 100% la probabilidad de presentarse (Figura 3) (65, 66).

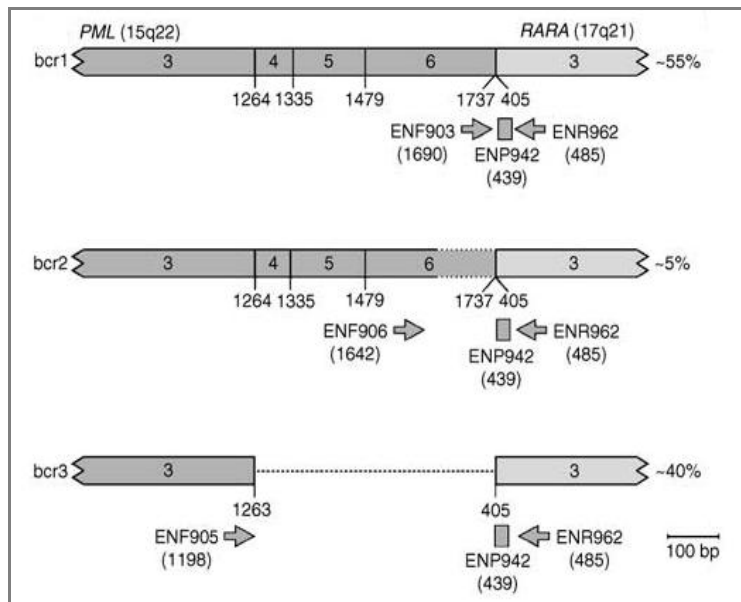


Figura 3. Se muestran los 3 transcritos resultado de la localización alternativa de los puntos de ruptura sobre el gen *PML* y ruptura sobre el gen *RARA*.

4.8.3 PCR tiempo real

Esta metodología se basa en la medición del aumento de señal fluorescente, la cual es proporcional a la cantidad de producto obtenido durante cada ciclo de PCR. Para la detección de translocaciones, se utilizaron primers específicos y sondas que consisten en dos oligonucleótidos diferentes que pueden alinearse con una secuencia interna del fragmento amplificado. Una sonda está marcada en el extremo 5' con un fluoróforo rojo 640 que para evitar su extensión y está fosforilada en el extremo 3'. La otra sonda está marcada en el extremo 3' con fluoresceína. Al momento de hibridar con el molde de DNA, las dos sondas quedan muy cercanas, lo que da como resultado lo que se conoce como transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) entre los dos fluoróforos. Durante esta transferencia de energía, el fluoróforo donador (fluoresceína) es excitado por la fuente de luz del instrumento donde se lleva a cabo la detección (LightCycler Roche) y parte de esa energía se transfiere al fluoróforo aceptor (rojo 640), que emite la fluorescencia captada por el equipo (Figura 4). Por lo tanto, la

fluorescencia es detectada durante la fase de alineamiento del PCR y es proporcional a la cantidad de producto formado (67, 68).

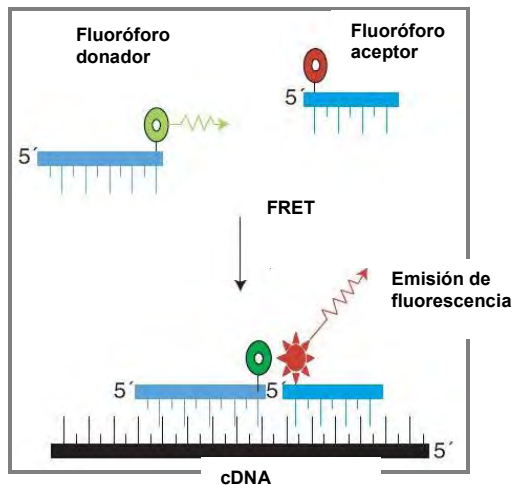


Figura 4. Mecanismo de acción de las sondas de hibridación. Se utilizan sondas de hibridación con un fluoróforo donador en el extremo 3' y otra con un fluoróforo aceptor en el extremo 5'. Durante la alineación, quedan muy cercanas y como resultado de FRET, se emite la señal fluorescente que será dependiente de la cantidad de producto formado durante el PCR. Tomado y modificado de Arya M y cols. 2005 (68).

Para analizar los resultados obtenidos por RT-PCR se empleó el método de cuantificación relativa, en el cual se utilizan fórmulas aritméticas para calcular los niveles de expresión relativa de un gen blanco con respecto a uno de referencia de expresión constitutiva, que en este caso fue el gen *G6PDH*; este grupo de genes codifican para proteínas cuya actividad es esencial para el mantenimiento de la función celular; la elección de este gen se obtuvo de datos bibliográficos y siguiendo las indicaciones del kit utilizado para cada translocación (69, 70).

Los niveles de expresión de *G6PDH* fueron utilizados como control endógeno de reacción, con el cual se normalizan los niveles de expresión del gen blanco. En la normalización, la cantidad del gen blanco, resultado de la fusión génica *BCR-ABL*, *AML1-ETO* y *PML-RARA* en cada muestra, es dividida entre la cantidad del gen de referencia (*G6PDH*), corrigiendo así las diferencias cualitativas y cuantitativas causadas por:

- Las variaciones en la cantidad de muestra inicial

- Posible degradación del RNA
- Las variaciones en la carga de muestra o errores de pipeteo
- Las variaciones en la eficiencia de la síntesis de cDNA

Por lo tanto, la amplificación de secuencias de genes constitutivos tiene dos objetivos principales: determinar la disponibilidad del RNA relativamente intacto (cDNA) en la muestra y normalizar la cuantificación del transcrito blanco (71).

Durante el curso de la reacción, los niveles de expresión de las fusiones génicas y del gen de referencia, son detectados por un programa de computadora que calcula la degradación de la fluorescencia y construye una gráfica de amplificación que contiene la información necesaria para la cuantificación del producto (Figura 5); las reacciones individuales se caracterizan por el ciclo de amplificación en el que la fluorescencia se eleva por encima de un umbral definido o fluorescencia de fondo, parámetro conocido como ciclo umbral (Ct) o punto de cruce (Cp) así, entre mayor sea la cantidad de moléculas blanco en la muestra, menor será el Ct (72, 73).

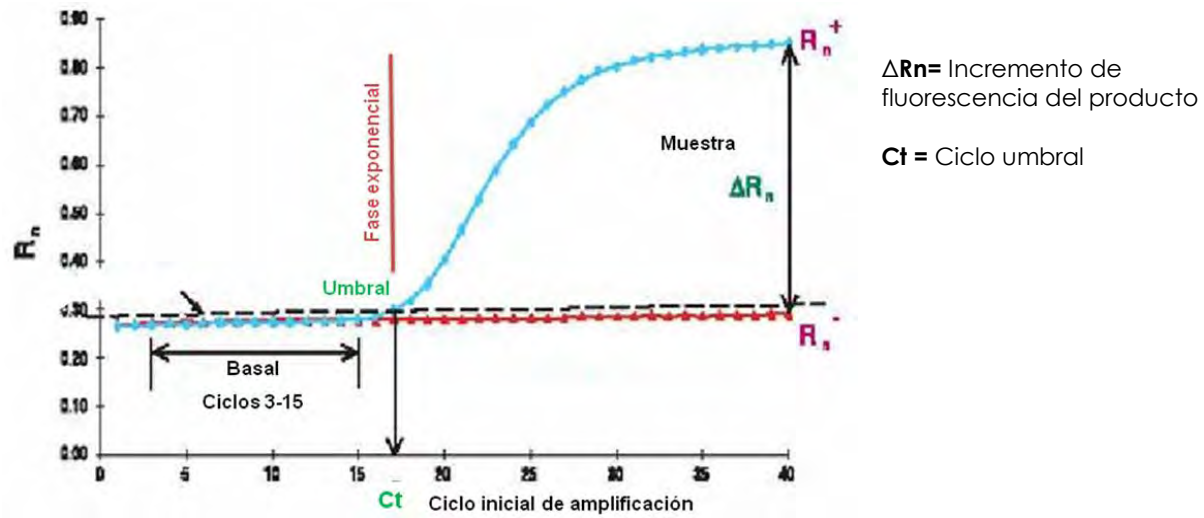


Figura 5. Gráfica de amplificación de PCR en tiempo real. En el eje vertical se representa la cantidad de fluorescencia y en el eje horizontal el número de ciclos. El ciclo umbral o Ct , es el ciclo en el que se produce un cambio significativo en la fluorescencia y se utiliza durante la fase exponencial de la curva para la cuantificación. Tomada y modificada de Arya y cols. 2005 (68).

El método comparativo Ct , fue aplicado para determinar los niveles de expresión relativa de los genes de interés: Primero, se calcula la diferencia en Ct (ΔCt), entre el gen blanco y el gen de referencia, tanto para el paciente como para el calibrador (línea celular positiva). Segundo, se calcula la diferencia de ΔCt entre el paciente y el calibrador ($\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_{\text{muestra}} - \Delta Ct_{\text{calibrador}}$). Por último, mediante la fórmula $2^{-\Delta \Delta Ct}$, se calcula la cantidad normalizada de gen blanco relativo al calibrador (74).

Para determinar la sensibilidad y eficiencia de la reacción, se hicieron diluciones seriadas ($10^{-1} - 10^{-7}$) de G6PDH o del calibrador (línea celular positiva para la alteración) tanto para cada una de las fusiones génicas como para el gen constitutivo, y se construyó una curva estándar, para la cual se graficó el valor logarítmico de la concentración contra el valor Ct (75), lo que permitió obtener el error y eficiencia de amplificación relacionado a cada una de las fusiones estudiadas en este trabajo (74). Tomando en cuenta los resultados obtenidos de nuestra curva estándar, se trabajó con la muestra sin diluir.

4.8.4 PCR anidado

Para realizar el PCR anidado se utilizaron dos pares de “primers” para cada translocación. En los tres casos se utilizó además otro “primer” como control de PCR, para confirmación de positividad o exclusión de falsos positivos, quedando el juego de de la siguiente manera: A – B + C – E3' o E5' – D (Figura 6) (76).

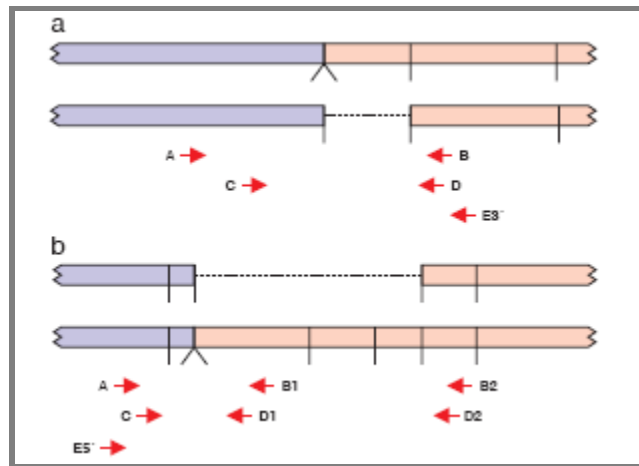


Figura 6. Diseño de primers para PCR anidado. (A) Dos primers externos A+B, dos primers internos C+D y un primer control E3'. **(B)** Con puntos de ruptura alternativos, se utilizaron primers extra B y D y el primer control E5'.

Para determinar la dilución con la que se trabajaría durante los experimentos, para cada translocación se realizaron diluciones de cDNA de una línea celular positiva para cada una de ellas: para la t(9;22), se utilizó la línea celular K562; para la t(8;21), KASUMI-1 y la línea celular NB4 para la t(15;17) (76).

Para analizar los resultados en geles de agarosa, el tamaño de los productos esperado para cada translocación fue:

	A + B	A – B + C – D	E3'/E5' + C
Tamaño del producto en pb			
K562	417	360	424
KASUMI-1	395	260	338
NB4	381	214	470

4.8.5 Análisis estadístico

Los cálculos se realizaron utilizando el programa estadístico SPSS 16.0 (SPSS, Chicago, IL). Para comparar la frecuencia de aneuploidías, rupturas y GCR entre pares de grupos, se utilizó la prueba no-paramétrica U-Mann-Whitney, y la prueba de Kruskal-Wallis se utilizó para la comparación entre grupos. Se realizó un análisis de regresión, tomando en cuenta edad del paciente, ciclos de quimioterapia, estadio de LH, años después del tratamiento y GCR. Todas las pruebas se consideraron estadísticamente significativas si $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1 Análisis citogenético

5.1.1 Población de estudio

Se estudiaron un total de 31 individuos, que incluyen 11 individuos sanos con un rango de edad de 18 a 28 años y 20 pacientes con LH que recibieron tratamiento antineoplásico: 10 con producción de espermatozoides, con un rango de edad de 18 a 27 años y 10 azoospermicos, con un rango de edad de 16 a 38 años; la edad de los individuos de cada grupo fue similar, excepto dos pacientes que al momento del estudio

tenían más de 35 años de edad. Todos los pacientes recibieron quimioterapia que incluía MOPP solo o combinado (Tabla 1). El tiempo medio entre el último tratamiento y el estudio fue de 10.8 años (rango, 2-17 años). El tratamiento con radioterapia lo recibieron 6 de 20 pacientes (Tabla 1).

Ninguno de los pacientes LH estudiados estuvo expuesto a agentes clastogénicos o aneugénicos, ya sea de previos tratamientos o hábitos personales.

Tabla 1. Características del grupo de estudio

Código	LH estadio	Edad a la toma de la muestra	Quimioterapia/Ciclos	Radioterapia/ Gys^a	Años después del tratamiento
Individuos sanos (Grupo I)					
NL4-01		20			
NL7-01		20			
NL8-01		20			
NL9-02		20			
NL10-02		20			
NL11-03		18			
NL12-03		21			
NL13-03		20			
NL14-03		24			
NL16-03		25			
NL18-03		28			
Pacientes LH sin tratamiento antineoplásico (Grupo II)					
Pre-Tx35-04	IVB	23			
Pre-Tx39-04	IVB	28			
Pre-Tx45-04	IIB	52			
Pre-Tx51-04	IIA	20			
Pre-Tx52-04	IIA	16			
Pacientes LH con tratamiento antineoplásico (Grupo III)					
Con espermatozoides (Grupo IIIa)					
MOPP5-02	III	20	MOPP/8 ABVP/5	SD/35	13
MOPP7-02	III	20	MOPP/5 ABVP/4	SD/42 PA/25	12
MOPP12-02	III	18	MOPP/5 ABVP/4	SD/60 PA/20	15
MOPP19-02	IIIB	27	MOPP/6 ABVD/6	NO	13
MOPP21-02	IIIB	20	MOPP/6 ABVP/6	PA/30	13
MOPP23-02	I	19	MOPP/5 ABVP/1	SD/20	13
MOPP24-03	I	15	MOPP/10 ABVP/5	SD/20	15
MOPP29-03	III	19	MOPP/1 COPP/1 ABVD/4	SD/21.6 PA/21.6	8
MOPP31-03	IIA	22	MOPP/4 ABVD/4	SD/35	17
MOPP36-04	III	18	MOPP/2 ABVD/8	SD/21.6 P A/21.6	7
Azoospermicos (Grupo IIIb)					
MOPP1-01	IV	19	MOPP/7 COPP/3	NO	9
MOPP9-02	IV	20	MOPP/8 ABVP/8	NO	12
MOPP13-01	II	16	MOPP/6 COPP/1	SD/36	10
MOPP15-01	IV	17	MOPP/8 COPP/1	SD/40 PA/40	10
MOPP22-02	III	20	MOPP/4 ABVP/5	SD/45 PA/30	11
MOPP26-03	IIIA	16	MOPP/4 ABVD/3	SD/25.2	2
MOPP28-03	IIA	17	MOPP/3 ABVD/3	NO	9
MOPP30-03	IIB	38	MOPP/4 ABVD/3	NO	7
MOPP41-04	IVB	24	MOPP/9	NO	16
MOPP43-04	IIIB	20	MOPP/6 ABVD/6	SD/25 PA/21.6	10

^a Todos los pacientes irradiados tuvieron protección gonadal con placas de plomo. SD, Supradiafragmática; PA, Para-aórtica.

5.1.2 Aneuploidías en sangre periférica de pacientes MOPP e individuos sanos

Las aneuploidías se encontraron en todos los grupos estudiados. Para cada grupo, la media de CIN por 1,000 células analizadas de cada individuo fueron: Grupo I, 20.3; Grupo II, 11.6; y Grupo III, 22.2, sin diferencia estadística significativa (Tablas 2 y 3).

Tabla 2. Frecuencia de aneuploidías/1,000 células en individuos sanos y pacientes LH

Código	Hipodiploidías Media (95% IC)	Hiperdiploidías Media (95% IC)	Aneuploidías totales Media (95% IC)
Grupo I	19.8 (10.9 – 28.6)	0.55 (0 – 1.2)	20.3 (11.5 - 29.1)
Grupo II	11.2 (0.18 – 22.2)	0.4 (0 – 1.5)	11.6 (0.47 – 22.7)
Grupo III	21.7 (13.2 – 30.2)	0.5 (0.11 – 0.89)	22.2 (13.6 – 30.8)

IC, Intervalos de confianza

Los cromosomas que estuvieron involucrados con mayor frecuencia en trisomías, fueron el 21 y el Y, seguido por el 5 y X. Los que se perdieron con mayor frecuencia fueron el 21, 22 y Y, seguido por los cromosomas 12, 18, 19 y 20. En general, los cromosomas de los grupos A, B, C y el X, se perdieron pocas veces en los grupos estudiados, mientras que los cromosomas acrocéntricos de los grupos D, G y el Y, se perdieron con mayor frecuencia (Gráfica 1).

Tabla 3. Frecuencia de alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales por grupo^a

Tipo de alteración	Grupo I Individuos sanos	Grupo II Pacientes LH Pre-tratamiento	Grupo III Pacientes LH Post-tratamiento	Valor <i>P</i>^b
Aneuploidías (CIN) Media (95% IC)	20.3 (11.5 – 29.1)	11.6 (0.47- 22.7)	22.2 (13.6 – 30.8)	0.55
Aberraciones estructurales (Rupturas^c) Media (95% IC)	0.73 (0 - 1.47)	0.2 (0 - 0.76)	1.95 (0.8 – 3.1)	0.13
GCR Media (95% IC)	0.18 (0 – 0.59)	0	6 (1.37 – 10.6)	0.002
Células con GCR Media (95% IC)	0.18 (0 – 0.59)	0	2.05 (0.9 – 3.2)	0.002
Rupturas cromosómicas/ GCR^d Media (95% IC)	0.36 (0 – 1.17)	0	11.9 (3 – 20.9)	0.002

^a Frecuencias por 1,000 células

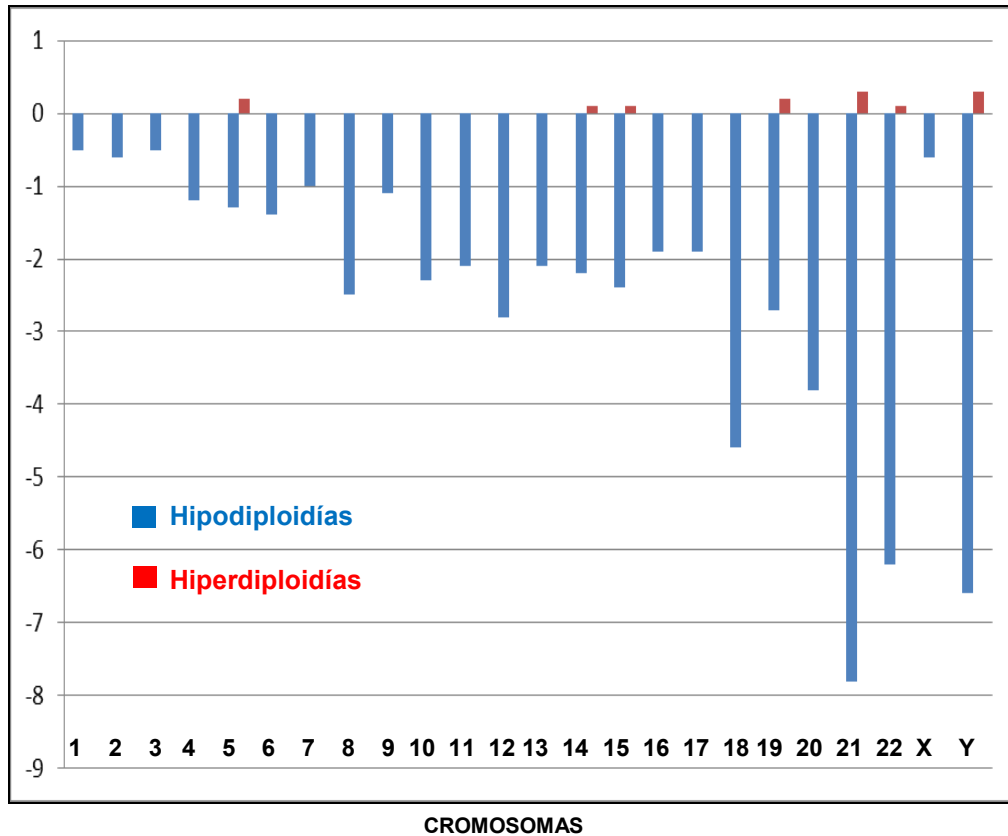
^b valor p obtenido con la prueba Kruskal-Wallis, al comparar la media de la frecuencia de aberraciones/individuo entre los tres grupos estudiados.

^c Rupturas cromosómicas y cromatídicas

^d Número de eventos/célula= Número total de rupturas cromosómicas por célula. En el caso de cromosomas marcadores sin caracterización específica, se asumió que se presentaban dos rupturas por marcador.

CIN= Inestabilidad cromosómica (aneuploidía), IC= intervalo de confianza, GCR= rearreglos cromosómicos mayores

Gráfica 1. Frecuencia de hipodiploidías e hiperdiploidías por cromosoma en los tres grupos estudiados



5.1.3 Rupturas cromosómicas y GCR en sangre periférica de pacientes MOPP e individuos sanos

Las rupturas se detectaron en 4 de 11 individuos del grupo I, en 1 de 5 individuos del grupo II y en 12 de 20 del grupo III (Tablas 3 y 4). Los GCR se presentaron en 1 de 11 individuos sanos y en 13 de 20 pacientes post-tratamiento; no se encontraron en ningún paciente LH pre-tratamiento. La frecuencia de individuos con GCR mostró diferencia significativa entre los tres grupos ($P = 0.005$), así como la frecuencia de GCR/1,000 células analizadas entre grupos ($P = 0.002$) (Tablas 3 y 4). Una de las alteraciones encontrada en el grupo I, es una translocación entre los cromosomas 7 y 14, lo cual se ha encontrado en individuos sanos con una frecuencia de 1/44 (77).

Dentro del grupo III, 13 pacientes tuvieron niveles de GCR con un rango desde 1-8 células con alteraciones, 4 de estos pacientes presentaron sólo una célula aberrante cada uno, mientras que 9 pacientes tuvieron múltiples células aberrantes en donde se involucraban diferentes cromosomas y sólo un paciente (MOPP28) mostró un evento clonal, en donde tres células tenían la misma alteración: del(17)(p11.2) (Tabla 4). Estos hallazgos, son consistentes con el amplio rango de eventos de rupturas de DNA que se encontraron, desde 8 hasta 32 eventos por célula.

El tipo de aberraciones cromosómicas que se han visto asociadas a la radiación, incluyen principalmente cromosomas dicéntricos, los cuales no se observaron en este estudio. No se encontraron diferencias en la frecuencia de rupturas y GCR al comparar el grupo de pacientes que recibieron quimioterapia vs los que no recibieron radioterapia junto con el tratamiento MOPP y tampoco al comparar el grupo de pacientes con espermatozoides vs el grupo de azoospermicos. El análisis de regresión mostró que la frecuencia de GCR, no se ve afectada al considerar el tiempo transcurrido desde el último tratamiento ($P=0.382$).

Tabla 4. Frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales por 1,000 células

Código	Rupturas ^a		Rearreglos cromosómicos grandes (GCR)		CA ^b	Ev ^c
	Chs	Cht	GCR no-balanceado	GCR balanceado		
Inviduos sanos GRUPO I						
NL4-01	0	0			0	0
NL7-01	2	1			0	0
NL8-01	0	1			0	0
NL9-02	1	1			0	0
NL10-02	0	0			0	0
NL11-03	0	0			0	0
NL12-03	0	0			0	0
NL13-03	0	2	46, XY, del(17)(p?)		1	2
				46, XY, t(7;14)(q34;q11)	1	2
NL14-03	0	0			0	0
NL16-03	0	0			0	0
NL18-03	0	0			0	0
Frecuencia/1,000 células	0.73			0.18	0.18	0.36
Pacientes pre-tratamiento GRUPO II						
Pre-Tx35-04 ^d	0	0			0	0
Pre-Tx39-04 ^d	0	0			0	0
Pre-Tx45-04	0	0			0	0
Pre-Tx51-04	1	0			0	0
Pre-Tx52-04	0	0			0	0
Frecuencia/1,000 células	0.2			0	0	0
Pacientes LH post-tratamiento/con espermatozoides GRUPO IIIa						
MOPP5-02	2	3			0	0
MOPP7-02	0	0	46, XY, add(20)(p?)		1	2
MOPP12-02	2	0	46, XY, add(1)(p?) t(2;9)(?;?)		1	4
MOPP19-02 ^e	2	0	45, múltiples alteraciones 47, XY, +mar		1	38
				45, XY, inv(1)(p22p36.3), -21	2	4
					1	2
MOPP21-02	4	1		46, XY, inv(20)(p11.2p12)	1	2
MOPP23-02	0	0	46, XY, -20, del(7)(q35) , +mar 47, XY, +mar		1	4
					1	2
MOPP24-03	4	2	45, XY, t(9;17) 47, XY, +mar 46, XY, del(6)(q24?) 46, XY, múltiples alt. 46, XY, del(17)(q25) 46, XY, múltiples alt.		1	2
					1	2
				46, XY, inv(11)	1	4
				46, XY, t(4;9)(p16;q32)	1	2
					1	2

MOPP29-03	0	0	48, XY, t(1;2)(q21;q35), del(21)(q11.2q21),+mar1, +mar2	46, XY, inv(12)(p11.2q24.3) 48, XY, t(1;2)(q21;q35), del(21)(q11.2q21),+mar1, +mar2	1 1	2 8
MOPP31-03	0	0			0	0
MOPP36-04	0	1	48, múltiples alt., + 1dmin 46, XY, del(X)(q28)		1 1	32 2
				46, XY, inv(14)(q11.2q32)	1	2
Subtotal Grupo IIIa Frecuencia/1,000 células	2			6.2	2.2	12.4
Pacientes LH post-tratamiento/azoospermicos GRUPO IIIb						
MOPP1-01 ^e	1	0			0	0
MOPP9-02 ^e	1	0			0	0
MOPP13-02	3	4			0	0
MOPP15-02	4	3			0	0
MOPP22-02	1	0	45, XY, pbe. t(2;12) (q37;q13), -12, -19, -19, -20, +mar1,+mar2, +mar3 44, múltiples alt. 45, X, múltiples alt. 45, XY, -8, -10, +mar		1 1 1	8 9 11 2
MOPP26-03	2	0	46, XY, -12, +mar 44, Y, múltiples alt. 46, XY, múltiples alt. 48, Y, múltiples alt. 48, XY, +mar1, +mar2 46, Y, -17, +mar1, +mar2 47, XY, múltiples alt. 46, XY, múltiples alt.		1 1 1 1 1 1 1	2 13 11 18 4 4 10 9
MOPP28-03 ^e	0	0	46, XY, del(17)(p11.2p11.2)		3	6
MOPP30-03 ^e	0	0		46, XY, t(5;5)(q21;q31) 46, XY, t(1;3)(p10;q10) 46, XY, t(6;19)(q15;p13.3)	1 1 1	2 2 2
MOPP41-04 ^e	0	0			0	0
MOPP43-04	0	0	47, XY, +mar		1	2
Subtotal Grupo IIIb Frecuencia/1,000 células	1.9			5.8	1.9	11.5
Total Grupo III	1.95			6	2.05	11.9

^a Rupturas= Chs rupturas cromosómicas, Cht rupturas cromatídicas ^b Número de células anormales con la misma alteración cromosómica estructural
^c Número de eventos/célula= total del número de rupturas cromosómicas por célula. En el caso de cromosomas marcadores sin caracterización específica, se asumió la presencia de dos rupturas por marcador. ^d Pacientes Pre-Tx35-04 y Pre-Tx39-04 presentaron alteraciones relacionadas con LH: del(7)(q36)[3] y del(21)(q22)[15], respectivamente. ^e Pacientes tratados solo con quimioterapia

5.2. Análisis molecular

Tomando en cuenta los resultados del estudio citogenético, en donde se observó una alta frecuencia de GCR y considerando la importancia de la detección de alteraciones cromosómicas de tipo balanceado, en esta segunda parte del trabajo, se utilizaron las translocaciones t(9;22), t(8;21) y t(15;17), debido a que además de servir como marcadores de daño genotóxico resultado del uso de agentes antineoplásicos, tienen una relación importante con el tipo de leucemia secundaria al tratamiento (t-AML) que se genera en pacientes LH (58). Este grupo de pacientes, al recibir tratamiento con agentes alquilantes, como la mostaza nitrogenada y la procarbazona, incluidos en el esquema MOPP e inhibidores de la topoisomerasa II como la adriamicina, dentro del esquema ABVD, pueden desarrollar t-AML, que en un 15 a 20% de los casos, se caracteriza por la presencia de alteraciones balanceadas como translocaciones (58), por lo que la siguiente parte del trabajo, se enfocó en la búsqueda de las translocaciones más representativas mediante dos diferentes metodologías moleculares.

5.2.1 Población de estudio

Se estudiaron un total de 25 individuos, que incluyen 14 individuos sanos con un rango de edad de 18 a 28 años y 11 pacientes con LH que recibieron tratamiento antineoplásico: 8 con producción de espermatozoides, con un rango de edad de 15 a 40 años y 3 pacientes azoospermicos, con un rango de edad de 18 a 36 años. Es importante mencionar que solamente a un paciente (MOPP24), se le pudo realizar el análisis por citogenética convencional y el estudio molecular. Todos los pacientes recibieron quimioterapia que incluía MOPP solo o combinado; el tiempo medio entre el

último tratamiento y el estudio fue de 12.3 años (rango, 9-19 años); el tratamiento con radioterapia lo recibieron 10 de 11 pacientes (Tabla 5).

Ninguno de los pacientes LH estudiado estuvo expuesto a agentes clastogénicos o aneugénicos, ya sea de previos tratamientos o hábitos personales.

Tabla 5. Características del grupo de estudio

Código	LH estadio	Edad a la toma de la muestra	Quimioterapia/Ciclos	Radioterapia/ Gys ^a	Años después del tratamiento
Individuos sanos (Grupo I)					
NL8		20			
NL11		18			
NL20		25			
NL26		19			
NL27		25			
NL28		25			
NL29		27			
NL30		28			
NL31		23			
NL32		24			
NL34		20			
NL35		27			
NL36		24			
NL38		26			
Pacientes LH con tratamiento antineoplásico (Grupo II)					
Con espermatozoides (Grupo IIa)					
MOPP17	III	25	MOPP/6 ABVD/6	NO	9
MOPP24	I	15	MOPP/10 ABVP/5	SD/20	15
MOPP59	IIB	20	MOPP/8 ABVP/5	SD/35	14
MOPP81	III	18	MOPP/2 ABVD/4	SD/15.8 PA/21.6	9
MOPP105	IA	29	MOPP/3 ABVD/3	SD/40	11
MOPP106	IA	24	MOPP/3 ABVD/3	PA	17
MOPP114	IIIA	40	MOPP/5	20.6/SD	19
MOPP158	IV	22	MOPP/4 ABVD/7	21.6/SD	12
Azoospermicos (Grupo IIb)					
MOPP8	III	19	MOPP/4 ABVD/8	21.6/SD	9
MOPP20	III	18	MOPP/2 ABVD/8	25/SD	9
MOPP129	II	36	MOPP/6	SD/40 PA/41.7	12

5.2.2 Obtención de cDNA

En la figura 8, se muestra como ejemplo, el corrimiento en gel de agarosa del RNA obtenido de pacientes MOPP e individuos sanos, a partir del cual se obtuvo cDNA para llevar a cabo las reacciones de PCR.

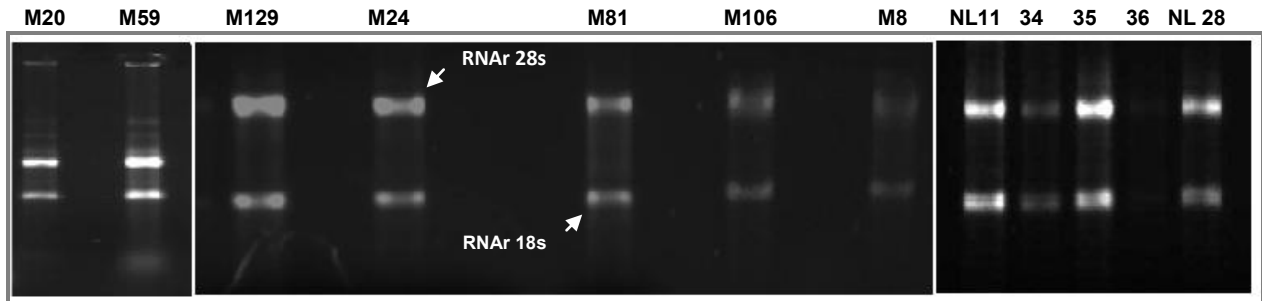


Figura 8. Gel de agarosa al 1% para RNA, teñido con bromuro de etidio.

A partir de RNA con buena calidad e integridad, se sintetizó cDNA y posteriormente se hizo PCR para *GAPDH*, con los resultados obtenidos, se decidió con qué muestras se trabajarían las posteriores reacciones de PCR tiempo real y anidado (Figura 9).

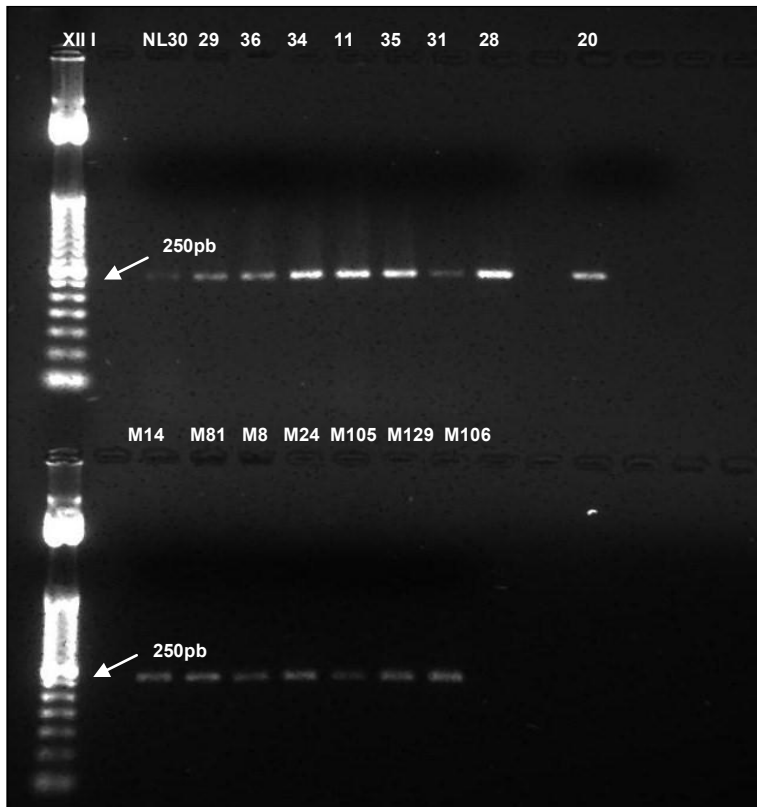


Figura 9. Gel de agarosa al 2% para los productos de *GAPDH*, teñidos con BrEt

5.2.3 PCR tiempo real t(9;22)

Utilizando la línea celular positiva K562, se obtuvo la curva estándar (I-III), para trabajar con la dilución adecuada en cada reacción tanto para la fusión *BCR-ABL1* como para el gen *G6PDH*. Posteriormente se hizo el análisis de ambos genes para cada paciente MOPP e individuo sano. En la figura 10, se muestran los resultados obtenidos al realizar PCR tiempo real para la t(9;22).

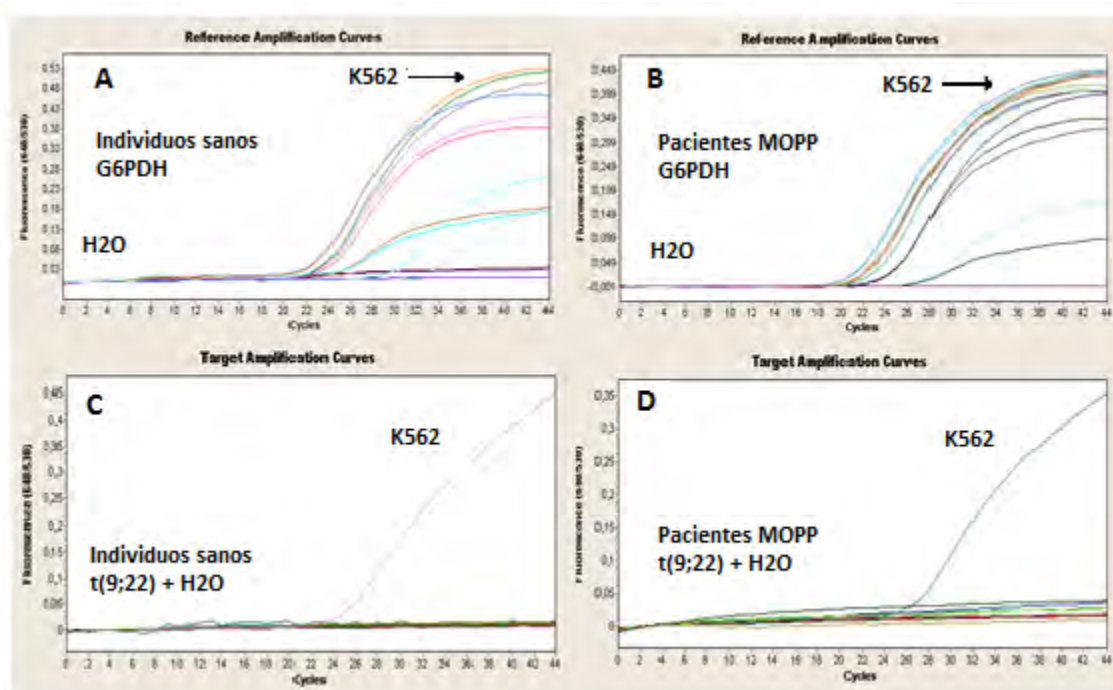


Figura 10. PCR tiempo real t(9;22). A) Gen *G6PDH* positivo para individuos sanos; B) Gen *G6PDH* positivo para pacientes MOPP; C) t(9;22) negativa para individuos sanos y D) t(9;22) negativa para pacientes MOPP.

Tanto para el grupo de individuos sanos como pacientes MOPP, el análisis para la t(9;22) fue negativo; mientras que para *G6PDH*, que se trata de un gen que se expresa constitutivamente (78) y la línea celular K562, positiva para la fusión *BCR-ABL1*, como se esperaba los resultados fueron positivos.

5.2.4 PCR tiempo real t(8;21)

Utilizando la línea celular positiva Kasumi, se obtuvo la curva estándar (dilución $10^1 - 10^7$). Posteriormente se hizo el análisis para cada paciente MOPP e individuo sano, tanto para la fusión problema como para el gen constitutivo (*G6PDH*). En la figura 11, se muestran los resultados obtenidos al realizar PCR tiempo real para la t(8;21).

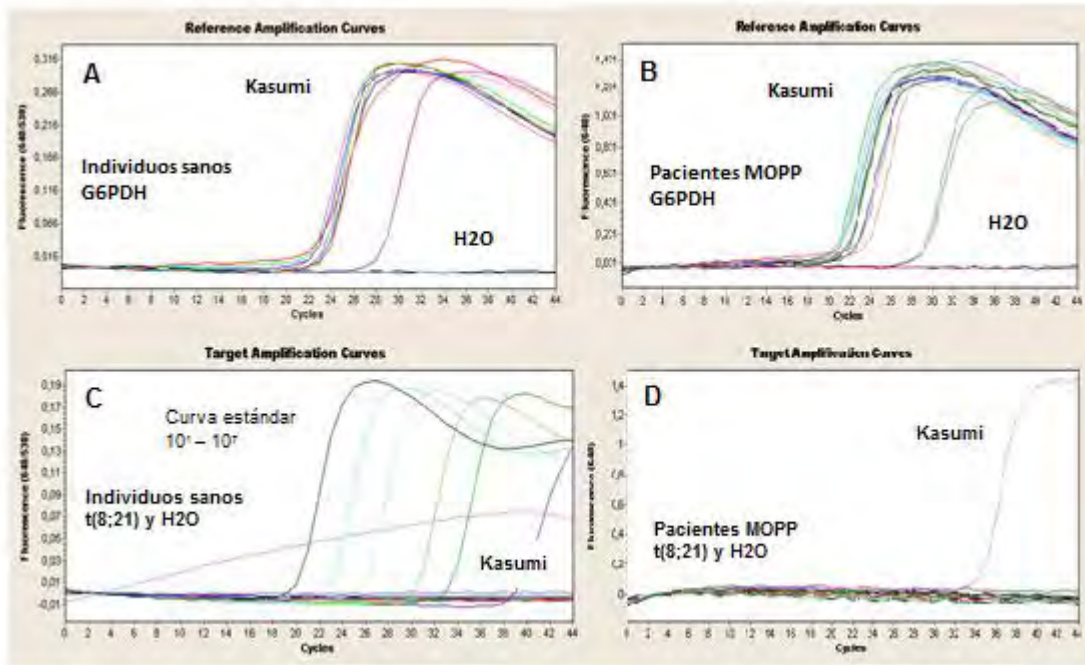


Figura 11. PCR tiempo real t(8;21). A) Gen *G6PDH* positivo para individuos sanos; B) Gen *G6PDH* positivo para pacientes MOPP; C) Curva estándar para diluciones $10^1 - 10^7$ de línea celular positiva Kasumi y t(8;21) negativa para individuos sanos y E) t(8;21) negativa para pacientes MOPP.

Los resultados fueron negativos para la t(8;21) en pacientes MOPP e individuos sanos; el gen *G6PDH* y la línea celular Kasumi positiva para la fusión ETO-*AML1*, fueron positivos.

5.2.5 PCR tiempo real t(15;17)

Se obtuvo la curva estándar (dilución $10^1 - 10^7$) utilizando la línea celular NB4, positiva para la translocación *PML-RARA* y se hizo el análisis para cada paciente MOPP e

individuo sano, tanto para la fusión problema como para el gen *G6PDH*. En la figura 12, se muestran los resultados obtenidos al realizar PCR tiempo real para la t(15;17).

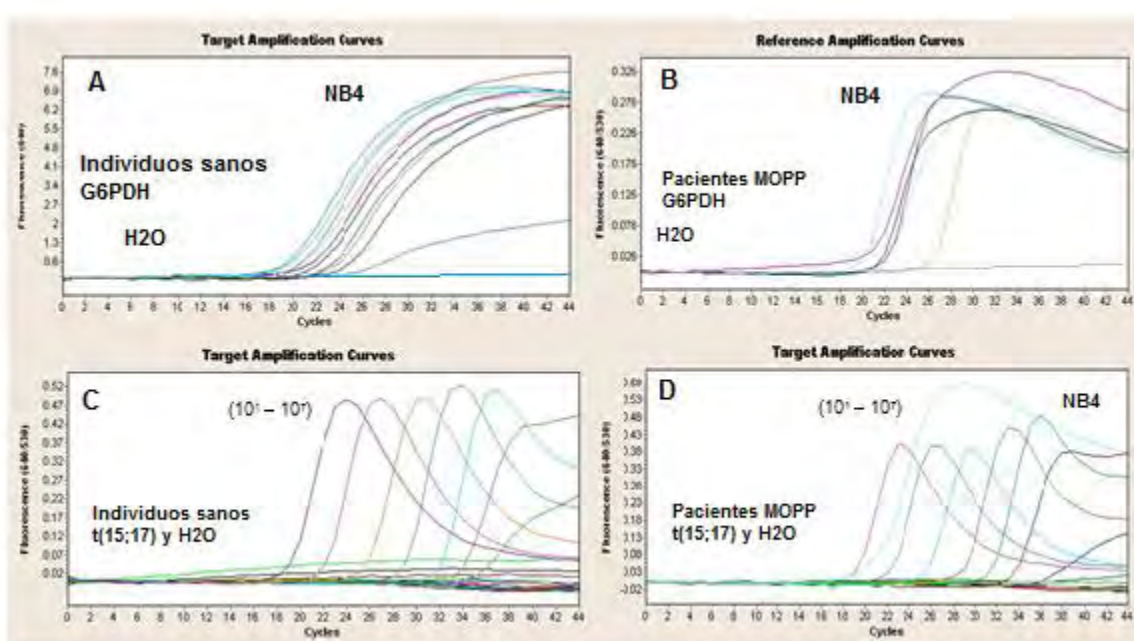


Figura 12. PCR tiempo real t(15;17). A) Curva estándar para diluciones $10^1 - 10^7$ de línea celular positiva NB4; B) Gen *G6PDH* positivo para individuos sanos; C) Gen *G6PDH* positivo para pacientes MOPP; D) t(15;17) negativa para individuos sanos y E) t(15;17) negativa para pacientes MOPP.

En ambos grupos los resultados fueron negativos para la t(15;17) y tanto para *G6PDH* como para la línea celular NB4, los pacientes MOPP y el grupo de individuos sanos, fueron positivos.

Con los resultados obtenidos con PCR tiempo real, se decidió utilizar una técnica con mayor sensibilidad para la detección de este tipo de alteraciones, por lo que en el mismo grupo de pacientes MOPP e individuos sanos, se realizó PCR anidado para las mismas translocaciones.

5.2.6 PCR anidado t(9;22)

La primera prueba de estandarización de la metodología se hizo utilizando la muestra de un paciente positivo para la t(9;22), la línea celular K562 y un control negativo. Se hicieron también diluciones de K562 (1/10 – 1/1000), para conocer el rango de detección de células alteradas con esta metodología (Figura 13). El tamaño de los productos en pares de bases que se esperaba para cada par de “primers” utilizado, fueron los siguientes:

	A + B	C + D	A + B + C + D	C + E3'
p210 b3 – a2	417	360	360	424
p210 b2 – a2	342	285	285	349
p210 b3 – a3	243	186	186	250
p210 b2 – a3	168	111	111	175

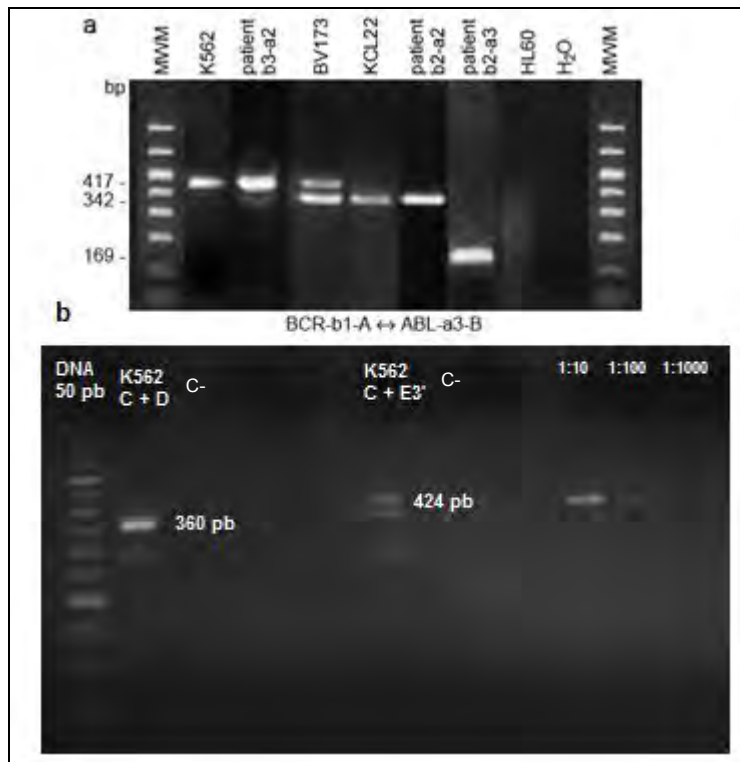


Figura 13. PCR anidado t(9;22). **a)** Esquema que muestra el tamaño de los productos para K562 y pacientes positivos a la alteración (76); **b)** Gel de agarosa al 3% para productos de segundo PCR para K562, paciente positivo para t(9;22) y control negativo.

Una vez estandarizada la reacción, se hizo PCR para pacientes MOPP e individuos sanos, encontrándose los siguientes resultados:

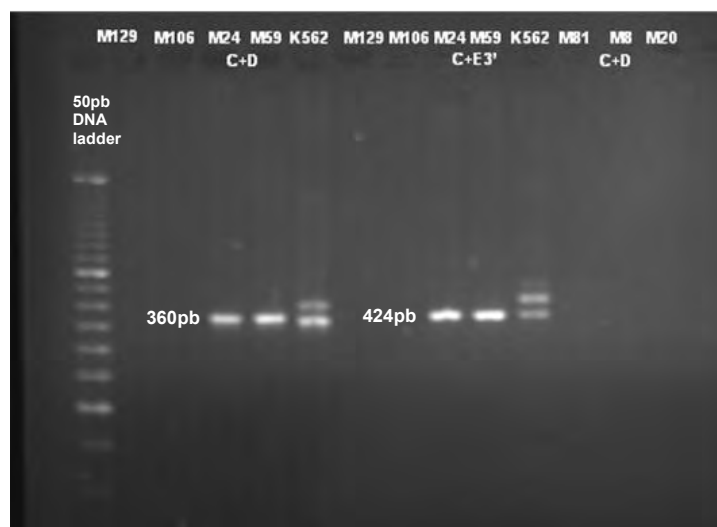


Figura 14. Gel de agarosa al 3% para productos de segundo PCR para K562 y pacientes MOPP.

En la figura 14, se puede observar que para los pacientes M24 y M59, al realizar la segunda PCR con los pares de primers C+D y C+E3', se encontraron resultados positivos para la t(9;22). La misma reacción se repitió para corroborar este hallazgo. Es importante mencionar que el tamaño de los productos obtenidos para los pacientes M24 y M59, pueden diferir en algunos pares de bases con respecto a K562 y entre ellos, debido a que como se mencionó en el análisis de resultados, se trata de una translocación con puntos de ruptura alternativos, la línea celular K562 tiene productos de PCR de tamaños específicos para cada par de "primers", pudiendo ser diferentes a las que presentan los pacientes analizados (76).

Para el paciente M59 se obtuvo una nueva muestra al año del estudio y no se encontraron células positivas para la translocación; para el paciente M24 se obtuvieron dos nuevas muestras, al año y dos años del primer estudio y no se encontraron células positivas mediante PCR anidado e hibridación in situ con fluorescencia (FISH), utilizando sondas de secuencia única específicas para los genes *BCR-ABL1*.

5.2.7 PCR anidado t(8;21)

Se estandarizó la metodología utilizando la línea celular positiva Kasumi y un control negativo (Figura 15). El tamaño (pb) esperado para los productos de PCR para esta translocación fueron:

A + B	C + D	A + B + C + D	D + E5'
395	260	260	338

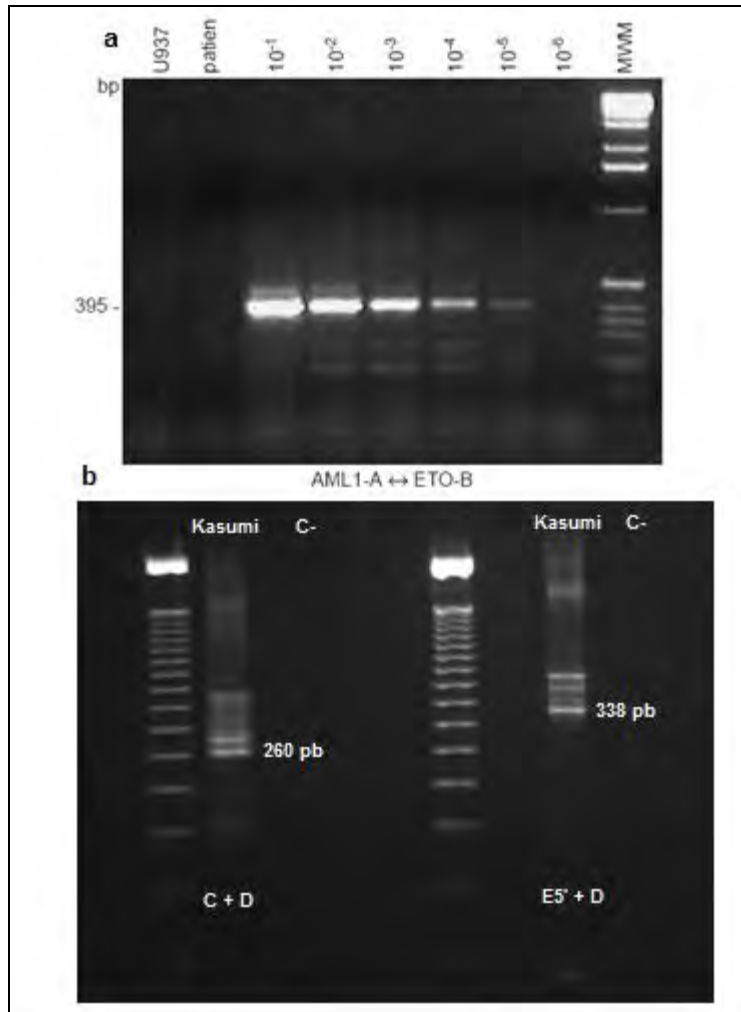


Figura 15. PCR anidado t(8;21). **a)** Esquema que muestra el tamaño de los productos de PCR para Kasumi con diluciones y pacientes positivos a la translocación (76); **b)** Gel de agarosa al 3% para productos de segundo PCR para Kasumi y control negativo.

El resultado para los pacientes MOPP e individuos sanos, fue negativo en todos los casos.

5.2.8 PCR anidado t(15;17)

Para la estandarización de la metodología, se utilizó la línea celular positiva NB4 y un control negativo como control de reacción (Figura 16). El tamaño (pb) esperado de los productos de PCR fueron:

	A1 + B	C1 + D	A1 + B + C1 + D
bcr1	381	214	214
bcr2	345	178	178
bcr3	—	376	289

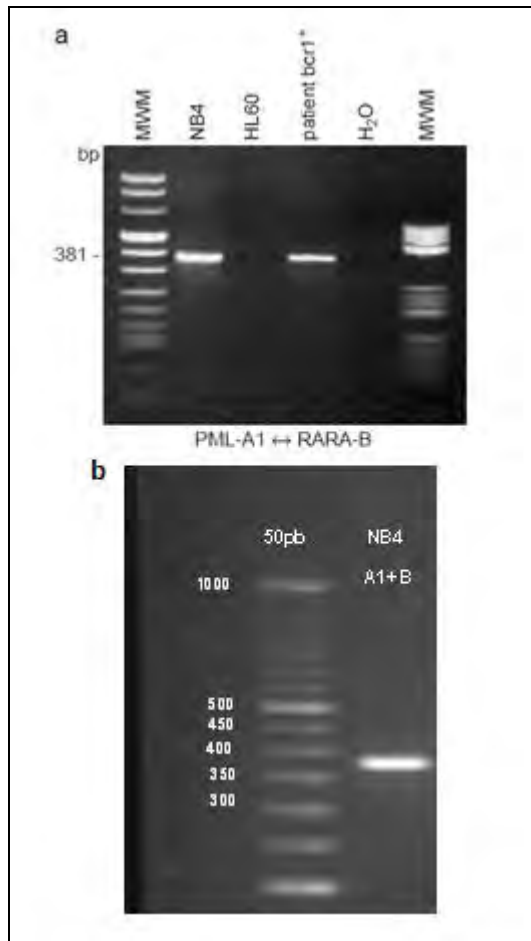


Figura 16. PCR anidado t(15;17). **a)** Esquema que muestra el tamaño de los productos de PCR para NB4 y pacientes positivos para la translocación (76); **b)** Gel de agarosa al 3% para productos de segundo PCR para NB4.

Tanto para el grupo de pacientes MOPP como para el de individuos sanos, los resultados de PCR anidado para la t(15;17) fueron negativos.

6. DISCUSIÓN

6.1. Análisis citogenético

Como resultado del estudio citogenético, no se encontró ningún cariotipo con alguna alteración constitucional. En cuanto a genotoxicidad, se observó una alta frecuencia de GIN, principalmente GCR hasta 17 años después de finalizado el tratamiento con MOPP con o sin radioterapia. Sin embargo, a pesar de que la búsqueda se dirigió a aberraciones de tipo estructural, en todos los grupos se encontraron aberraciones cromosómicas numéricas (CIN); aunque no se encontró diferencia significativa entre los grupos estudiados, se observó un pequeño incremento en los sobrevivientes a LH, que puede estar relacionado directamente con la presencia de compuestos aneugénicos dentro del esquema de quimioterapia que recibieron estos pacientes, como la vincristina y vinblastina (79, 80, 81). En cuanto a las alteraciones estructurales, se encontró un incremento significativo en los pacientes post-tratamiento, sobre todo entre las alteraciones del tipo GCR; la mayoría de las aberraciones observadas fueron al azar y complejas, consistentes con los eventos de inestabilidad genómica inducidos por el tratamiento antineoplásico en pacientes LH.

6.1.1 Daño cromosómico numérico: Aneuploidías (CIN)

A la fecha, no existen reportes previos del efecto de la quimioterapia MOPP sobre la frecuencia de aneuploidías en linfocitos humanos. En este estudio, la frecuencia total de aneuploidías fue del 2% en individuos sanos, 1.1% para pacientes LH pre-tratamiento y 2.2% en el grupo con tratamiento; no se encontraron diferencias significativas entre los grupos analizados (Tablas 2 y 3).

La hiperdiploidía fue la alteración numérica que se observó con menor frecuencia en los tres grupos (Tabla 2 y Gráfica 1) y su frecuencia en el grupo de individuos sanos fue menor a la reportada en estudios previos (0.1 - 4.17%) (82, 83). Por otra parte, la frecuencia de hipodiploidías fue mayor que la de las hiperdiploidías en los tres grupos (Tabla 2 y Gráfica 1) y en el grupo de individuos sanos se observó una frecuencia por debajo del mayor rango reportado en la literatura (1.4 – 15.5%) (84, 85). Estas diferencias pueden deberse al estricto criterio de análisis empleado durante el estudio, lo cual impidió registrar eventos debidos a artefactos técnicos y que fueran contados como aneuploidía. Los cromosomas 21, 22 y Y, se perdieron con mayor frecuencia en los tres grupos; existen reportes en donde estos cromosomas participan de manera importante incrementando el porcentaje de hipodiploidías. En todos los casos el tamaño del cromosoma y la densidad génica parecen ser los factores importantes para que éstas células puedan sobrevivir por lo menos hasta su detección, a pesar de la pérdida de información genética (86, 87). Las células aneuploides pueden ser generadas inmediatamente o durante el tratamiento y pueden desaparecer conforme pasa el tiempo, probablemente porque los desbalances ocasionados por este tipo de alteración, confieren una desventaja selectiva (88).

El hecho de que en este estudio no se haya encontrado una diferencia significativa en los pacientes tratados con MOPP/ABVD resulta interesante, ya que este esquema involucra agentes aneugénicos (vincristina y vinblastina), que de haber actuado sobre las células madre hematopoyéticas, podrían haber tomado dos caminos: a) generar clonas con el mismo cromosoma ganado o perdido o b) generar células madre aneuploides que no pudieron sobreponerse al desbalance génico y fueron conducidas hacia apoptosis. La última posibilidad es la que se apoya con nuestros resultados y

también con los obtenidos previamente en cuanto a la persistencia de daño cromosómico numérico en espermatozoides después de la quimioterapia con NOVP, que incluye el aneugénico vinblastina, en los cuales se observó que la frecuencia de espermatozoides con aneuploidía, regresaba a los valores pre-tratamiento, 3 meses después de iniciado el tratamiento (89,90).

6.1.2 Daño cromosómico estructural: Rupturas de doble hebra de DNA.

Las rupturas cromatídicas y cromosómicas, consideradas como daño inestable, se observaron en los tres grupos estudiados (Tablas 3 y 4). Las rupturas se encontraron en pacientes LH hasta 17 años después del tratamiento. Una posible explicación por la cual se puede observar este tipo de alteraciones en nuestros pacientes hasta 17 años después del tratamiento, es que los linfocitos con aberraciones, sean producto del daño generado en precursores hematopoyéticos. Se ha reportado que los agentes utilizados para el tratamiento de los pacientes con LH, pueden inducir inestabilidad cromosómica en células de medula ósea por afectar a genes que están relacionados con la vigilancia o la reparación de daño al DNA (91).

6.1.3 Daño cromosómico estructural: Rearreglos Cromosómicos Mayores (GCR)

Las aberraciones tipo GCR, fueron las que se encontraron con mayor frecuencia en los pacientes LH, siendo significativamente mayor en el grupo III (Tablas 3 y 4). Todos los GCR encontrados en este estudio fueron del tipo estable: translocaciones, deleciones, inversiones, marcadores cromosómicos de origen desconocido y rearrreglos complejos (64), mientras que los intercambios asimétricos como: dicéntricos, fragmentos acéntricos y anillos, no se observaron en ningún grupo. En los

pacientes LH sin tratamiento, se ha reportado una alta frecuencia de aberraciones cromosómicas, lo que sugiere que estos pacientes presentan una inestabilidad cromosómica basal, ocasionada por la misma enfermedad (92). El presente estudio, 2/5 pacientes pre-tratamiento tuvieron células con GCR: clonas de 3 y 15 células con del(7)(q36) y del(21)(q22) respectivamente (Tabla 4). Estas alteraciones no se consideraron como daño genotóxico ya que representan los cambios citogenéticos de las células cancerosas Reed-Sternberg (92, 93) y pueden en algunos casos estar relacionadas con infecciones virales (94).

Dentro del grupo LH con tratamiento, 13 pacientes tuvieron GCR, de los cuales solo uno tuvo una clona con la misma alteración y 12 tuvieron eventos no-clonales, desde 2 hasta 17 años después del tratamiento. Debido al tiempo transcurrido desde el último tratamiento hasta el momento del estudio, resulta difícil pensar que el daño estructural observado sea resultado directo del tratamiento, lo que sugiere que fue causado por mutaciones en células madre hematopoyéticas (HSC), que afectaron uno o varios de los principales mecanismos que contribuyen a mantener la estabilidad genómica: a) alta fidelidad de la replicación del DNA en fase S del ciclo celular, b) adecuada distribución de los cromosomas entre las células hijas durante la mitosis, c) reparación libre – de error del daño al DNA y d) progresión del ciclo celular y puntos de control (95, 96). Las mutaciones inducidas por el tratamiento en las HSC, pueden afectar alguno de estos mecanismos y el fenotipo mutante puede surgir en la médula ósea y mantenerse por largos periodos de tiempo, por lo que estas HSC anormales, pueden generar constantemente e incorporar a la sangre células con un espectro muy heterogéneo de alteraciones cromosómicas, que fue precisamente lo que se encontró. Una manera indirecta de detectar estas mutaciones, es mediante el estudio de sus

consecuencias, como son las aberraciones cromosómicas que se generan después de mucho tiempo de haber recibido el tratamiento antineoplásico. El encontrar pacientes con este tipo de daño genómico es importante porque significa que pueden continuar generando células con alteraciones cromosómicas diversas, es decir ya tienen el fenotipo mutante que es uno de los primeros pasos hacia el cáncer. En este estudio se encontró más del 50% de pacientes con alteraciones cromosómicas, si sólo el 20% de los sobrevivientes a LH desarrolla un cáncer secundario al tratamiento (29), es evidente entonces que el fenotipo mutante es necesario pero no suficiente para que se desarrolle una neoplasia, por lo que estos pacientes deberán estar bajo estricto control hematológico y oncológico (91). Si esto es representativo de otras estirpes celulares, podrían producirse clonas que tendrían la posibilidad de generar no sólo neoplasias hematopoyéticas sino también tumores sólidos.

Con respecto a la clona para la del(17)(p) que se presentó en uno de los pacientes, ésta se pudo haber originado por cambios genómicos adicionales que le confirieron una ventaja selectiva y permitió que el HSC con la mutación, surgiera como una clona en los linfocitos. La presencia de alteraciones cromosómicas clonales que involucren 17p (17p-/-17), es muy importante ya que pueden relacionarse con mutaciones en el gen supresor de tumor *TP53* (localizado en 17p13). En cáncer secundario al tratamiento, principalmente leucemia secundaria al tratamiento con agentes alquilantes (t-AML), la delección de *TP53* representa la anormalidad genética única más frecuente, detectada en 20-30% de los pacientes con esta leucemia (58, 97). Se sugiere que la inactivación de *TP53*, contribuye a la inestabilidad genómica que se presenta en pacientes con t-AML. Tomando en cuenta que se puede tratar de una alteración relevante en el grupo de pacientes, por la alta probabilidad que tienen de

desarrollar cáncer secundario al tratamiento, es importante considerar el darle un seguimiento cercano a pacientes con alteraciones clonales en la región 17p (98).

En el presente estudio se observó que entre los pacientes que presentaron GCR, no hubo ninguna correlación con hábitos personales, edad, características clínicas y tiempo transcurrido después del tratamiento, igual a lo reportado por M'kacher y cols. (54), quienes analizando 8 pacientes con tratamiento MOPP/ABV, no encontraron correlación entre la frecuencia de GCR y la edad del paciente, tiempo después del tratamiento, estadio de la enfermedad y dosis de quimioterapia, lo cual demuestra una clara variabilidad individual en la respuesta al tratamiento antineoplásico (92). Esta variabilidad individual entre los pacientes, probablemente se debe a diferencias individuales en las enzimas metabolizadoras del DNA o en las capacidades de reparación del daño al DNA (89, 99, 100, 101).

El desarrollo de neoplasias secundarias como resultado del tratamiento es un evento frecuente y entre los sobrevivientes al cáncer, el riesgo es muy alto para pacientes que han sufrido LH (102). Estudios previos han mostrado una clara asociación entre el riesgo de cáncer y la frecuencia de GCR en sangre periférica, por lo que podrían ser utilizados como biomarcadores de riesgo para cáncer (103, 104, 105, 106). A pesar de que en nuestro grupo de pacientes la mayoría de los GCR encontrados fueron no-clonales, se sabe que en general los GCR son la fuente primaria de variación genómica, que puede llevar a la aparición de poblaciones celulares inestables, que podría ser el inicio de la conversión de una célula sana a una célula cancerosa (104). Aquí se encontraron 6 GCR/1,000 linfocitos (Tabla 4) o 6,000 GCR/10⁶ células, por lo que si el daño observado en linfocitos es similar al que ocurre en otros tejidos, la

frecuencia de GCR puede ser un indicador de riesgo de cáncer en cualquier tejido (105, 106).

Tres de las alteraciones encontradas en el grupo III se han visto en pacientes con neoplasias hematológicas o con enfermedades que tienen un alto riesgo de desarrollar cáncer, como el síndrome mielodisplásico (SMD): 1) La del(7)(q35) se presenta en SMD y leucemia mieloide aguda (LMA) 2) La inv(14)(q11q32.1) se presenta en pacientes con t-AML, y 3) La del(17)(p11), que fue la única alteración clonal encontrada en los pacientes del grupo III, se ha detectado en SMD, crisis blástica de leucemia granulocítica crónica, LMA *de novo* y como se mencionó anteriormente, en t-AML secundaria al uso de agentes alquilantes y en pacientes con policitemia vera o trombocitopenia esencial que recibieron tratamiento con hidroxiurea (107). Como consecuencia de los GCR, es probable que oncogenes y genes supresores de tumor pierdan su regulación y se facilite el desarrollo de segundas neoplasias (53, 56).

Los resultados de este estudio, al analizar los 46 cromosomas en 1,000 células por paciente, muestran que el análisis cromosómico con bandas GTG, permite la detección de más alteraciones citogenéticas que lo reportado en estudios previos que realizaron el análisis en cromosomas no-bandeados y mediante FISH (54, 56, 91, 92, 108), y también permite identificar el cromosoma específico involucrado en la alteración estructural, así como los rearrreglos balanceados.

La variación inter-individual en la frecuencia de alteraciones cromosómicas encontrada en nuestro grupo de estudio, es un punto importante a considerar. Dentro del mismo grupo post-tratamiento, se pudieron observar pacientes con numerosas células multi-aberrantes, pacientes con solo una alteración de célula única, un

paciente con una alteración clonal y pacientes sin ninguna alteración. Probablemente, características individuales relacionadas con polimorfismos en genes que intervienen en vías metabólicas, de detoxificación y reparación, así como factores nutricionales puedan afectar directamente la frecuencia y el tipo de alteraciones cromosómicas encontradas (99, 100, 101, 105).

En este estudio, se encontró inestabilidad genómica en linfocitos de pacientes LH tratados con quimioterapia MOPP, hasta 17 años después de finalizado el tratamiento. Tomando en cuenta que estos pacientes son susceptibles a desarrollar cáncer secundario, nuestros resultados sugieren que la inestabilidad genómica puede afectar la función de genes importantes relacionados con la prevención del cáncer. En particular, los intercambios balanceados pueden modificar la expresión de oncogenes y genes supresores de tumor, pero permiten la supervivencia de las células portadoras que no presentan daño cromosómico letal, como ocurre con los intercambios no-balanceados como los cromosomas dicéntricos, y pueden representar un mecanismo por el cual el cáncer secundario surge en estos pacientes.

6.2. Análisis molecular

La detección de translocaciones cromosómicas balanceadas en los pacientes LH es una estrategia valiosa al utilizarla como marcador de genotoxicidad como resultado del tratamiento con quimioterapia y para la búsqueda de las translocaciones específicas que se relacionan con leucemia secundaria al tratamiento con agentes alquilantes e inhibidores de la topoisomerasa II: t(15;17), t(8;21) y t(9;22). Aunque se sabe que la metodología estándar para la detección de alteraciones cromosómicas es el estudio citogenético con BG, ya que permite realizar un monitoreo completo de todo

el genoma (109, 110), este requiere experiencia y tiempo para el análisis, y en algunos casos, la alteración puede ser críptica (submicroscópica) y pasar desapercibida por esta metodología. En estos casos, el uso de las metodologías moleculares como PCR tiempo real y PCR anidado resultan ser lo suficientemente rápidas, específicas y con alta sensibilidad para poder detectar el menor número posible de células con la alteración (111, 112).

En estudios previos asociados con la búsqueda de translocaciones cromosómicas balanceadas como resultado de la quimioterapia en pacientes con linfoma no-Hodgkin, se observó que la sensibilidad de PCR tiempo real para la detección de la t(8;21) y t(9;22) es de 10^{-4} y para la t(15;17) puede ser de 10^{-3} (113).

En el presente estudio, mediante PCR tiempo real para las tres translocaciones no se encontraron resultados positivos en ninguno de los grupos estudiados (11 pacientes MOPP y 14 individuos sanos).

Mediante PCR anidado, en el mismo estudio realizado en un grupo de pacientes con linfoma no-Hodgkin que recibieron tratamiento antineoplásico, la sensibilidad para la detección de la t(8;21) y t(9;22) fue de 10^{-5} , mientras que para la t(15;17) fue 10^{-4} (113). Con los resultados de este trabajo se observó que la sensibilidad de la PCR en tiempo real está por lo menos un log por debajo de la sensibilidad de detección de células anormales que PCR anidado (76, 113). Para la t(9;22), estos resultados parecen repetirse en varios reportes (114, 115); para la t(8;21) en otro estudio, se encontró que la sensibilidad para ambas metodologías fue la misma (116); en el caso de la fusión *PML-RARA*, que se sabe es un blanco difícil de detección, varía de 10^{-4} hasta 10^{-3} (76). Algunos autores reportan que en los casos en los que se espera encontrar muy pocas células alteradas y además se obtuvieron resultados negativos

con PCR tiempo real, sería importante hacer la detección mediante PCR anidado, que tomando en cuenta los resultados obtenidos de diversos estudios, se espera que sea una técnica con mayor sensibilidad (117).

Es importante mencionar que en otros estudios, estas alteraciones han sido detectadas mediante PCR anidado en individuos sanos, donde se espera que el número de células alteradas sea muy bajo o negativo. En un estudio realizado en 73 muestras de sangre periférica de adultos sanos para detectar la fusión génica *BCR-ABL*, se encontró que 22/73 muestras (30%), fueron positivas para la alteración. En un segundo estudio, se encontró que 12 de 16 (75%) adultos sanos, fueron positivos para la fusión *BCR-ABL*. En ninguno de estos trabajos, se intentó volver a detectar el transcrito en posteriores muestras de los mismos individuos (60, 63). Para la *t(8;21)*, en un estudio se observó que 1/496 (0.2%) muestras de sangre de cordón, mostró la fusión *AML1-ETO* (60). Por último, en un grupo de 3 individuos sanos se encontró que 7/600 (1.16%) alícuotas de sangre periférica fueron positivas para la fusión *PML-RARA* (60, 63).

En este estudio, con PCR anidado para la *t(9;22)* se obtuvieron resultados positivos en 2 de 11 pacientes MOPP y negativos en 14 individuos sanos. Con PCR anidado para la *t(8;21)* y la *t(15;17)*, se obtuvieron resultados negativos en 11 pacientes MOPP y en 14 individuos sanos.

La búsqueda de la *t(9;22)* en los pacientes que resultaron positivos, se hizo de manera longitudinal hasta 2 años después y en ambos casos fueron negativas. Estos resultados junto con los reportados para individuos sanos, ponen de manifiesto que probablemente, *BCR-ABL* y otras fusiones génicas pueden formarse en las células hematopoyéticas, sin que necesariamente tengan una ventaja selectiva de

crecimiento es decir, la generación de la translocación cromosómica y la fusión génica, no son suficientes para que se lleve a cabo el proceso de transformación maligna. Se sabe que para que se presente el proceso maligno, deben de presentarse errores en los mecanismos de replicación y reparación del DNA que cumplan con dos criterios: 1) la estructura de la fusión génica debe permitir la formación de una proteína funcional con propiedades oncogénicas, y 2) la translocación cromosómica debe presentarse por primera vez, en precursores hematopoyéticos relativamente tempranos y con capacidad de auto-renovación, además en algunos casos es necesario acumular mutaciones adicionales en la célula, antes de que pueda ocurrir una verdadera expansión maligna (117).

La presencia de estas fusiones génicas en los individuos que se encontraron positivos pudo ocurrir en células diferenciadas o en precursores relativamente maduros, y el sistema inmune fue capaz de reconocer y eliminar las células con la fusión *BCR-ABL*, poco después de su generación lo que ayudó a evitar que se generara una clona maligna (117).

Por lo tanto, desde el punto de vista clínico y tomando en cuenta la alta proporción de pacientes LH que desarrollan cáncer secundario, es importante considerar que la presencia de clones aberrantes, puede representar un daño genético transitorio, que junto con la alta probabilidad que tienen estos pacientes de acumular otras alteraciones genéticas, debido a la inherente inestabilidad genómica asociada a la enfermedad y a probables deficiencias en los sistemas de detoxificación y reparación del DNA, pudieran llevar al desarrollo de t-AML (62).

De las tres alteraciones estudiadas y relacionadas a t-AML, la fusión *BCR-ABL*, es la menos frecuente en esta entidad, por lo que se cree que la presencia de esta

alteración, que también ha sido vista en estudios *in vitro*, pueda reflejar genotoxicidad asociada a quimioterapia, lo que implica que la inducción de esta fusión pueda verse aumentada bajo condiciones genotóxicas (62).

7. CONCLUSIONES

La quimioterapia MOPP, generó inestabilidad genómica en linfocitos de pacientes LH que recibieron tratamiento hasta 17 años antes del estudio. Las aberraciones cromosómicas observadas, fueron primordialmente estructurales y complejas; no se encontró incremento significativo en las alteraciones de tipo numéricas o CIN.

Las alteraciones estructurales son compatibles con la inestabilidad tipo GIN, es decir se presentan al azar o sin blancos determinados y son complejas, consistentes con eventos de inestabilidad genómica inducidos por el tratamiento anti-cáncer.

Nuestros resultados sugieren que el origen de la GIN observada, puede ser el resultado de alteraciones en la función de genes importantes relacionados con el mantenimiento de la estabilidad genómica y además que este se debió presentar en células madre hematopoyéticas, a partir de las cuales se generan constantemente, células diferenciadas con daño cromosómico en diversos puntos del genoma.

La inestabilidad genómica inducida por el tratamiento anti-cáncer, representa lo que posteriormente podría convertirse en un evento inicial para la aparición de cáncer secundario. La presencia de translocaciones cromosómicas balanceadas resulta relevante, ya que permiten la supervivencia de las células que las portan, al no tratarse de un daño cromosómico letal, por lo que pueden representar un mecanismo a partir del cual se origine el cáncer secundario en estos pacientes.

A nivel metodológico, con este trabajo se demostró la importancia de poder identificar las consecuencias del tratamiento antineoplásico, utilizando metodologías citogenéticas y moleculares como herramientas en la detección de genotoxicidad y al mismo tiempo, abriendo la posibilidad de dar un seguimiento al paciente desde el inicio del tratamiento, considerando el riesgo que tienen de desarrollar neoplasias secundarias al tratamiento para LH.

Referencias

1. Diehl V, Stein H, Hummel M, Zollinger R y Connors JM (2003). Hodgkin's lymphoma: Biology and treatment strategies for primary, refractory and relapsed disease. *Hematology* 2: 225-247.
2. Santoro A y Viviani S. Hodgkin's disease (1993) en: Cuitkovic E, Droz JP, Armand JP y Khovry S. Handbook of chemotherapy in clinical oncology, segunda edición. Rhone-Poulenc Rorer, Scientific Communication International Ltd, París, pp.695-701.
3. Schnitzer B (2009). Hodgkin lymphoma. *Hematol Oncol Clin N Am* 23:747-768.
4. Küppers R (2009). The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat Rev* 9:15-27.
5. Roman E y Smith AG (2011). Epidemiology of lymphomas. *Histopathology* 58:4-14.
6. Mani H y Jaffe ES (2009). Hodgkin lymphoma: An update on its biology with newer insights into classification. *Clin Lymphoma Myeloma* 9:206-216.
7. Hudson MM y Donaldson SS (1997). Hodgkin's disease. *Pediatr Clin North Am* 44: 891-906.
8. Pao WJ y Kun LE (1989). Hodgkin's disease in children. *Hematol/Oncol Clin North Am* 3: 345-363.
9. Yung L y Linch D (2003). Hodgkin's lymphoma. *Lancet* 361: 943-951.
10. Thomas RK, Re D, Zander T, Wolf J y Diehl V (2002). Epidemiology and etiology of Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 13 Suppl 4:147-152.
11. Farrell K y Jarrett RF (2011). The molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma. *Histopathology* 58:15-25.
12. Rivera Luna R (2006). Conceptos epidemiológicos del cancer infantil en México en: Rivera Luna R. Hemato-oncología pediátrica. Principios generales, 1ª edición, Editores de textos Mexicanos S.A. de C.V. México, DF. pp1-16.
13. Harris NL (1999). Hodgkin's lymphoma: classification, diagnosis and grading. *Semin Hematol* 36: 220-232.
14. Bräuninger A, Schmitz R, Bechtel D, Renné C, Hansmann ML y Küppers R (2006). Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* 15;118:1853-61. 2006.
15. Re D, Thomas RK, Behringer K y Diehl V (2005). From Hodgkin disease to Hodgkin lymphoma: biologic insights and therapeutic potential. *Blood* 15;105:4553-60.
16. Magrath IT y Johnson JF. Lymphoma in children (1993) en: Cuitkovic E, Droz JP, Armand JP y Khovry S. Handbook of chemotherapy in clinical oncology, segunda edición. Rhone-Poulenc Rorer, Scientific Communication International Ltd, París, pp.702-715.
17. Felderbaum RS (2005). The molecular mechanisms of classic Hodgkin's lymphoma. *Yale J Biol Med* 78:203-210.
18. Popemba S (2005). Immunobiology and pathophysiology of Hodgkin lymphomas. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 231-238.
19. Küppers R (2009). Molecular biology of Hodgkin lymphoma. *Hematology* 491-495.
20. Thomas RK, Re D, Wolf J y Diehl V (2004). Part I: Hodgkin's lymphoma, molecular biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Lancet Oncol* 5:11-18.
21. Ferris Tortajada J, Garcia Castell J, López Andreu JA, Berbel Tornero O y Clar Gimeno S (2001). Factores de riesgo para los linfomas de Hodgkin. *Anales Españoles de Pediatría* 55:239-243.
22. Stiller CA (1998). What causes Hodgkin's disease in children? *Eur J Cancer* 34:523-528.
23. Chang ET, Zheng T, Weir EG, Borowitz M, Mann RB, Spiegelman D y Mueller NE (2004). Childhood social environment and Hodgkin's lymphoma: New findings from a population-based case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13:1361-1370.
24. Küppers R, Schmitz R, Distler V, Renné C, Bräuninger A y Hansmann ML (2005). Pathogenesis of Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol Suppl*(66):26-33.

25. Jarret RF y MacKenzie J (1999). Epstein-Barr virus and other candidate viruses in the pathogenesis of Hodgkin's disease. *Semin Hematol* 36:260-269.
26. Schmitz R, Stanelle J, Hansmann ML and Küppers R (2009). Pathogenesis of classical and lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *Annu Rev Pathol* 4:151-74.
27. Jarrett RF (2003). Risk factors for Hodgkin's lymphoma by EBV status and significance of detection of EBV genomes in serum of patients with EBV associated Hodgkin's lymphoma. *Leukemia&lymphoma* 44 Suppl 3:S27-S32.
28. Kadin M y Rathore B (2010). Hodgkin's lymphoma: Past, present and future. *Expert Opin Pharmacother* 11:2891-2906.
29. Thomson AB y Wallace WHB (2002). Treatment of paediatric Hodgkin's disease: a balance of risks. *Eur J Cancer* 38:468-477.
30. Advani RH y Horning SJ (1999). Treatment of early-stage Hodgkin's disease. *Semin Hematol* 36:270-281.
31. Connors JM, Noordijk EM y Horning SJ (2001). Hodgkin's lymphoma: basing the treatment on the evidence. *Hematology* 2:178-193.
32. Muwakkit S, Geara F, Nabbout B, Farah RA, Shabb NS, Hajjar T y Khogali M (1999). Treatment of pediatric Hodgkin's disease with chemotherapy alone or combined modality therapy. *Radiat Oncol Investig* 7:365-73.
33. Maule M, Scélo G, Pastore G, Brennan P, Hemminki K, Tracey E, Sankila R, Weiderpass E, Olsen JH, McBride ML, Brewster DH, Pompe-Kirn V, Kliewer EV, Chia KS, Tonita JM, Martos C, Jonasson JG, Merletti F y Boffetta P (2007). Risk of second malignant neoplasms after childhood leukemia and lymphoma: an international study. *J Natl Cancer Inst* 16;99:790-800.
34. Castellino SM, Geiger AM, Mertens AC, Leisenring WM, Tooze JA, Goodman P, Stovall M, Robison LL y Hudson MM (2011). Morbidity and mortality in long-term survivors of Hodgkin lymphoma: a report from the childhood cancer survivor study. *Blood* 10;117:1806-16.
35. Witt KL y Bishop JB (1993). Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis. *Eur Urol* 23:136-142
36. Balis MF, Holcenberg JS y Poplack DG. General principles of chemotherapy (1993) en: Pizzo PA y Poplack DG. Principles and practice of pediatric oncology. Segunda edición. JB Lippincott, Philadelphia, pp. 203-245.
37. Vassal G. Alkylating agents: cyclophosphamide, ifosfamide, melphalan, thiotepa, chlorambucil, busulfan (1993) en: Cuitkovic E, Droz JP, Armand JP y Khovry S. Handbook of chemotherapy in clinical oncology, segunda edición. Rhone-Poulenc Rorer, Scientific Communication International Ltd, París, pp.221-232.
38. Chollet P. Dacarbazine (1993) en: Cuitkovic E, Droz JP, Armand JP y Khovry S. Handbook of chemotherapy in clinical oncology, segunda edición. Rhone-Poulenc Rorer, Scientific Communication International Ltd, París, pp.236-239.
39. De Braud F y Bajetta E. Procarbazine (1993) en: Cuitkovic E, Droz JP, Armand JP y Khovry S. Handbook of chemotherapy in clinical oncology, segunda edición. Rhone-Poulenc Rorer, Scientific Communication International Ltd, París, pp.240-241.
40. Sikic BI. Bleomycin (1993) en: Cuitkovic E, Droz JP, Armand JP y Khovry S. Handbook of chemotherapy in clinical oncology, segunda edición. Rhone-Poulenc Rorer, Scientific Communication International Ltd, París, pp.296-298.
41. Dhawan A, Kayani MA, Parry JM, Parry E y Anderson D (2003). Aneugenic and clastogenic effects of doxorubicin in human lymphocytes. *Mutagenesis* 18:487-90.
42. Leone G, Fianchi L, Pagano L y Voso MT (2010). Incidence and susceptibility to therapy-related myeloid neoplasms. *Chem Biol Interact* 184:39-45.
43. Jenkin D, Greenberg M y Fitzgerald A (1996). Second malignant tumours in childhood Hodgkin's disease. *Med Pediatr Oncol* 26: 373-379.
44. Foss Abrahamsen A, Andersen A, Nome O, Jacobsen AB, Holte H, Foss Abrahamsen J y Kvaløy 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* 13:1786-91.

45. Okines A, Thomson CS, Radstone CR, Horsman JM y Hancock BW (2005). Second primary malignancies after treatment for malignant lymphoma. *Br J Cancer* 93(4):418-24.
46. Meistrich ML (1993). Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis. *Eur Urol* 23:136–142
47. Frias S. 2002. Consecuencias genéticas del tratamiento antineoplásico en células germinales de pacientes con cáncer. En: Rivera Luna R, editor. *Oncología pediátrica: Conceptos básicos y clínicos*. México: Intersistemas SA de C.V. pp279–302.
48. Worriolow LJ, Smith AG, Scott K, Andersson M, Ashcroft AJ, DoresGM, Glimelius B, Holowaty E, Jackson GH, Jones GL, Lynch CF, Morgan G, Pukkala E, Scott D, Storm HH, Taylor PR, Vyberg M, Willet E, Travis LB y Allan JM (2008). Polymorphic MLH1 and risk of cancer after methylating chemotherapy for Hodgkin lymphoma *J Med Genet* 45:142–146.
49. Aguilera A y Gomez-González B (2008). Genome instability: A mechanistic view of its causes and consequences. *Nat Rev Genet* 9:204–217.
50. Huang L, Snyder AR y Morgan WF (2003). Radiation-induced genomic instability and its implications for radiation carcinogenesis. *Oncogene* 22:5848–5854.
51. Little JB (2003). Genomic instability and bystander effects: A historical perspective. *Oncogene* 23:173–181.
52. Lorimore SA, Coates PJ y Wright EG (2003). Radiation-induced genomic instability and bystander effects: Inter-related non-targeted effects of exposure to ionizing radiation. *Oncogene* 22:7058–7069.
53. Preston RJ (2005). Bystander effects, genomic instability, adaptive response, and cancer risk assessment for radiation and chemical exposures. *Toxicol Appl Pharmacol* 207 (Suppl 2):550–556.
54. M'Kacher R, Girinsky T, Koscielny S, Dossou J, Violot D, Be´ron-Gaillard N, Ribrag V, Bourhis J, Bernheim A, Parmentier C y Carde P (2003). Baseline and treatment-induced chromosomal abnormalities in peripheral blood lymphocytes of Hodgkin's lymphoma patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 57:321–326.
55. Smith LM, Evans JW, Mori M y Brown JM (1992). The frequency of translocations after treatment for Hodgkin's disease. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 24:737–742.
56. Bilban-Jakopin C y Bilban M (2001). Genotoxic effects of radiotherapy and chemotherapy on circulating lymphocytes in patients with Hodgkin's disease. *Mutat Res* 497:81–88.
57. Potter AM y Watmore A 2001 En: Rooney DE. *Human cytogenetics, malignancy and acquired abnormalities* 3a edition, Oxford University press. New York, USA pp 27-55..
58. Salas C, Pérez-Vera P y Frias S (2011). Genetic abnormalities in leukemia secondary to treatment in patients with Hodgkin's disease. *Rev Inv Clin* 63:53-63.
- 59 Osumi K, Fukui T, Kiyoi H, Kasai M, Kodaera Y, Kudo K, Kato K, Matsuyama T, Naito K, Tanimoto M, Hirai H, Saito H, Ohno R y Naoe T (2002). Rapid screening of leukemia fusion transcripts in acute leukemia by real-time PCR. *Leuk Lymphoma* 43:2291-2299.
60. Janz S, Potter M y Rabkin CS (2003). Lymphoma- and Leukemia –Associated chromosomal translocations in healthy individuals. *Genes, chromosomes and cancer* 36:211-223.
61. Cassinat B, Zassadowski F, Balitrand N, Barbey C, Rain JD, Fenaux P, Degos L, Vidaud M y Chomienne C (2000). Quantitation of minimal residual disease in acute promyelocytic leukemia patients with t(15;17) translocation using real time RT-PCR. *Leukemia* 14:324-8.
62. Basecke J, Podleschny M, Becker A, Seiffert E, et al (2008). Therapy-associated genetic aberrations in patients treated for non-Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol* 141: 52-59.
63. Brassesco MS (2008). Leukemia/lymphoma-associated gene fusions in normal individuals. *Genetics and Mol Res* 7: 782-790.
64. Shaffer L, Slovak M y Campbell L 2009. *ISCN (2009)*. In: Karger, editor. *An International System for Human Nomenclature*. Switzerland: ISCN. pp86–87.
65. Gabert J (1999). Detection of recurrent translocations using real-time PCR: assessment of the technique for diagnosis and detection of minimal residual disease. *Haematologica* 84 Suppl EHA-4:107-9.
66. Instruction Manual 2003. LightCycler t(9;22) quantification kit, Roche.

67. Stahlberg A, Zoric N, Aman P y Kubista M (2005). Quantitative real-time PCR for cancer detection: the lymphoma case. *Expert Rev Mol Diagn* 5:1-10.
68. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N y Patel HR (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn* 5:209-19.
69. Kletzien RF, Harris PK y Foellmi LA (1994). Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a "housekeeping" enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. *FASEB J* 8:174-81.
70. Roche applied science, technical note No. LC 13/2001, LightCycler Relative quantification.
71. Dorak, M.T. *Real-time PCR*. (Taylor & Francis: 2006).
72. Bustin SA, Benes V, Nolan T y Pfaffl MW (2005). Quantitative real-time RT-PCR a perspective. *J Mol Endocrinol* 34:597-601.
73. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R y Mathieu C (2001). An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 25:386-401.
74. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, Barbany G, Cazzaniga G, Cayuela JM, Cavé H, Pane F, Aerts JL, De Micheli D, Thirion X, Pradel V, González M, Viehmann S, Malec M, Saglio G y van Dongen JJ (2003). Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe against Cancer program. *Leukemia* 17:2318-57.
75. Larionov A, Krause A y Miller W (2005). A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics* 21; 6:62.
76. Van Dongen JIM, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, et al (1999). Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 13: 1901- 1928.
77. Hecht F, McCaw BK, Peakman D y Robinson A (1979). New translocations in human lymphocytes: a mutagen monitoring system. *Environ Health Perspect* 31:19-22.
78. M Weisser, T Haferlach, C Schoch, W Hiddemann y S Schnittger (2004). The use of housekeeping genes for real-time PCR-based quantification of fusion gene transcripts in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 18:1551-1553.
79. Balis MF, Holcenberg JS y Poplack DG. General principles of chemotherapy (1993) en: Pizzo PA y Poplack DG. Principles and practice of pediatric oncology. Segunda edición. JB Lippincott, Philadelphia, pp. 203-245.
80. Pouillart P. Vincristine (1993) en: Cuitkovic E, Droz JP, Armand JP y Khovry S. Handbook of chemotherapy in clinical oncology, segunda edición. Rhone-Poulenc Rorer, Scientific Communication International Ltd, París, pp.309-311.
81. Seitz DE y Loehrer PJ. Vinblastine (1993) en: Cuitkovic E, Droz JP, Armand JP y Khovry S. Handbook of chemotherapy in clinical oncology, segunda edición. Rhone-Poulenc Rorer, Scientific Communication International Ltd, París, pp.312-314.
82. Juberg RC, Knops J y Mowrey PN (1985). Increased frequency of lymphocytic mitotic non-disjunction in recurrent spontaneous aborters. *J Med Genet* 22:32-5.
83. Leopardi P, Marcon F, Dobrowolny G, Zijno A y Crebelli R (2002). Influence of donor age on vinblastine-induced chromosome malsegregation in cultured peripheral lymphocytes. *Mutagenesis* 17: 83-88.
84. Cimino MC, Tice RR y Liang JC (1986). Aneuploidy in mammalian cells in vivo. *Mutat Res* 167: 107-122.
85. Eastmond DA y Pinkel D. (1990). Detection of aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence in situ hybridization with chromosome-specific DNA probes. *Mutat Res* 234: 303-318.
86. Hassold T, Abruzzo M, Adkins K, Griffin D, Merrill M, Millie E, Saker D, Shen J y Zaragoza M (1996). Human aneuploidy: incidence, origin and etiology. *Environ Mol Mut* 28: 167-175.

87. Puerto S, Surralles J, Ramirez MJ, Creus A y Marcos R (2002). Equal induction and persistence of chromosome aberrations involving chromosomes with heterogeneous lengths and gene densities. *Cytogenet Cell Genet* 87: 62-68.
88. Yuen KW y Desai A (2008). The wages of CIN. *J Cell Biol* 180:661-3.
89. Frias S, Van-Hummelen P, Meistrich ML, Lowe XR, Hagemester FB, Shelby MD, Bishop JB y Wyrobek AJ (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.
90. Robbins WA, Meistrich ML, Moore D, Hagemester FB, Weier H-U, Cassel MJ, Wilson G, Eskenazi B and Wyrobek AJ (1997). Chemotherapy induces transient sex chromosomal and autosomal aneuploidy in human sperm. *Nature genet* 16: 74-78.
91. Ryabchenko N, Nasanova V, Antoschina M, Fesenko E, Kondrashova T, Ivanova T, Pavlov V, Ryabikhina N y Terekhova A (2003). Persistence of chromosome aberrations in peripheral lymphocytes from Hodgkin's lymphoma remission patients. *Int J Radiat Biol* 79:251-257.
92. M'Kacher R, Girinsky T, Koscielny S, Dossou J, Violot D, Beron-Gillard N, Ribrag V, Bourhis J, Bernheim A, Parmentier C y Carde P (2003). Baseline and treatment-induced chromosomal abnormalities in peripheral blood lymphocytes of Hodgkin's lymphoma patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 57: 321-326.
93. Barrios L, Caballín MR, Mirò R, Fuster C, Berrozpe G, Subías A, Batlle X y Egozcue J (1988). Chromosome abnormalities in peripheral blood lymphocytes from untreated Hodgkin's patients. A possible evidence for chromosome instability. *Hum Genet* 78:320-4.
94. M'Kacher R, Andreoletti L, Flamant S, Milliat F, Girinsky T, Dossou D, Violot D, Assaf E, Clause B, Koscielny S, Bourhis J, Bosq J, Bernheim A, Parmentier C y Carde P (2010). JC human polyomavirus is associated to chromosomal instability in peripheral blood lymphocytes of Hodgkin's lymphoma patients and poor clinical outcome. *Ann Oncol* 21:826-832
95. Wright EG (1999). Inherited and inducible chromosomal instability: A fragile bridge between genome integrity mechanisms and tumorigenesis. *J Pathol* 187: 19-27.
96. Shen Z. 2011. Genomic instability and cancer: An introduction. *J Cell Mol Biol* 3:1-3.
97. Pedersen-Bjergaard J, Andersen MT y Andersen MK (2007). Genetic pathways in the pathogenesis of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 392-397.
98. Side LE, Curtiss NP, Teel K, Kratz C, Wang PW, Larson RA, Le Beau MM y Shannon KM (2004). *RAS*, *FLT3* and *TP53* mutations in therapy-related myeloid malignancies with abnormalities of chromosomes 5 and 7. *Genes, Chromosomes & cancer* 39: 217-223.
99. Bonassi S, Znaor A, Norppa H, Hagmar L (2004). Chromosomal aberrations and risk of cancer in humans: An epidemiologic perspective. *Cytogenet Genome Res* 104:376-382.
100. Hagmar L, Strömberg U, Bonassi S, Hansteen IL, Knudsen LE, Lindholm C, Norppa H (2004). Impact of types of lymphocyte chromosomal aberrations on human cancer risk: Results from Nordic and Italian cohorts. *Cancer Res* 64:2258-2263.
101. Allan JM y Travis LB. 2005. Mechanisms of therapy-related carcinogenesis. *Nat Rev* 5:943-955.
102. Friedman DL, Whitton J, Leisenring W, Mertens AC, Hammond S, Stovall M, Donaldson S, Meadows AT, Robison LL y Neglia JP (2010). Subsequent neoplasms in 5-year survivors of childhood cancer: The childhood cancer survivor study. *J Natl Cancer Inst* 102:1083-1095
103. Blanco JG, Dervieux T, Edick MJ, Mehta PK, Rubnitz JE, Shurtleff S, Raimondi SC, Behm FG, Pui CH y Relling MV (2001). Molecular emergence of acute myeloid leukemia during treatment for acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10338-10343.
104. Heng HH, Liu G, Bremer S, Ye KJ, Stevens J y Ye CJ (2006). Clonal and nonclonal chromosome aberrations and genome variation and aberration. *Genome* 49:195-204.
105. Norppa H, Bonassi S, Hansteen IL, Hagmar L, Strömberg U, Rönner P, Boffetta P, Lindholm C, Gundy S, Lazutka J, Cebulska-Wasilewska A, Fabianov E, Srm RJ, Knudsen LE,

- Barale R y Fucic A (2006). Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutat Res* 600:37–45.
- 106.** Boffetta P, Van der Hel O, Norppa H, Fabianova E, Fucic A, Gundy S, Lazutka J, Cebulska-Wasilewska A, Puskaierova D, Znaor A, Kelecsenyi Z, Kurtinaitis J, Rachtan J, Forni A, Vermeulen R y Bonassi S (2007). Chromosomal aberrations and cancer risk: Results of a cohort study from Central Europe. *Am J Epidemiol* 165:36–43.
- 107.** Mitelman F. 1991. Catalog of chromosome aberrations in cancer. USA - Wiley-Liss. pp485, 489, 503, 1082, 1259, 1286.
- 108.** Papa G, Mauro FR, Anselmo AP, Cimino G, Alimena G, Amadori S, D'Arcangelo E, Giannarelli E, Bosi A y Bellesi G (1984). Acute leukemia in patients treated for Hodgkin's disease. *Br J Haematol* 58:43–52.
- 109.** Calasanz MJ (2001). Revisión de técnicas de citogenética convencional y molecular y su implicación en el diagnóstico y pronóstico del cáncer. *Anales Sis San Navarra* 24(Supl.1): 17-29.
- 110.** Vizmanos JL, Agirre X, Calasanz MJ, García M y Novo FJ (2000). Alteraciones genéticas en las neoplasias hematológicas de origen linfoide: Implicaciones en la práctica clínica. *Anales* 23: 3.
- 111.** Morozova O y Marra MA (2008). From cytogenetics to next-generation sequencing technologies: advances in the detection of genome rearrangements in tumors. *Biochem. Cell Biol* 86: 81-91.
- 112.** Jimenez Velasco A, Román Gómez J, Agirre X, Barrios M, Navarro G, et al (2006). PCR en tiempo real, una nueva herramienta para la toma de decisiones clínicas. *Haematologica* 91(Supl. 1): 27-34.
- 113.** Basecke J, Podleschny M, Becker A, Seiffert E, et al (2008). Therapy-associated genetic aberrations in patients treated for non-Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol* 141: 52-59.
- 114.** Schoch C, Schnittger S, Bursch S, Gerstner D, Hochhaus A, Berger U, Hehlmann R, Hiddemann W y Haferlach T (2002). Comparison of chromosome banding analysis, interphase- and hypermetaphase-FISH, qualitative and quantitative PCR for diagnosis and for follow-up in chronic myeloid leukemia: a study on 350 cases *Leukemia* 16:53-59.
- 115.** Guo JQ, Lin H, Kantarjian H, Talpaz M, Champlin R, Andreeff M, Glassman A y Arlinghaus RB (2002). Comparison of competitive-nested PCR and real-time PCR in detecting BCR-ABL fusion transcripts in chronic myeloid leukemia patients. *Leukemia* 16:2447-53.
- 116.** Wattjes MP, Krauter J, Nagel S, Heidenreich O, Ganser A y Heil G (2000). Comparison of nested competitive RT-PCR and real-time RT-PCR for the detection and quantification of AML1/MTG8 fusion transcripts in t(8;21) positive acute myelogenous leukemia. *Leukemia* 14:329-35.
- 117.** Bose S, Deininger M, Gora-Tybor J, Goldman JM, Melo JV (1998). The presence of typical and atypical BCR-ABL fusion genes in leukocytes of normal individuals: biologic significance and implications for the assessment of minimal residual disease. *Blood*. 92:3362-7.