



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**FRECUENCIA DE TRANSLOCACIONES CROMOSOMICAS
BALANCEADAS EN CÉLULAS SOMÁTICAS Y GERMINALES
DE SOBREVIVIENTES A ENFERMEDAD DE HODGKIN
TRATADOS CON QUIMIOTERAPIA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS
P R E S E N T A

Med. Cir. Omar López De Lara Díaz De León.

DIRECTORES DE TESIS

Dra. Sara Frías Vázquez

Dr. José de Jesús Olivares Trejo

MÉXICO, DF.

MARZO 2008

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTORES DE TESIS

Dra.- Sara frías Vázquez

Dr.- Josè de Jesús Olivares Trejo

ASESORES

Dra.- Minerva Camacho Nuez

M en C.- Bertha Molina Àlvarez

M en C.- Consuelo Salas Labadìa.

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Citogenética del Instituto Nacional de Pediatría y en el Laboratorio No. 1 del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Este proyecto fue parcialmente financiado por el proyecto CONACYT 099-Salud. OLLDL obtuvo financiamiento del Posgrado en Ciencias Genómicas de la UACM

AGRADECIMIENTOS

La Gratitud

Con cuantos bien intencionados me
tropecé,
que reclamando las parcelas de mi
intelecto,
cincelaron en él sus propias versiones de
sus visiones,
sus propias inversiones de ajenas
invenciones pías.

Con ellas me alimentaron.
Con ellas me inseminaron.
Con ellas me conformaron.

Sus versiones, de ellos siguieron siendo,
mi erudición en ellas
engendró entelequias que mi propia
ignorancia,
por inercia siguió tejiendo.

Por eso,
sus verdades se convirtieron
en mis mentiras
que entre laureles, trofeos,
pergaminos y prestigio
sofocaron mi inteligencia.

Fue entonces
que me abrazó la pasión sedienta
por conocer la verdad de la vida.
Mi propia verdad, la de mi propia vida.

¿Habría alguien
que me enseñara esta sabiduría
sin convertirme en su adepto,
sin presentarme la factura?

Al sentir mi amor danzando
con la música traviesa
de Sus seducciones
hacia la Bondad,
la Verdad y la Belleza.
Y realizar que no disertaba
sobre abstracciones
de lo enaltecido,
sino que me lo daba a sentir...
Exhalé un suspiro que lloriqueaba gracias...

Gracias por el respeto a mi dignidad.
Gracias a todas las personas que contribuyeron en esta pequeña parte de mi
vida.

Agradecimiento especial a mis papás, Daniel, Sonia, Damián, Darío, Dania,
Elmo, amistades de DS, Fam. Jiménez, amistades del INP y amigos de la
maestría.

Gracias por el obsequio de recordar mi
libertad.

Gracias por nutrir mi espíritu con tanta
gracia.

Cierro los ojos
y veo el lucero centelleante de Su gracia
que impregna en su abundancia al
Universo,
mismo lucero que veo en el brillo de Sus
ojos
y en Su pícara sonrisa.

Cierro los ojos y siento
la tersa caricia de Sus emanaciones,
que ni distancia, ni tiempo
han tenido su efecto al ser captadas
por este corazón se siente.

Cierro los ojos y escucho
Sus palpitaciones, Sus gorjeos,
el discursivo hálito de Sus seducciones.
El cántico a la vida
en cada una de Sus exhalaciones.

Cierro los ojos y degusto,
explorando, aprendiendo,
sabiendo y aún convirtiendo
en gusto el disgusto.

Cierro los ojos y huelo las rosas,
los azares, las gardenias,
el incienso, los aceites.

Todo esto me sucede
cuando me siento un rato en silencio.
Cerrando los ojos y abriendo el corazón.
Así, permitiéndole a mi vida
tener de cómplice a los sentidos.

Qué puedo yo decir sobre la gratitud,
que no hayan dicho ya las gráciles lágrimas
del eterno trovador que canta en mi
corazón.

¿Qué puedo decir sobre la gratitud...
que no haya sido dicho ya por el pálpito
enardecido
de mis propios suspiros?

Omar López De Lara Díaz De León

INDICE GENERAL

	Página
I ANTECEDENTES	1
I.1 Generalidades de la Enfermedad de Hodgkin	1
I.2 Clasificación de la Enfermedad de Hodgkin de acuerdo a su tipo histológico	2
I.3 Estadios de la Enfermedad de Hodgkin	3
I.4 Estado del arte	
I.4.1 Tratamiento de la Enfermedad de Hodgkin	4
I.4.2. Radioterapia	4
I.4.3 Quimioterapia	5
I.4.4 Modalidad combinada	8
I.5 Factor pronostico	9
I.6 Efecto secundario al tratamiento anticáncer	9
I.7 Aberraciones cromosómicas	10
I.7.1 Origen y formación de las aberraciones cromosómicas estructurales	12
I.8 Antecedentes directos	12
II JUSTIFICACIÓN	14
III HIPÓTESIS	15
IV OBJETIVOS	15
IV.1 Objetivo general	15
IV.2 Objetivos particulares	15
V METODOLOGÍA	16
V.1 Población de estudio	16
V.2 Criterios de inclusión	16
V.3 Criterios de exclusión	17
V.4 Tejidos	17
V.4.1 Sangre periférica	17
V.4.2 Semen	18
V.5 Diagrama de flujo del estudio	19
V.6 Translocaciones cromosómicas balanceadas utilizadas en	20

este estudio.	
V.6.1 t(14;18)	20
V.6.2 t(8;14)	21
V.7 Técnicas	23
V.7.1 Extracción de DNA	23
V.7.1.1 Extracción de DNA de leucocitos	23
V.7.1.2 Extracción de sangre periférica	24
V.7.1.3 Extracción de DNA de espermatozoides	24
V.7.2 Medición de la concentración y pureza del DNA	24
V.7.3 Integridad del DNA	25
V.7.4 PCR en Tiempo Real	25
V.7.5 PCR en Tiempo Final	26
V.8 Diseño de oligonucleotidos para detectar la t(8;14)	27
VI RESULTADOS	28
VI.1 t(14;18)	29
VI.2 t(8;14)	32
VII DISCUSIÓN	39
VII.1 t(14;18)	39
VII.2 t(8;14)	41
VIII CONCLUSIONES	43
IX BIBLIOGRAFÍA	44
X ANEXOS	53
X.1 Anexo 1	53
X.2 Anexo 2	55
X.3 Anexo 3	57

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Palabra Completa
ADN	Acido Desoxirribonucleico
ABVD/P	Adriamicina, Bleomicina, Vinblastina, Dacarbacina, Prednisona
CD	Cluster de diferenciación
COPP	Ciclofosfamida, Oncovin, Procarbazina, Prednisona
ChIVPP	Clorambucil, Oncovin, Procarbazina, Prednisona
E	Espermatozoides
EH	Enfermedad de Hodgkin
EMA	Antígeno de Membrana Epitelial
FISH	Hibridación in situ con Fluorescencia
Gy	Grays
HTLV 1	Virus linfotrópico – T humano, tipo 1.
ICR	Región de Cluster Intermedio
L	Leucocitos
L&H	Célula linfocítica y/o histiocítica
MBR	Mayor punto de ruptura
MCR	Región de cluster menor
μl	Microlitro
μm	Micrometro
ml	Mililitro
MOPP	Mostaza nitrogenada, Oncovin, Procarbazina y Prednisona.
N	Nitrogeno
Nº	Número
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PB	Pares de Bases
RPM	Revoluciones por minuto
ARN	Acido Ribonucleico
RS	Célula de Reed- Sternberg
TBE	Buffer Tris Borato EDTA
TM	Temperatura de alineamiento

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.- Celulas de Reed- Sternberg
- Figura 2.- Los 4 diferentes campos de irradiación
- Figura 3.- Figura representativa de los mecanismos de formación de las translocaciones balanceadas
- Figura 4.- Diseño general del estudio
- Figura 5.- Figura representativa del metodo de identificación de la translocación 14;18 (MBR).
- Figura 6.- Translocación 8;14
- Figura 7.- Integridad del DNAg obtenido de las muestras de 10 sujetos normales.
- Figura 8.- Grafica de PCR en tiempo real
- Figura 9.- Grafica del PCR en tiempo real para detectar la t(14;18) en individuos sanos.
- Figura 10.- Grafica de PCR en tiempo real realizado con muestras de DNA de pacientes tratados con esquema MOPP.
- Figura 11.- Graficas de PCR en tiempo real para búsqueda de la t(14;18) en DNA de leucocitos L y espermatozoides E, de los pacientes tratados con esquema MOPP.
- Figura 12.- Graficas de PCR en tiempo real para la amplificación del gen de referencia TPA en muestras de DNA de pacientes con EH sin tratamiento.
- Figura 13.- Grafica de PCR en tiempo real para detectar la t(14;18) en DNA de leucocitos L y espermatozoides E, de los pacientes con EH sin tratamiento.
- Figura 14.- Localización de los 51 puntos de ruptura reportados en la literatura entre exòn 1 y exòn 2 del gen *C-MYC*.
- Figura 15.- Región de la translocación 8;14 que se ocupo para el diseño de los oligonucleotidos.
- Figura 16.- PCR en tiempo final en DNA de la linea portadora de la t(8;14) y leucocitos normales,, utilizandose los oligonucleotidos reportados por Busch, 2004.
- Figura 17.- Figura representativa del gen completo de *C-MYC* identificando 3 regiones.
- Figura 18.- Figura representativa de la posición de los oligonucleotidos que se usaron como control positivo

Figura 19.- PCR tiempo final utilizando los oligonucleotidos para detectar la integridad del gen C-MYC

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.- Subtipos de Enfermedad de Hodgkin
- Tabla 2.- Aberraciones cromosòmicas balanceadas por número de metafases en pacientes tratados con quimioterapia y radioterapia (Smith, 1992)
- Tabla 3.- Resumen de los datos obtenidos sobre la calidad e integridad del DNA de los grupos estudiados.
- Tabla 4.- Tabla con las características de los oligonucleotidos utilizados en este trabajo para detectar la t(8;14).

I. ANTECEDENTES

I.1 Generalidades de la Enfermedad de Hodgkin

La enfermedad de Hodgkin (EH) se encuadra en el amplio grupo de linfomas malignos, que se caracterizan por hipertrofia de ganglios linfáticos y bazo (Vela-Casas, 2004). Fue descrita por primera vez en 1832 por Thomas Hodgkin, a nivel histológico Sternberg en 1898 y Reed en 1902 encontraron como característica patognomónica las células gigantes binucleadas o multinucleadas que ahora se denominan de Reed-Sternberg (Vela-Casas, 2004; Mesa-Cuervo *et al.*, 1999). La naturaleza maligna de la enfermedad fue aceptada cuando en 1967, Seif y Spriggs confirmaron el origen clonal de las células malignas mediante análisis citogenéticos (Vela-Casas, 2004; Seif y Spriggs, 1967).

La etiología de la EH, no está bien establecida, sin embargo se ha sugerido que podría originarse por una infección del virus Epstein Barr, sea por agentes infecciosos que activan vías extrínsecas a través de receptores antigénicos de linfocitos (*Helicobacter* o Hepatitis C) o bien, que activen vías intrínsecas saltando receptores antigénicos (HTLV 1). También se han asociado con factores como: vivienda única familiar, tamaño pequeño de familia, alto nivel educativo materno y tener familiares con EH. (Vela-Casas, 2004; Dinand y Arya, 2006; Meyer *et al.*, 2004). Las edades promedio en las que se puede presentar la EH es la infantil < de 14 años, adulto joven, de 15-34 años y la última de adulto de > de 55 años. Esto sugiere que la EH pueda tener varias causas. La incidencia anual de EH es de 2.4/100 000 por año. A nivel mundial esta enfermedad representa el 30% de todos los linfomas malignos; en el Instituto Nacional de Pediatría en México ocupa el cuarto lugar dentro del grupo de las neoplasias malignas (Rivera-luna,1994; Diehl, *et al.*, 2003; Yung y Linch, 2003; Dinand y Arya, 2006; Vela -Casas, 2004).

I. 2 Clasificación de la EH de acuerdo a su tipo histológico:

Este linfoma puede o no presentar las células Reed-Sternberg (RS), y su presencia se utiliza para hacer la clasificación.

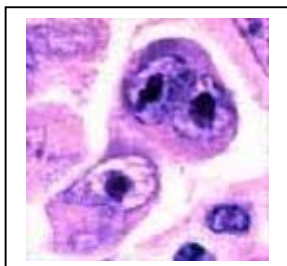


Figura 1. Células Reed-Sternberg.

Las células de Reed- Sternberg son células linfoides de tipo B activadas, son grandes, entre 15-45 μm de diámetro, con abundante citoplasma y núcleo multilobulado o múltiple. La membrana nuclear está intensamente teñida y la delicada red de cromatina da una zona de halo claro alrededor del nucléolo, AS que es también grande y prominente. Estas células de Reed-Sternberg pueden verse en hiperplasias linfoides reactivas, tales como mononucleosis infecciosa y linfomas no-Hodgkin y en enfermedades malignas no linfoides, como carcinoma y sarcoma.

Los marcadores típicos de este tipo de célula son CD45+, CD19+, CD20+, CD22+, CD79a+, cadena J+/-, EMA (epithelial membrana antigen)+/- y CD15-. (Vela-Casas, 2004; Jansen, *et al.*, 1998; Pileri, *et al.*, 2002; Yung, 2003; Mesa-Cuervo, 1999).

a) Linfoma de Hodgkin clásico.- Definido por la presencia de las células RS, con un inmunofenotipo CD20-/+ , CD30+ y CD15+. Una característica importante de esta entidad, es la detección en alrededor del 40% de los casos, de proteínas nucleares y de membrana del virus Epstein Barr (Yung y Linch, 2003; Harris, 1999).

b) Linfoma de Hodgkin con predominio nodular-linfocítico.- Representa el 5% de los casos con Linfoma Hodgkin. A nivel celular tienen una variante de las células RS llamadas células L&H (células linfocíticas y/o histiocíticas). El inmunofenotipo es una parte importante de la definición de esta entidad; expresan antígenos asociados a células B (CD20) y son negativas para CD30 y CD15 (Yung y Linch, 2003; Harris, 1999).

La EH se subdivide de la siguiente manera:

Predominio Linfocitario

Celularidad Mixta

Disminución (depleción) Linfocítica

Esclerosis Nodular

Tabla 1. Subtipos de Enfermedad de Hodgkin

Subtipo	%	Epidemiología	Clinica	Morfología	Histología
Predominio linfocitario	15%	Más frecuente en varones jóvenes	Enfermedad localizada	Linfocitos de apariencia benigna e histiocitos	Arquitectura ganglionar destruida parcial o total
Celularidad mixta	30%	Menores de 10 años	Enfermedad avanzada con extensión extraganglionar	Linfocitos, plasmáticas, eosinófilos, histiocitos y reticulares malignas	Células de Reed/Sternberg y variantes
Depleción linfocitaria	10%	Rara en niño, frecuente en SIDA	Enfermedad diseminada a hueso y médula ósea	Escasos linfocitos y células reticulares malignas	Muchas células de Reed/Sternberg, fibrosis difusa y necrosis
Esclerosis nodular	40%	70% adolescentes	Ganglios cervicales, supraclaviculares y mediastínicos	Células de Reed/Sternberg y variante lacunar	Cápsula ganglionar engrosada, nódulos rodeados de fibras de colágeno

(Vela-Casas, 2004; Bendandi, *et al.*, 2004; Hudson y Donaldson, 1997; Yung, 2003; Harris, 1999; Mesa-Cuervo, 1999; Connors, 2001; Rosenberg, *et al.*, 1970)

I.3 Estadios de la EH

El actual sistema de estadio Ann Arbor, fue adoptado en 1971 y está basado en la forma de diseminación de un área ganglionar a otra adyacente que ocurre en la EH.

Estadio I: compromiso de una sola región o estructura ganglionar linfoide.

Estadio II: Compromiso de de dos o más regiones ganglionares del mismo lado del diafragma

Estadio III: Compromiso de regiones o estructuras ganglionares a ambos lados del diafragma

III 1: con o sin ganglios esplénicos, hiliares, celíacos o porta

III 2: con ganglios paraaórticos ilíacos, mesentéricos

Estadio IV: compromiso de áreas extraganglionares además de las designadas en E

Características modificadoras:

A: sin síntomas

B: fiebre, sudoración nocturna, pérdida de peso

X: enfermedad masiva, ensanchamiento mediastinal $> 1/3$, dimensión máxima de la masa ganglionar > 10 cm

EC: estadio clínico

EP: estadio patológico

(Connors, *et al.*, 2001; Hudson y Donaldson, 1999; Rosenberg, *et al.*, 1970 ; Brandt, *et al.*, 2001)

1.4 Estado del arte

1.4.1 Tratamiento de la EH

Las modalidades del tratamiento se pueden dividir en tres categorías: Radioterapia, Quimioterapia o Esquema combinado.

1.4.2 Radioterapia :

Inicialmente, la radioterapia fue el tratamiento mas utilizado para el control de la EH. Sin embargo, se empezó a observar que solo era conveniente su utilización para pacientes en estadios tempranos de la enfermedad. Posteriormente, la radiación se combinó con fármacos quimioterapeúticos, especialmente en pacientes en estadios tardíos de la enfermedad y con pronósticos desfavorables. (Thompson y Wallace, 2002; Pao y Kun, 1989). Cuando la radioterapia es la única modalidad de tratamiento, se requieren dosis de aproximadamente 35 a 44 Grays (Gy). En combinación con quimioterapia, se necesitan dosis mas bajas de radiación: 30Gy. (Pao y Kun, 1989; Connors, *et al.*, 2001; Thompson y Wallace, 2002)

Campos de irradiación (Figura 2):

a) Manto.- Para pacientes con EH supra-diafragmática

b) Manto y Para-aortico $\pm$ manto esplénico: Conocida también como irradiación linfoide, de manto o para-aortico o nodal sub-total. Para el tratamiento de nódulos linfáticos para-aorticos en adición al campo de manto. El bazo se incluye en pacientes sin previa cirugía y/o esplenectomía.

c) Irradiación total nodal o linfoide total: incluye la mayor parte del tejido linfoide, además del campo pélvico, de manto y para-aortico.

d) Y invertida: En pacientes con EH Infra-diafragmática, incluyendo nodulos linfáticos para-aorticos y pélvicos (Ng, et al, 2002c; Rosenberg, et al, 1970).

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

Campos de irradiación:

Manto

Manto y para-aórtico

Nodal total

Y invertida

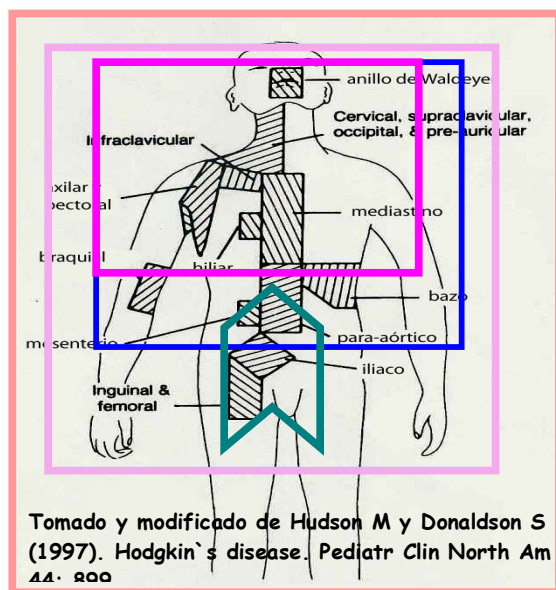


Figura 2.- Los 4 diferentes campos de irradiación, cada campo se representa en diferente color. (Hudson y Donaldson,1997).

I.4.3 Quimioterapia

El desarrollo del esquema MOPP fue la primera terapia sistémica efectiva para el tratamiento de la EH, incluye: Mostaza nitrogenada, Oncovin, Procarbazina y Prednisona, esta combinación a altas dosis administrada en 6 a 8 ciclos, produce una supervivencia de 4 a 11 años en 80% de los pacientes. Para pacientes pediátricos, es importante tomar en cuenta los efectos secundarios

de este tipo de tratamiento, los cuales pueden reducirse sustituyendo el uso de agentes alquilantes como la mostaza nitrogenada por fármacos como la Ciclosfosfamida presente en el esquema COPP que incluye: Ciclofosfamida, Oncovin, Procarbazona, Prednisona (Aguilar-Morales, 2004; Formulario Modelo de la OMS 2004; Frias, 2002; Witt y Bishop, 1996) las características de sus componentes son:

Mostaza nitrogenada.- Pertenece al grupo de agentes alquilantes; es un fármaco que provoca daño al DNA e inhibe la replicación del mismo. Se ha observado un fuerte efecto carcinogénico, mutagénico y teratogénico en células somáticas y germinales (Witt y Bishop, 1996; Frias, 2002). Fue el primer agente alquilante utilizado para el tratamiento de cáncer. Su uso fue muy amplio en combinación con otros fármacos como Vincristina y Procarbazona para el tratamiento de EH, sin embargo desde hace una década aproximadamente, se ha cambiado a otras combinaciones que utilizan menos agentes alquilantes (Aguilar-Morales, 2004; Formulario Modelo de la OMS 2004; Frias, 2002; Witt y Bishop, 1996).

Vincristina (Oncovin).- Alcaloide que se une a la proteína dimérica tubulina, interfiriendo con la polimerización de los microtubulos o alterando su estructura, lo que provoca un bloqueo en la formación del huso mitótico, por lo que puede generar alteraciones cromosómicas numéricas (Aguilar-Morales, 2004; Formulario Modelo de la OMS 2004; Frias, 2002; Witt y Bishop, 1996).

Procarbazona.- Agente alquilante que inhibe la síntesis de proteínas, DNA y RNA y causa daño cromosómico. Este fármaco es un potente carcinógeno que puede provocar leucemia; a largo plazo, se ha observado también azoospermia y efecto teratogenico en los individuos tratados con este agente. Se considera uno de los tres agentes químicos capaces de causar daño genotóxico a células madre germinales (Aguilar-Morales, 2004; Formulario Modelo de la OMS 2004; Frias, 2002; Witt y Bishop, 1996).

Prednisona.- Aunque no se considera como un fármaco anticancerígeno, tiene un papel importante en el tratamiento de leucemias agudas y EH. Es un corticoesteroide análogo del cortisol, con función anti-inflamatoria e inmunomoduladora para el cual no se han reportado efectos mutagénicos y/o carcinogénicos (Aguilar-Morales, 2004; Formulario Modelo de la OMS 2004; Frias, 2002; Witt y Bishop, 1996).

El esquema MOPP fue ampliamente utilizado hasta la última década en que se cambió debido a que podía ser altamente citotóxico, por lo que se desarrollaron otros esquemas, dentro de los cuales el ABVD ha sido el más utilizado a nivel mundial y comprende los siguientes agentes: Adriamicina, Bleomicina, Vinblastina y Dacarbazina, sus características son:

- Adriamicina (Doxorubicina). Antraciclina ampliamente utilizada como antibiótico anti-tumoral. Este tipo de agente se intercala en el DNA y produce ruptura de cadena sencilla y doble. Se relaciona también con la formación de radicales libres, responsables de la actividad antitumoral así como de ciertos efectos secundarios con problemas cardíacos y efectos mutagénicos (Aguilar-Morales, 2004; Formulario Modelo de la OMS 2004; Frias, 2002; Witt y Bishop, 1996).
- Bleomicina. Se considera un radio mimético que después de unirse al DNA produce rupturas en el mismo, como resultado de la producción de un complejo de radicales libres (Aguilar-Morales, 2004; Formulario Modelo de la OMS 2004; Frias, 2002; Witt y Bishop, 1996).
- Vinblastina. Al igual que la vincristina, es un alcaloide inhibidor del ensamblaje del huso mitótico, por lo que se puede considerar también como un aneugénico (Aguilar-Morales, 2004; Formulario Modelo de la OMS 2004; Frias, 2002; Witt y Bishop, 1996).
- Dacarbazina.- Agente alquilante desarrollado como un inhibidor de la biosíntesis de purinas. Se observan efectos secundarios graves a nivel de hígado, riñón y sistema nervioso central, se considera un potencial teratogénico y carcinogénico (Aguilar-Morales, 2004; Formulario Modelo de la OMS 2004; Frias, 2002; Witt y Bishop, 1996).

La aparición de tratamientos como ABVD redujo de manera importante los efectos tóxicos secundarios producidos por el uso de MOPP. Sin embargo, debido a las secuelas cardiopulmonares que se atribuyen a la adriamicina y bleomicina, su uso se limitó a pacientes con presentaciones clínicas favorables y con tratamientos que tuvieran menos ciclos de quimioterapia o se pudieran alternar con otras mezclas con agentes alquilantes como MOPP, COPP ó ChIVPP (Clorambucil, Oncovin, Procarbazina, Prednisona) y en pacientes con

EH en estadios avanzados y pronósticos desfavorables (Aguilar-Morales, 2004; Formulario Modelo de la OMS 2004; Frias, 2002; Witt y Bishop, 1996; Diehl, *et al*, 2003; Bradt, *et al*, 2001) .

I.4.4 Modalidad combinada

El prototipo de quimioterapia combinada es MOPP/ABVD. Esta terapia u otros agentes quimioterapéuticos junto con radioterapia, son muy efectivos en pacientes pediátricos, ya que permiten reducir el campo de irradiación y la dosis, así como utilizar menos ciclos de quimioterapia (generalmente, menos de 6 ciclos) y se ha observado que con esto disminuye de manera favorable la aparición de secuelas de la terapia (Morales, 2004; Formulario Modelo de la OMS 2004; Frias, 2002; Witt y Bishop, 1996; Diehl, *et al*, 2003; Bradt, *et al*, 2001).

Como se ha mencionado, varios de estos agentes quimioterapéuticos han sido probados como clastogénicos y mutagénicos en células somáticas y en modelos animales. En humano se ha observado que pueden provocar daño citotóxico a largo plazo tanto en células somáticas como germinales (Witt, 1996; Meistrich, 1993).

Entre los carcinógenos químicos más significativos en la génesis del cáncer, destacan los agentes alquilantes (metilo, etilo). Un ejemplo de estos agentes es el gas mostaza (El término mostaza se refiere a las ampollas que producen estos agentes en la piel), con grupos suficientemente electrófilos que no requieren activación (carcinógeno directo). Las mostazas nitrogenadas reaccionan con las bases de los ácidos nucleicos, esta reacción se da entre el N 7 de la guanina con la mecloretamina la base modificada puede aparearse anormalmente durante la replicación e inducir mutaciones, pero también puede ser eliminada del ADN.

También puede haber entrecruzamiento de cadenas de ADN. Puesto que los agentes alquilantes modifican el crecimiento celular, la mitosis, la diferenciación y la función de la célula, las células que se están dividiendo más rápido, son las más susceptibles a la acción de estos agentes. En células que se dividen lentamente, los procesos de reparación del ADN pueden revertir los

efectos de la modificación del ADN. Por lo que las mostazas nitrogenadas son, por tanto, mutagenicas y carcinógenas. Sin embargo, y debido a la propia acción de estos agentes sobre las células en división, muchos de ellos se usan en el tratamiento contra el cáncer (Diablos *et al.*, 2004; Lawler y Martin, 1975 ; Alzeer y Scharer, 2006).

I.5 Factor pronostico

Sobrevida

I + II A: 78 a 94 % dependiendo de la edad

I + IIB: 45 a 93%

III + IVA: 76 a 83%

III + IVB: 22 a 80 %

(Vela-Casas, 2004; Yung, 2003; Pileri, 2002; Dennis *et al.*, 2004).

1.6 Efectos secundarios al tratamiento anticáncer.

El gran avance que ha tenido el campo de la oncología en lo que respecta al tratamiento por quimioterapia y radioterapia ha incrementado la sobrevivencia de los pacientes; se estima que el porcentaje de sobrevida 10 años después del tratamiento es de más del 80%(Frias, 2002). 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, lo cual a nivel de células somáticas puede tener serias consecuencias, entre ellas la aparición de neoplasias secundarias como leucemias, linfomas no Hodgkin y diversos tipos de tumores sólidos que pueden originarse por una alteración inducida en el genoma del paciente por los agentes antineoplásicos administrados (Jenkin, 1996; Foss-Abranhamssen, 2002), esto debido a su habilidad para alcanzar el núcleo y ahí dañar el DNA directamente, o interferir con procesos tales como replicación y reparación de DNA, segregación cromosómica o la propia división celular. En células somáticas se ha demostrado que después de la exposición a radiación y a agentes quimioterapeúticos hay una inducción de mutaciones génicas y aberraciones

cromosómicas numéricas y estructurales como consecuencias adversas del tratamiento, sin embargo existe poca información sobre lo que ocurre en el genoma de las células germinales. En células germinales, se ha reportado citotoxicidad que se presenta como azoospermia u oligospermia que puede ser transitoria o definitiva (Meistrich, 1993).

La terapia anticáncer se asocia con gran morbilidad en muchos pacientes y las alteraciones en la función gonadal es uno de los efectos colaterales y tardíos mas comunes. Algunos esquemas de tratamiento se asocian con perdida temporal de la función gonadal, pero en otros, un numero considerable e impredecible de pacientes no recuperan dicha función. La afección de la función gonadal podría estar relacionada con la presencia de daño genético en las células germinales y/o somáticas de las gónadas (Frias, 2002; formulario modelo de la OMS, 2004).

El daño genético en las células puede ser de dos tipos: letal y no letal. En el organismo, el daño letal en las células somáticas puede tener diversas consecuencias; por ejemplo, en células sanguíneas una baja cuenta puede condicionar anemias e infecciones; en células germinales ocasionaría oligospermia o azoospermia transitoria o definitiva. Sin embargo cuando el daño no es letal para las células, las consecuencias pueden ser aun peores porque si ocurre en células somáticas podrían conducir a enfermedades parcialmente genéticas o segundos canceres y si es en las células germinales, podrían dar lugar a abortos o a descendencia anormal (Frias, 2002).

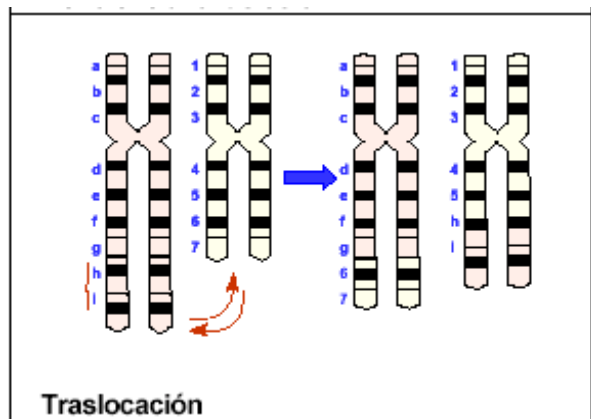
I. 7 Aberraciones cromosómicas

Los cromosomas constituyen los vehículos de la herencia en los organismos superiores. Si bien los cambios cromosómicos numéricos y estructurales constituyen un importante mecanismo en la evolución de las especies debido a las modificaciones que producen en el número o el ordenamiento de los genes, pueden originar también considerables alteraciones fenotípicas en el organismo o en la descendencia. Las aberraciones cromosómicas pueden clasificarse en dos grandes grupos de acuerdo a si el número total de cromosomas difiere de la dotación

cromosómica diploide (anomalías numéricas) o bien la morfología normal de uno o más cromosomas ha sido afectada (anomalías estructurales). Las estructurales se forman por ruptura y reunión de fragmentos cromosómicos. Dentro de estas alteraciones puede haber cambios balanceados o desbalanceados. Se denominan cambios balanceados a aquellos que implican un reordenamiento del material genético por diferentes mecanismos pero que no conllevan pérdida de información hereditaria. Los de tipo desbalanceado, implican en general, pérdida o ganancia de información genética; las translocaciones cromosómicas son alteraciones estructurales y pueden ser balanceadas o desbalanceadas.

Las translocaciones, que pueden ser recíprocas o Robertsonianas y se originan por la ruptura y el intercambio de segmentos generalmente entre cromosomas no homólogos. En las translocaciones recíprocas el número de cromosomas no se altera, mientras que en las translocaciones Robertsonianas involucran 2 cromosomas acrocéntricos que se unen cerca de los centrómeros con pérdida de los brazos cortos y cambia el número cromosómico. Una translocación recíproca se da si dos cromosomas no homólogos se rompen y se intercambian los segmentos rotos. Para este tipo de translocación se necesitan dos rupturas de doble hebra, una en cada cromosoma (Therman, 2000).

La alteración tanto en estructura como en número de cromosomas, generalmente van asociados a cambios fenotípicos, a nivel celular o de organismo, debido a que conllevan un desbalance en la cantidad del material genético. Cuando las alteraciones estructurales son balanceadas como son las inversiones y algunas translocaciones, generalmente las células o los individuos que las portan no presentan ningún efecto fenotípico, ya que toda la información genética está presente, sin embargo estas anomalías no son inocuas en los siguientes casos: a) En un individuo portador de una alteración balanceada. Se producirán gametos desbalanceados y por lo tanto su descendencia presentará alteraciones clínicas (Therman, 2000); b) En una célula portadora de una alteración balanceada pueden existir reordenamientos génicos que modifiquen un gen o su expresión, por ejemplo si la ruptura ocurre a la mitad de dos genes y los segmentos se reúnen, pueden originarse genes quiméricos con funciones diferentes a las originales o bien pueden reordenarse



genes bajo promotores distintos a los propios y modificar la expresión génica. (Therman, 2000; Mckinlay, 2004)

Figura 3.- Figura representativa de los mecanismos de formación de las translocaciones balanceadas.

I.7.1 Origen y formación de las aberraciones cromosómicas estructurales.

Existen dos teorías básicas que intentan responder a los posibles mecanismos de formación de las alteraciones cromosómicas estructurales: la teoría clásica (o teoría de la fractura y reunión) y la teoría recombinante. La teoría más aceptada actualmente es la teoría clásica, es decir, que las fracturas de cromátida constituyen lesiones primarias de las cuales derivan, por un proceso incorrecto de reparación, los diferentes tipos de reordenamientos cromosómicos. Los agentes anticáncer, tanto radiaciones como algunos químicos, por ejemplo los alquilantes, causan rupturas del ADN que pueden convertirse en translocaciones, éstas por ser estables a través de las divisiones celulares, pueden mantenerse por largos períodos de tiempo en un tejido determinado (Therman, 2000, cap 13, cap 14, cap 16; Mckinlay, 2004; Martínez y Folle, Pdf). En especial cuando las translocaciones son balanceadas, las células que las portan pueden no tener consecuencias adversas, a menos que se modifique la expresión génica o bien que se forme una proteína quimérica.

I. 8 Antecedentes directos

Hay estudios que han evaluado los efectos genotóxicos del esquema MOPP. Brandriff en 1994 estudió los espermatozoides de seis sobrevivientes tratados 2-20 años antes y encontró daño genético permanente; El estudio incluyó 6 pacientes (en total 571 células analizadas en metafase) y encontró 9.8% de células con aberraciones estructurales y 1.6% de células con cromosomas extra, mientras que en 24 individuos sanos (5998 células en metafase)

encontraron 6.9% de aberraciones estructurales y 0.8% de aneuploidias.

la frecuencia de aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales fue significativamente mayor al compararla con la frecuencia de un grupo de individuos sanos.

En células somáticas existen también trabajos que dan evidencia sobre el daño que pudo provocar el uso de estas drogas. L.M. Smith en 1992 encontró mediante hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) del cromosoma 4, que los linfocitos de pacientes tratados con terapia combinada (quimioterapia-radioterapia) tenían una mayor frecuencia de aberraciones que cuando se trataban con quimioterapia sola y que la quimioterapia mas radioterapia se relacionaba con la aparición de segundas neoplasias (Smith, 1992).

Pacientes y tratamiento	No. translocaciones/No. metafases
5 pacientes tratados con radiación	0.012
5 pacientes tratados con Quimioterapia + radiación	0.016
3 pacientes con segundas neoplasias	0.019
6 pacientes sin tratamiento	0.0009

Tabla 2.- Aberraciones cromosómicas balanceadas por número de metafase en pacientes tratados con quimioterapia y radioterapia (Smith 1992)

Otros estudios han encontrado una frecuencia alta de alteraciones estructurales inestables del tipo rupturas en linfocitos de pacientes tratados con quimioterapia, radioterapia o combinado (Lalic, 2001; Strom 1998; Bilban-Jakipin y Bilban, 2001; Ryabchenko, et al, 2003), y se ha sugerido que la radio-quimioterapia induce inestabilidad cromosómica en las células expuestas

y que esto es un evento inicial para el desarrollo de segundas neoplasias en los tejidos afectados.

Con todos estos antecedentes, es evidente que los agentes anticáncer pueden generar daño cromosómico numérico y estructural en los pacientes; algunas alteraciones pueden ser de larga duración, sobre todo si no comprometen la viabilidad de la célula portadora y son capaces de pasar de una generación a otra, como es el caso de las translocaciones balanceadas.

II.- JUSTIFICACIÓN

- a) En humano el estudio *in vivo* de las consecuencias genotóxicas de la exposición a agentes clastógenos y mutágenos probados en sistemas *in vitro* o en animales experimentales, sólo se puede realizar en grupos modelo como los de aquellos individuos expuestos a xenobióticos por terapia médica.
- b) La EH muestra un pico de incidencia poco antes de los veinte años de edad, por lo que la mayoría de los sobrevivientes de EH están en edad reproductiva y potencialmente afectados con daño genotóxico.
- c) El tratamiento antineoplásico está dirigido mayormente contra el material genético de las células en la fase S de replicación del DNA y una de las principales características de las células cancerosas es que están en división activa. Sin embargo, los tratamientos antineoplásicos clásicos no tienen un blanco específico, por lo que afectan también a las células normales, tanto somáticas como germinales.
- d) Las alteraciones cromosómicas balanceadas son un tipo de daño no letal, pero que puede generar efectos secundarios muy nocivos como el desarrollo de segundas neoplasias si se encuentra en células somáticas y oligospermia o descendencia con alteraciones cromosómicas si se encuentra en células germinales.

Por lo anterior, es necesario detectar las consecuencias genotóxicas del tratamiento anticáncer y el grupo de pacientes EH tratados con MOPP pueden ser de los más afectados, ya que comprende agentes

alquilantes que pueden alcanzar las células madre germinales y hematopoyéticas.

III.- HIPÓTESIS

El tratamiento antineoplásico utilizado en pacientes con enfermedad de Hodgkin induce alteraciones cromosómicas estructurales de tipo balanceado en células madre hematopoyéticas y germinales que se detectará como daño cromosómico en linfocitos de sangre periférica y en espermatozoides.

IV.- OBJETIVOS

IV. 1 Objetivo General

Determinar si el tratamiento MOPP solo o combinado incrementa la frecuencia de alteraciones cromosómicas estructurales de tipo balanceado en células somáticas y germinales de sobrevivientes a la enfermedad de Hodgkin.

IV. 2 Objetivos particulares

- 1.- Establecer la frecuencia de las translocaciones 8;14 y 14;18 en individuos normales.
- 2.- Detectar daño genotóxico producido por la quimioterapia MOPP, utilizando como un marcador de daño a las translocaciones balanceadas que se relacionan con la generación de Linfoma No Hodgkin (LNH).
- 3.- Comparar los efectos genotóxicos que la quimioterapia MOPP produce en células somáticas (leucocitos) y espermatozoides del mismo paciente.

V. METODOLOGÍA

V. 1 Población de estudio

Este proyecto tiene la aprobación del comité de investigación y del comité de ética del Instituto Nacional de Pediatría. La población de estudio proviene de la clínica de sobrevivientes a Enfermedad de Hodgkin del Instituto Nacional de Pediatría, y todos los pacientes incluidos así como los individuos sanos accedieron voluntariamente a participar en este estudio.

Se les realizó un cuestionario que se encuentra en el anexo 2, todos cumplieron con los criterios de inclusión (se mencionan mas abajo), firmaron una carta de consentimiento informado (anexo 1)

Se estudiaron 3 grupos de individuos

I.- Grupo de 10 sujetos sanos (Grupo control)

II.- Grupo de 5 pacientes con EH, antes del tratamiento

III.- Grupo de 13 pacientes sobrevivientes a EH del INP que fueron tratados con los agentes quimioterapeúticos MOPP/ABVD(P) con o sin radioterapia y que tuvieron como mínimo 2 años de haber concluido su tratamiento antineoplásico.

V. 2 Criterios de inclusión

I.- Para el grupo de individuos sanos:

Edad mínima de 18 años o en adelante; buscándose donadores de edades similares a los pacientes que aceptaron participar en el estudio voluntariamente, firmaron carta de consentimiento informado y contestaron adecuadamente el cuestionario.

II.- Para el grupo de pacientes con EH antes del tratamiento:

Pacientes que se diagnosticaron mediante criterios clínicos, de laboratorio y gabinete como enfermedad de Hodgkin.

Edad de 18 años en adelante.

Que no recibieron ningún tratamiento antineoplásico.

Que aceptaron participar en el estudio voluntariamente, contestaron adecuadamente el cuestionario y firmaron la carta de consentimiento informado.

III.- Para el grupo de los sobrevivientes a EH tratados con MOPP/ABVP:

Fueron pacientes que tuvieron como mínimo dos años de haber concluido la terapia antineoplásica.

Edad de 18 años en adelante.

Que aceptaron participar en el estudio voluntariamente, contestaron adecuadamente el cuestionario y firmaron la carta de consentimiento informado.

V. 3 Criterios de exclusión

Los criterios de exclusión se aplicarán a los 3 grupos ya antes descritos

Fumar más de 10 cigarros al día.

Consumo de drogas.

Enfermedades de origen cromosómico.

Transfusiones sanguíneas (seis meses o menos).

Transplantes de medula ósea.

V. 4 Tejidos

V. 4. 1 Sangre periférica

Para la realización de este estudio, se contó con los leucocitos de cada uno de los grupos de individuos, los cuales ya se tenían recolectados en el laboratorio de Citogenética del Instituto Nacional de Pediatría;

Se utilizaron 5 ml de sangre periférica de cada individuo que se incluyó en el estudio. Las muestras se encontraban en un banco de células en nitrógeno líquido preservando viabilidad, del cual, se obtuvo la muestra para el estudio.

V. 4. 2 Semen

Este material se obtuvo también del banco de muestras recolectadas en el laboratorio de Citogenética del Instituto Nacional de Pediatría; la recolección se realizó de la siguiente manera:

A cada individuo que se incluyó en el estudio se le solicitó una donación de muestra de semen por eyaculación. Una parte de la muestra se congeló directamente y se almacenó a -80°C , para hacer un banco de células (sin preservación de la viabilidad). De esta última alícuota se obtuvo la muestra para este estudio. La otra alícuota se utilizó para estudio de espermatobioscopia.

Se tuvo un total de 28 muestras de sangre periférica y un número variable de muestras de semen ya que algunos sobrevivientes eran oligospermicos, por lo que se solicitaron varias muestras para poder determinar la frecuencia de alteraciones cromosómicas de tipo estructural balanceado específico.

Se extrajo DNA genómico de cada una de las muestras obtenidas y sobre ese DNA, se determinó la frecuencia de las translocaciones $t(14:18)$ y $t(8:14)$. Estas translocaciones se seleccionaron porque se han asociado frecuentemente a linfoma no Hodgkin; este linfoma no Hodgkin es una de las neoplasias post-tratamiento más frecuente en pacientes con EH.

Se seleccionó el PCR en tiempo real para la primera translocación porque podemos detectar una baja cantidad de células con rearrreglos genómicos (hasta 1 en 10^5 células) y se puede cuantificar la presencia de translocaciones, lo cual es suma importancia ya que en individuos normales se ha reportado la presencia de estos rearrreglos con frecuencias basales muy bajas (Figura 4).

V. 5 Diagrama de flujo del estudio

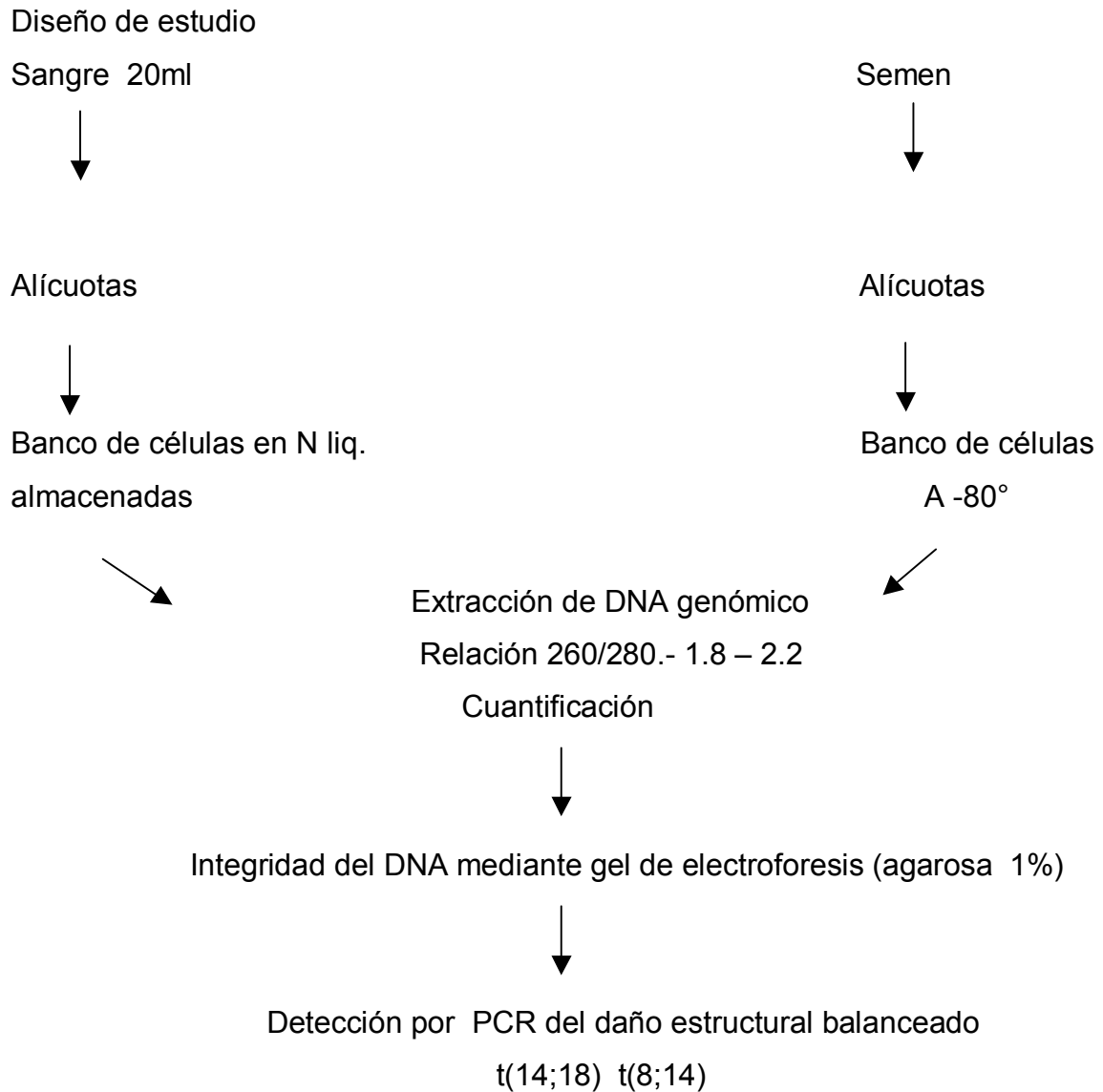


Figura 4.- Diseño general del estudio

V. 6 Translocaciones cromosómicas balanceadas utilizadas en este estudio.

V.6.1 t(14-18)

En esta translocación cromosómica el gen *BCL2* del cromosoma 18q21.3 se coloca en el lugar del gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina *IGH* del cromosoma 14q32.33, sujeto a control del enhancer E μ del *IGH* generando una sobreexpresión de la proteína anti apoptótica BCL2. La supresión de la apoptosis resultante probablemente representa un paso inicial de la transformación maligna que facilita la acumulación de lesiones genómicas que eventualmente llevan a una proliferación celular descontrolada y a una progresión a linfoma folicular (Sanchez-Beato, et al., 2003).

Se sabe que en el cromosoma 18 los puntos de ruptura están en *clusters* en la región 3' no traducida y que son 3 puntos de ruptura; uno es de 150 pb de largo localizado en el tercer exón del gen *BCL2*, conocido como el de mayor punto de ruptura (MBR) ya que se presenta en un 50 – 70% ; el otro punto es de 500 pb de largo, que se encuentra en el exón 1 del gen *BCL2*, llamado la región de cluster menor (MCR) y el ICR ó la región de cluster intermedio (Albinger-Hegyi, et al., 2002) .

En cromosoma 14 los puntos de ruptura están predominantemente encontrados en el elemento de unión (JH) de la cadena pesada de las inmunoglobulinas sugiriendo un proceso aberrante de recombinación como causa primaria de la translocación. (Albinger-Hegyi, et al., 2002) .

Los oligonucleotidos que se van a utilizar en esta translocación van a reconocer la secuencia específica del 3' del exón 3 del *BCL2* que es en donde está el mayor punto de ruptura del cromosoma 18 y la porción conservada de los elementos de unión JH del cromosoma 14. Se genera un producto de 500 pb y permite una excelente amplificación de la translocación.

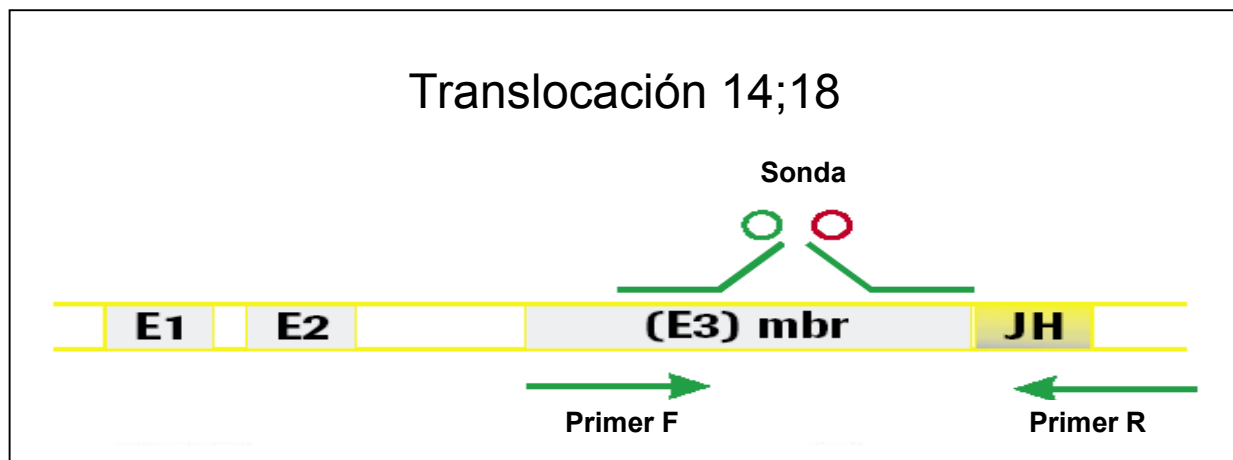


Figura 5.- Figura representativa del método de identificación de la translocación 14:18 (MBR) por medio de las sondas de hibridización.

En la Figura 5, la zona gris está marcada el gen *BCL2* como se encuentra en la translocación, la región 3' del exón 3 es la que se encuentra unida a la inmunoglobulina en la cadena variable, en la región conservada de unión (JH). En amarillo se encuentra identificado el segmento de unión de la inmunoglobulina en la cadena variable. Las flechas de color verde que se encuentran en la parte inferior representan a los oligonucleótidos que ya se encuentran sintetizados. La posición de las flechas equivale a las regiones a amplificar (aproximadamente 500 pb). En la parte superior se representa la sonda de hibridización.

V. 6. 2 t(8;14)

En este linfoma se encuentra involucrada la translocación t(8;14) en la que está involucrado el gen *C-MYC* del cromosoma 8 y la cadena pesada de las inmunoglobulinas del cromosoma 14 (80%); También el gen *C-MYC* puede translocarse en otros locus, que son en el locus de la cadena ligera (λ) en el cromosoma 22 o en la cadena κ en el cromosoma 2 (10%), no considerados en el presente trabajo (Sanchez-Beato, et al., 2003).

Los puntos de ruptura son muy diversos, clasificándose en tres diferentes clases definidas por su localización con respecto al gen *C-MYC*:

Clase I.- El punto de ruptura se encuentra en el exón-intron 1 (Linfoma burkitt esporádico); en la clase II, los puntos de ruptura se encuentran a unas pocas kilobases del exón 1 (Linfoma burkitt endémico); clase III los puntos de ruptura se encuentran a mas de 100 Kb del gen *C-MYC*.

Los puntos de ruptura en el gen de la inmunoglobulina usualmente ocurre en la región VDJ en el Linfoma burkitt endémico, mientras que los puntos de ruptura en el linfoma burkitt esporádico se da en la región switch.

La región que nosotros seleccionamos para estudiar en este trabajo fué la que se encuentra en el exón 1 ya que ahí se agrupan la mayoría de los puntos de ruptura que se describen en la bibliografía. Las rupturas de esta translocación ocurren en un segmento de aproximadamente de 1-10 Kpb (Busch , 2004)

Translocación 8:14

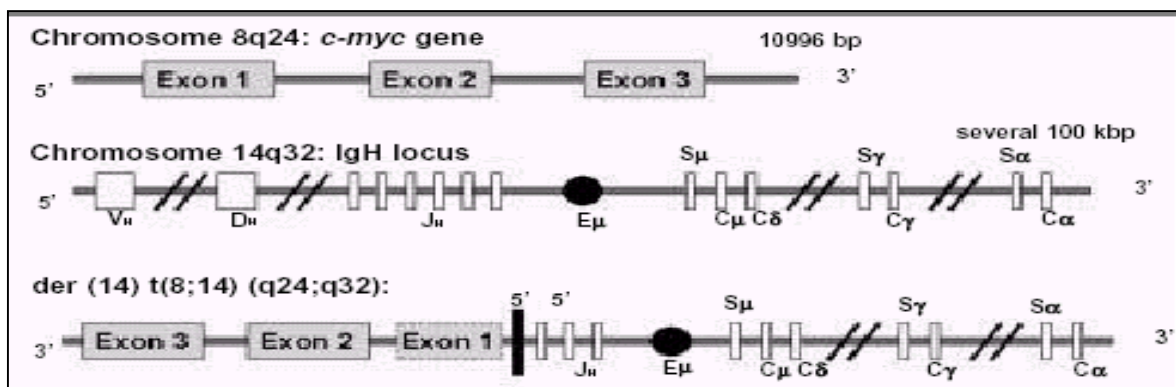


Figura 6.- Esta figura está dividida en 3 imágenes: En la primera imagen se muestra el gen completo *C-MYC* en el cromosoma 8q24. En la imagen de en medio se muestra el locus de IgH (JH) en el cromosoma 14q32. En la última imagen se muestra la translocación 8:14, del lado izquierdo se muestra la orientación divergente en que queda el gen en la translocación (3'-5') y del lado derecho el locus del IgH mostrando la delección de 3 segmentos de unión de la inmunoglobulina.

Al realizarse la translocación del gen *BCL2* o gen *C-MYC* y colocarse en el gen IGH en el cromosoma 14 su expresión pasa a ser regulada por el promotor del gen de la inmunoglobulina, mientras que el fragmento separado

del cromosoma 14 se transloca al cromosoma 18 o al cromosoma 8. Este fragmento incluye a los elementos del VH y DH del gen del IGH, apagándose su transcripción.

Para detectar estas translocaciones, se puede utilizar el DNA genómico como template porque los puntos de ruptura aunque no son únicos se encuentran siempre en posiciones muy cercanas y se pueden amplificar los DNA rearrreglados con los primers que se mencionan más adelante. Ambas translocaciones se buscarán en el cromosoma 14, ya que es en el locus de la IGH en donde se van a colocar. La cantidad de células con la alteración se puede conocer, ya que existe sólo un DNA rearrreglado por célula.

V . 7 Técnicas

V. 7.1 Extracción de DNA

En el caso de sangre periférica, las muestras fueron de dos tipos: algunas se encontraban congeladas y eran leucocitos que habían sido separados mediante leucoprep y congelados preservando viabilidad, otras muestras fueron frescas y se realizó la extracción de DNA directamente de la sangre total.

V.7.1.1 Extracción de DNA de Leucocitos

Para la extracción de DNA de leucocitos se utilizó el paquete comercial Puregene (Gentra, USA). Cada muestra se depositó en un tubo de 1.5 ml y la extracción se realizó a partir del total de células contenidas en cada una de ellas, se centrifugó y el paquete celular se dejó en 20 microlitros de líquido residual. Para romper las células blancas se agregaron 150 microlitros de solución de lisis celular; posteriormente se añadió 0.75 de RNAsa (4 microgramos/ ml) se incubó a 55°C durante 2 horas. El siguiente paso fue la precipitación de proteínas, para lo cual se agregaron 150 µL de solución precipitadora de proteínas que contiene proteinasa K; se centrifugó a 15 000 RPM durante 10 minutos, el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y el DNA se precipitó con 450 µL de isopropanol 100%; la muestra nuevamente se

centrifugó a 15 000 RPM, el sobrenadante se decantó y se agregaron 450 µL de etanol al 70%.

V.7.1.2 Sangre periférica

Se depositaron 5 ml de sangre en un tubo de 50 ml y se agregaron 15 ml de solución RBC, se centrifugó a 4 500 RPM por 10 minutos y se decantó el sobrenadante. Después de esta etapa, la extracción se realizó de la misma manera que con los leucocitos cultivados; pero con diferentes cantidades de reactivos: 5 ml de solución de lisis celular, 25 µL de RNAsa, 20 µL de proteinasa K, 1.67 ml de solución precipitadora de proteínas, 5 ml de isopropanol al 100%, 5 ml de etanol al 70% ; las centrifugaciones se realizaron a 4 500 RPM y las muestras se almacenaron a -70°C.

V.7.1.3. Extracción de DNA de espermatozoides.

La extracción de DNA se realizó con el paquete comercial Puregene (Gentra, USA); se transfirieron 6 – 10 millones de células a un tubo de 1.5 ml, se añadieron 600 microlitros de solución de lisis celular, 24 DTT 1 M, 3 microlitros de proteinasa K (20 mg/ml) y se mezclaron en vortex durante 30 segundos; las muestras se incubaron entre 18-24 horas a 55°C. Posteriormente para la precipitación de proteínas se añadieron 200 µL de solución precipitadora y la muestra se centrifugó a 15 000 RPM durante 10 minutos, se transfirió el sobrenadante a un tubo de 1.5 ml y el DNA se precipitó con 600 µL de isopropanol al 100 %, se centrifugó, se decantó el sobrenadante, y al botón de DNA se le agregaron 600 µL de etanol al 70%. Las muestras se almacenaron a -70°C.

V.7.2 Medición de la concentración y Pureza del DNA

Una vez que se realizaron todas las extracciones de DNA tanto de espermatozoides como de leucocitos, las muestras se centrifugaron a 15 000 RPM durante 10 minutos, el sobrenadante se decantó, los tubos se dejaron destapados para que el etanol al 70% se evaporara. Cuando el botón de DNA se secó y ya no tuvo restos de etanol, se agregaron 25 µL a los botones de

DNA de leucocitos y 50 μ L a los botones de DNA de espermatozoides de solución hidratante de DNA, se incubaron a 65°C durante 1 hora.

Finalizando cada extracción del DNA tanto de las células somáticas como de las células germinales de cada individuo valoramos la concentración y la absorbancia a 260/280 por medio del NANODROP ND 1000 spectrophotometer se seleccionaron sólo aquellas muestras que estuvieron entre los valores de 1.6 – 2.4.

V.7.3 Integridad del DNA

Se valoró mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (un gel diferente para cada tipo celular). Para la preparación del gel de agarosa al 1%, se diluyeron 0.5 gr de agarosa (UltraPure) en 50 ml de amortiguador TBE 1X; la mezcla se calentó hasta que se fundiera totalmente, se dejó enfriar y se añadieron 35 μ L de bromuro de etidio (1 mg/ml); la mezcla se vertió en la cámara de electroforesis y se enfrió a 4°C para que solidificara. Después, la cámara de electroforesis se llenó con amortiguador 1X para que el gel quedara cubierto. Las muestras de DNA fueron descongeladas a temperatura ambiente, se prepararon alícuotas con 1.5 μ L de acarreador sobre papel para-film y a cada gota se añadió 2 μ L de cada DNA, se mezcló y se cargaron en los diferentes pozos. La electroforesis se realizó a 50V durante 1 hora; el gel se colocó en el transiluminador de rayos UV y se fotografió con el sistema digital Olympus sp-350.

V.7.4 PCR en tiempo real

Es una metodología o técnica de amplificación y detección fluorescente simultanea. La emisión de la fluorescencia es proporcional a la cantidad del DNA. La metodología implica el uso de dos secuencias de oligonucleótidos específicos como sondas, cada una marcada con un fluoróforo diferente, comúnmente, el extremo 3' de la sonda donadora con fluoresceína y el extremo 5' de la sonda aceptora con LC Red 640 o LC Red 705. Las dos sondas están diseñadas para hibridar en sus blancos específicos en un arreglo cabeza-cola que permite que ambos fluoróforos estén en estrecha proximidad entre sí. Así, la transferencia de energía de resonancia sólo ocurre cuando

ambas sondas se hibridan al blanco y al realizar la reacción quedan muy próximas entre sí, cuando están separadas de 1 a 5 bases entre las sondas, ocurre la transferencia de energía, que es captada por el equipo como fluorescencia y la cual es proporcional a la cantidad de amplificados, esto se grafica y se establece un umbral, cuando la gráfica lo cruza se le denomina C_t y este valor es muy importante para el análisis de cuantificación de las copias de DNA originales (ver anexo 3). En este trabajo se usó el kit LightCycler t(14;18) quantification kit (mbr) de Roche, que amplifica un segmento de 200pb que corresponde a la región translocada; los oligonucleótidos que se utilizaron detectan el rearreglo de la mbr que es la llamada “major breakpoint region” y que aproximadamente el 70% de las rupturas que ocurren sobre el cromosoma 18 se localizan ahí; el punto de ruptura que localiza sobre el cromosoma 14 está sobre el segmento JH6 del locus de la IgH humana. (Roche, 2001). Todas las reacciones para llevar a cabo la amplificación de esta translocación se hicieron de acuerdo al manual de Roche.

V.7.5 PCR tiempo final

La Técnica de reacción en cadena de la Polimerasa o PCR es una técnica para la síntesis “in vitro” de secuencias específicas de DNA. La técnica se basa en la replicación del ADN por la DNA polimerasa; estas enzimas realizan la síntesis de una cadena complementaria de DNA en el sentido 5’->3’ usando un molde de cadena sencilla, pero a partir de una región de doble cadena. Para amplificar esta región de doble cadena se usan los denominados iniciadores (primers). Son una pareja de oligonucleótidos sintetizados de manera que sean complementarios a cada uno de los extremos 3’ del fragmento de DNA que se desea amplificar.

Partiendo de este principio, la reacción en Cadena de la Polimerasa se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas:

- A) Desnaturalización del ADN doble cadena
- B) Hibridación de los iniciadores a la zona 3’ específica de cada una de las hebras

C) Extensión del cebador por actuación de la DNA polimerasa

En la primera etapa (desnaturalización) la doble hélice de ADN se separa en dos hebras. Para ello se realiza una incubación de la muestra a altas temperaturas (93-97°C). La renaturalización se producirá cuando la temperatura disminuya.

En el segundo paso (hibridación) los cebadores se unen a las zonas 3' complementarias que flanquean el fragmento que queremos amplificar. Se realiza gracias a la bajada de la temperatura (50-65° C)

En la tercera etapa (elongación) se produce la síntesis de una cadena sencilla (produciéndose un fragmento de doble cadena por la complementariedad) en la dirección 5'→ 3' mediante la enzima DNA polimerasa, la cual incorpora los desoxinucleótidos fosfato presentes en el medio siguiendo la cadena molde.

V.8 Diseño de oligonucleótidos para detectar la t(8;14)

Para la translocación 8;14. Realizamos una búsqueda de los puntos de ruptura reportados en la literatura asociados a la t(8;14). obtuvimos la secuencia nucleotídica de cada uno de los genes involucrados, mediante la base de datos PUBMED. Realizamos in-silico la translocación cromosómica mediante el programa Bio-Edit. Identificamos los puntos de ruptura en la secuencia nucleotídica. Para el diseño de los oligonucleótidos, escogimos la región que tuviera el mayor número de puntos de ruptura. Para el cálculo de la temperatura de alineamiento utilizamos el programa Calculo de TM de Oligos de IBT en UNAM para conocer la temperatura de alineamiento que estuviera cercano a 60. Demostramos el funcionamiento de los oligonucleótidos diseñados mediante PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) para detectar la translocación eficientemente.

VI.- RESULTADOS

Para determinar la calidad del DNA extraído de las células somáticas y células germinales de los 28 individuos, se valoró la concentración obtenida, la relación 260/280 la absorbancia por medio del espectro y la integridad del mismo por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% (tabla 3).

Tabla 3. Resumen de los datos obtenidos sobre la calidad e integridad del DNA de los grupos estudiados.

MUESTRAS	CONCENTRACIÓN DE DNA ng/μl	RELACIÓN 260/280 (ABSORBANCIA)	INTEGRIDAD (EN GEL DE AGAROSA)
Individuos Sanos	64.2 - 56618	1.73-1.97	Adecuada
Pacientes Pre-tratamiento	83.75-16625	1.57 – 1.98	Adecuada
Pacientes Post-tratamiento MOPP	2.21- 14251	1.22 – 2.6	Adecuada

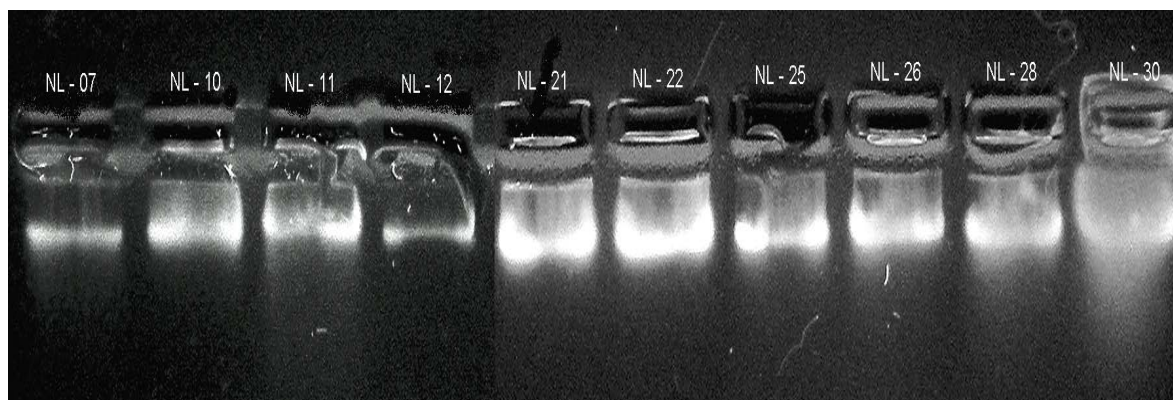


Figura 7.- Integridad del DNAg obtenido de las muestras de 10 sujetos normales. Gel de agarosa al 1%, tinción con bromuro de etidio.

VI. 1 Detección de la t(14;18)

Para realizar el PCR en Tiempo Real de esta translocación se usaron 50 ng de DNA de cada una de las muestras, en cada corrida se incluyeron los siguientes controles: una línea celular positiva para la translocación t (14;18) teniendo el punto de ruptura MBR DOHH2; un gen de referencia utilizado como control de PCR que fue el activador de plasminógeno de tejido (TPA), como control negativo de PCR se utilizó H₂O grado molecular y por último, un *pool* de las muestras de DNA valoradas en esa corrida de PCR .

Para el PCR en tiempo real se hicieron reacciones con volúmenes finales de 20 µl y se corrió con el programa: 95°C -8'- 1 ciclo. 95°C- 10'', 54°C- 10'', 72°C- 20'' – 45 ciclos. 40°C- 30''- 1 ciclo; de cada experimento se realizó un duplicado, y en cada una de las corridas se corrió también un duplicado interno (*pool* de muestras) por lo que finalmente se hicieron un total de 4 repeticiones por cada muestra.

Nuestros resultados mostraron que en todas las corridas se amplificó el gen de referencia TPA en todos los individuos de los tres grupos, mientras que para la t(14;18) no se obtuvo amplificación en ningún individuo de los tres grupos analizados y sólo se puede ver la amplificación de t(14;18) en la línea de referencia DOHH2, portadora de esta translocación (Figuras 8-13), de manera que con este marcador t(14;18), no se detectó daño genotóxico producido por el tratamiento quimioterapéutico MOPP.

En las figuras 8-13 se muestran las gráficas de los resultados del PCR en tiempo real de cada uno de los individuos estudiados. Nomenclatura de cada muestra: L= linfocitos; E= Espermatozoides;

Lado izquierdo se encuentra la posición y color de las muestras que se estudiaron. Lado derecho las gráficas obtenidas de las amplificaciones.

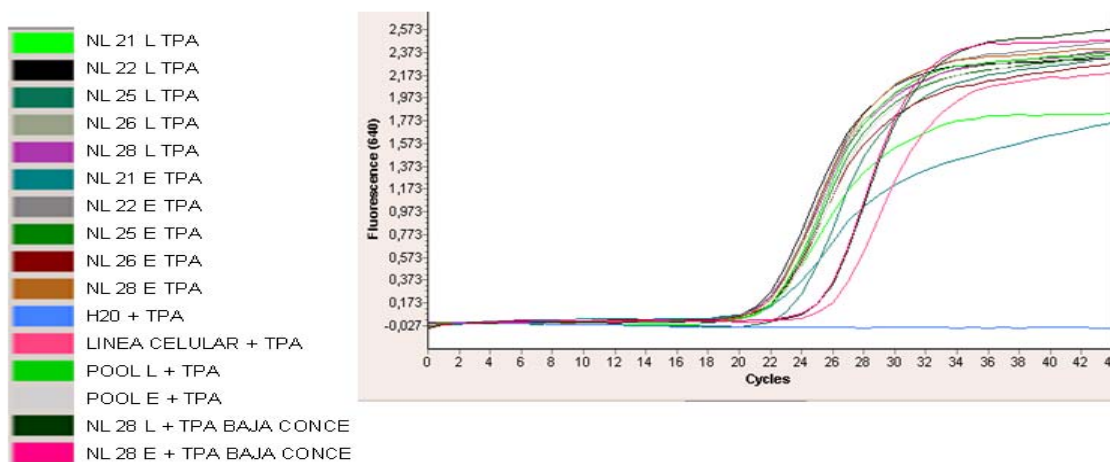


Figura 8. Graficas de PCR en tiempo real. En colores se observan las curvas de 5 individuos del grupo normal L= Leucocitos, E= Espermatozoides. En todos los casos, hubo amplificación del gen TPA, el control interno en azul es agua y fué negativo.

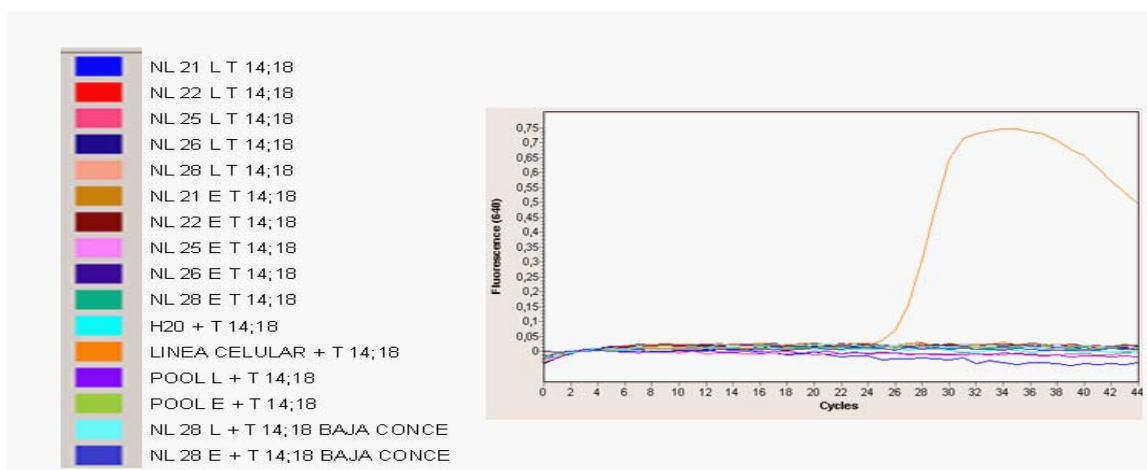


Figura 9 . Gráfica del PCR en tiempo real para detectar la t(14;18) en los individuos sanos, se puede observar que en ninguna de las muestras normales ni de células somáticas ni de espermatozoides incluido se obtuvo amplificación, mientras que el control positivo, la línea portadora de la translocación si amplificó.

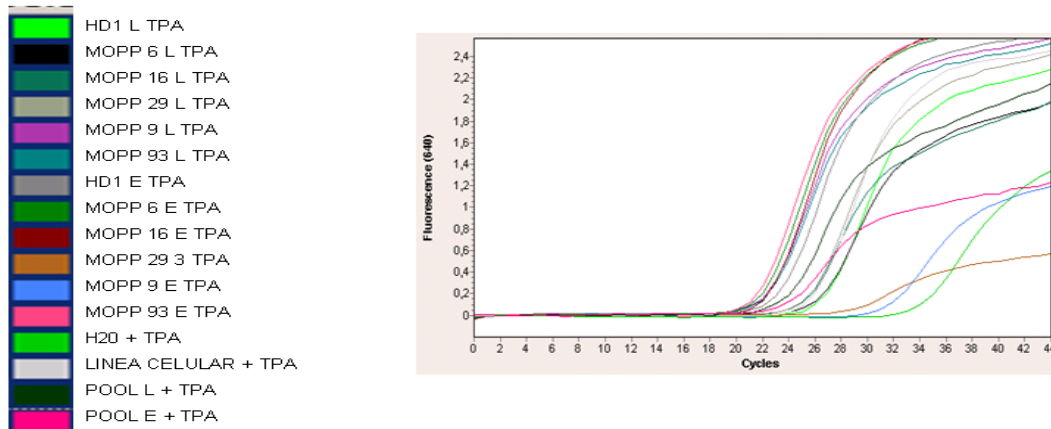


Figura 10. Graficas de PCR en tiempo real realizado con muestras de DNA de pacientes tratados con esquema MOPP. Se observa amplificación del gen de referencia TPA en todos los casos, tanto en leucocitos L, como en espermatozoides E.

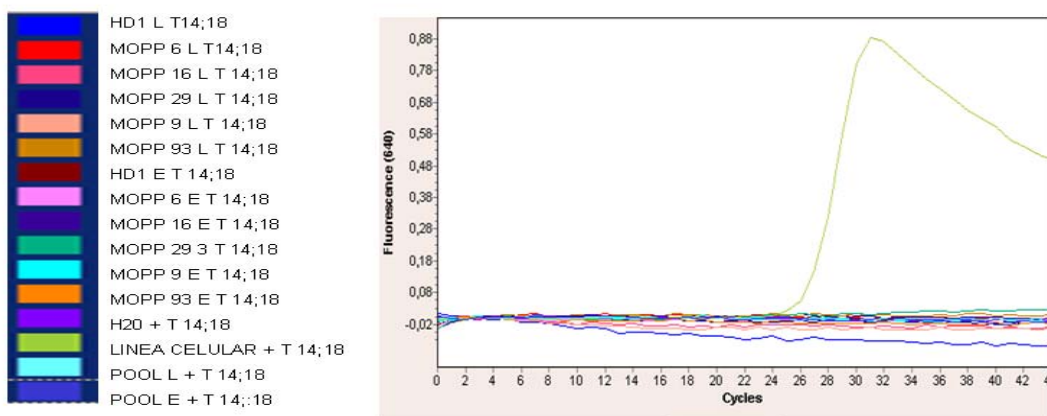


Figura 11.- Graficas de PCR en tiempo real para búsqueda de la t(14;18) en DNA de leucocitos L y espermatozoides E, de los pacientes tratados con esquema MOPP. Se observa amplificación únicamente en la línea portadora.

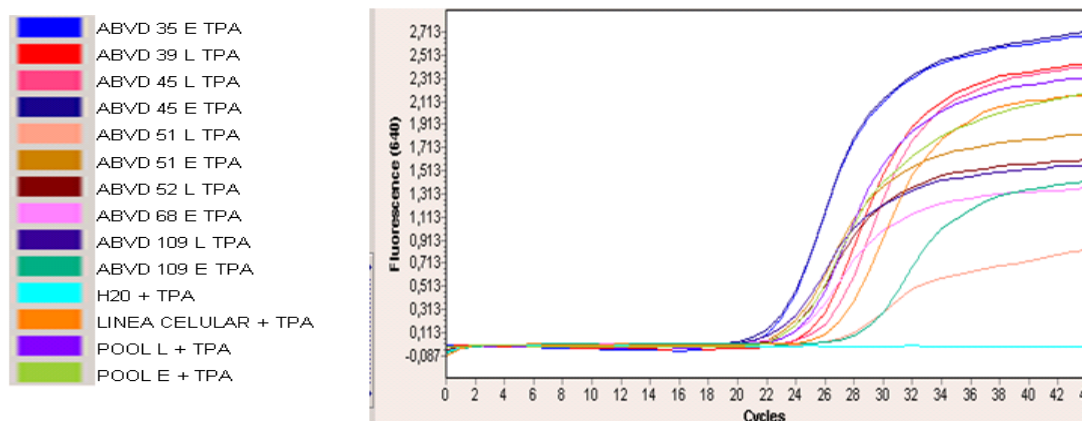


Figura 12. Graficas de PCR en tiempo real para la amplificación del gen de referencia TPA en muestras de DNA de pacientes con EH sin tratamiento. Todas las muestras presentaron amplificación, a excepción del control negativo.

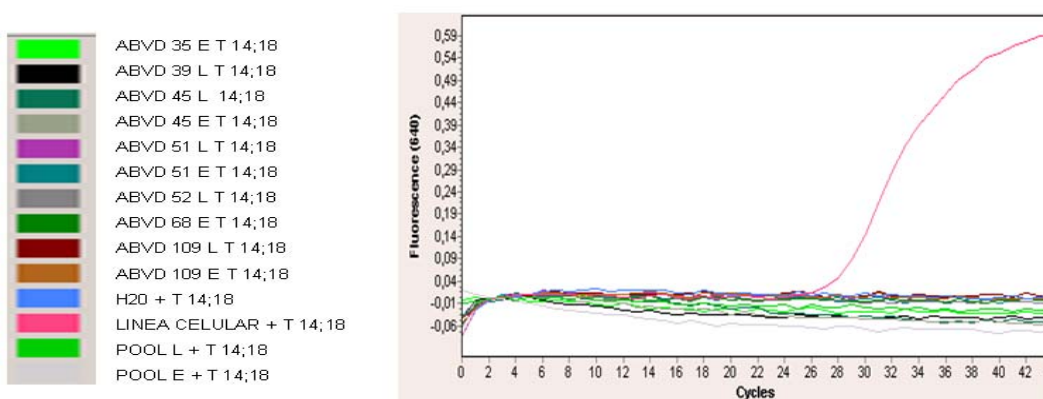


Figura 13.- Grafica de PCR en tiempo real para detectar la t(14;18) en DNA de leucocitos L y espermatozoides E, de los pacientes con EH sin tratamiento. Únicamente la línea de referencia mostró amplificación.

VI. 2 Detección de la t(8;14)

En esta translocación, se han reportado decenas de puntos de ruptura en diferentes pacientes con Linfoma de Burkitt. La búsqueda de los puntos de ruptura en la literatura nos permitió identificar 51 puntos involucrados en el gen *C-MYC* el cual está localizado a nivel cromosómico, en el brazo largo, segmento 24 del cromosoma 8, denominado 8q24; los puntos se encuentran localizados dentro de los exones 1 y 2. En el cromosoma 14q32 se ha

reportado que los puntos de ruptura pueden estar en el elemento de unión número 6 (JH6), región switch γ ó en la región switch α de la cadena pesada de la inmunoglobulina. El punto de ruptura más frecuente sobre el cromosoma 14 es uno sólo y es el que involucra al elemento de unión 6 (JH6). La secuencia nucleotídica y la orientación de los puntos de ruptura de ambos genes se localizaron por análisis en la base de datos NCB, gi406869 para el elemento de unión JH6 y J00120 para el gen *C-MYC*. Teniendo ambas secuencias, usamos el algoritmo Bio-Edit, generamos la translocación *in-silico*, identificamos los 51 puntos de ruptura en el gen *C-MYC* y seleccionamos una región relativamente pequeña y que incluyera el mayor numero de puntos de ruptura para diseñar los oligonucleótidos, con el objetivo de que un solo par de oligonucleótidos nos permitiera reconocer el mayor número posible de estas translocaciones. Esta región se encuentra entre el nucleótido 2010 y el 2879, abarca 25 puntos de ruptura, el cual el primer punto de ruptura esta unido a la secuencia del elemento de unión JH6 de la cadena pesada de la inmunoglobulina (Figura 14).

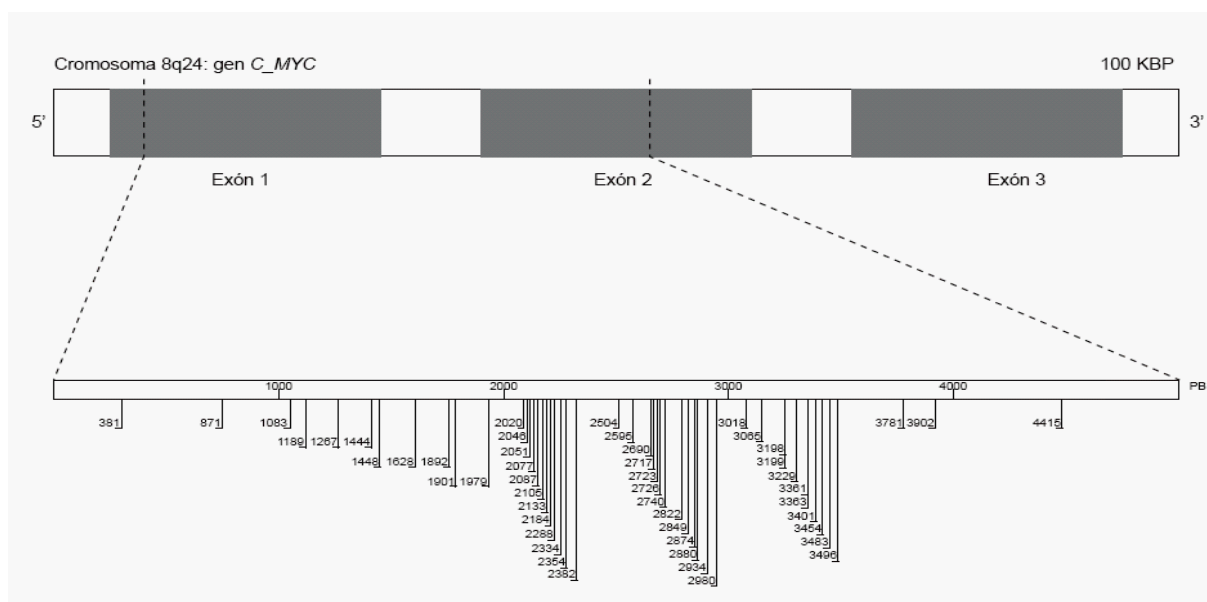


Figura 14.- Localización de los 51 puntos de ruptura reportados en la literatura entre exón 1 y exón 2 del gen *C-MYC*.

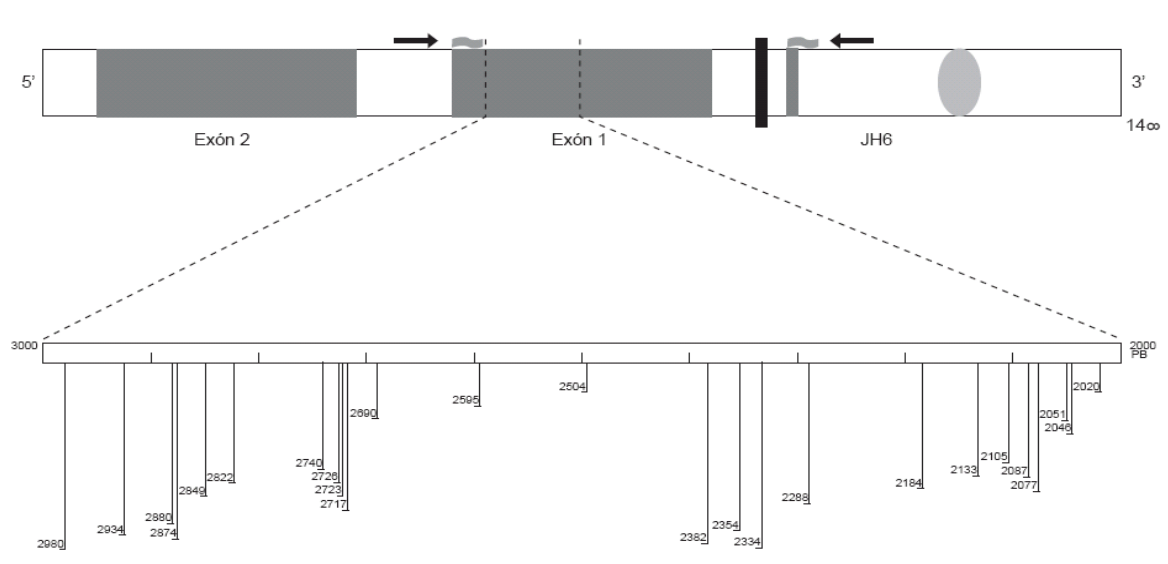


Figura 15.- Región de la translocación t(8;14) que se usó para el diseño de los oligonucleótidos.

El par de oligonucleótidos que se diseñaron constaron de 17 nucleótidos cada uno, para conocer las temperaturas de alineamiento (TM) de cada oligonucleótido se realizó de forma manual (multiplicando el número G ó C por 4 y el número de A ó T por 2, se suman ambos resultantes y el resultado es la TM) y por medio de un programa de cálculo de TM de oligo (<http://www.ibt.unam.mx/sintesis/calculatm.html>). Estos oligonucleótidos se probaron mediante PCR tiempo final en el DNA de la Línea celular G10 portadora de la t(8;14) y en el DNA de leucocitos normales, con resultados negativos.

Por lo anterior, se realizó una búsqueda en la literatura de los oligonucleótidos que ya se habían ocupado para la identificación de la t(8;14) y que estuvieran cercanos a los puntos de ruptura que nosotros habíamos elegido; Se hizo una réplica del PCR con los oligonucleótidos que se reportan en la literatura (Busch, 2004) utilizando las mismas condiciones que publicaron los autores y de nuevo se obtuvieron resultados negativos en la línea portadora de la t(8;14) y en el DNA de leucocitos normales se obtuvieron una serie de bandas inespecíficas (Figura 16, Tabla 4).

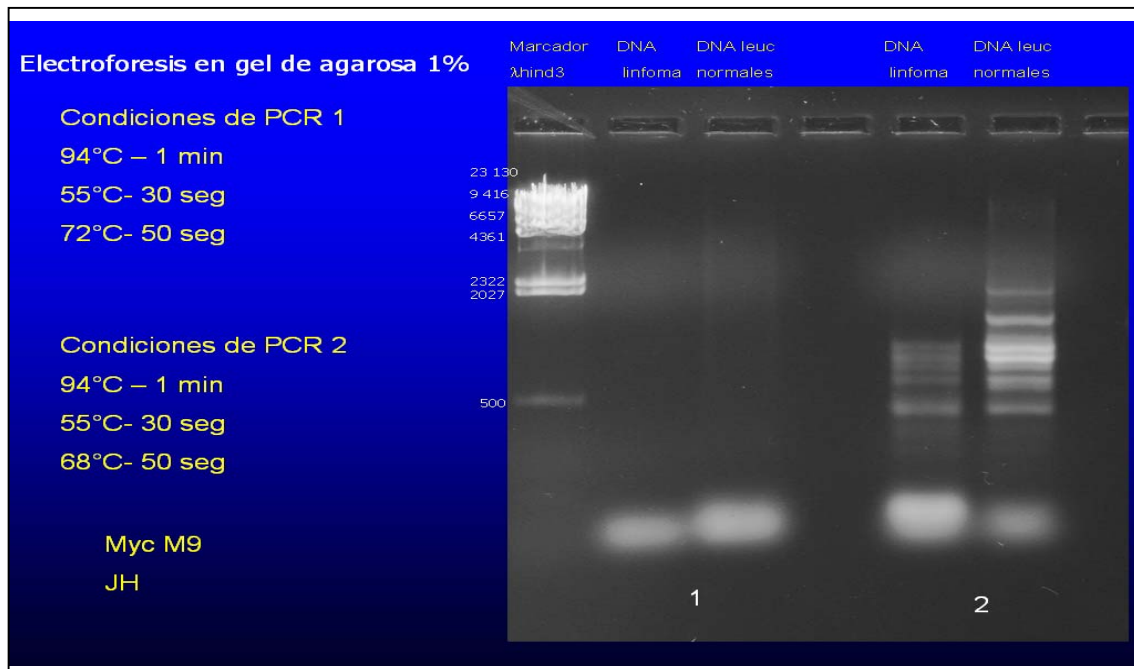
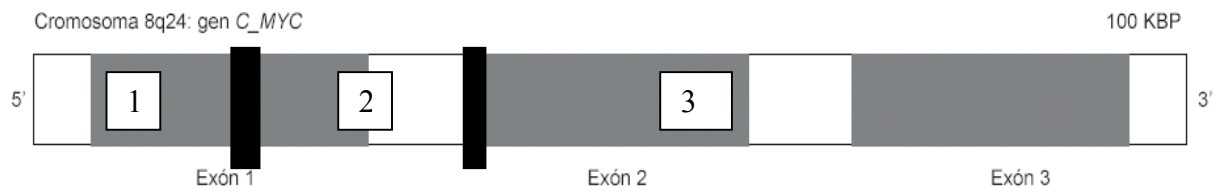


Figura 16. PCR en tiempo final en DNA de la línea portadora de la t(8;14) y leucocitos normales, se utilizaron los oligonucleótidos reportados por Busch, 2004, como puede observarse se encuentran en ambos tipos celulares una serie de bandas inespecíficas.

En virtud de que se estaban obteniendo bandas tanto en el DNA de la línea positiva a la translocación, como en la del DNA de leucocitos normales, se decidió identificar una región de referencia, por lo cual se diseñaron un par de oligonucleótidos que reconocieran un pequeño fragmento de 559 pb en la región permanente del gen *C-MYC* en el cromosoma 8, como un control positivo. Se diseñaron otro par de oligonucleótidos que flanquaran los primeros puntos de ruptura, es decir en la región que no se transloca y el otro oligonucleótido en el primer segmento de la secuencia de *C-MYC* que tiene los puntos de ruptura encontrados en la literatura. Con esto se esperaba amplificado sólo en aquellos cromosomas que conservaran íntegro el gen *C-MYC* mientras que en las células que tuvieran la translocación, por la falta de continuidad del gen (ya que a partir del primer punto de ruptura el segmento complementario de *C-MYC* estaría sobre el cromosoma 14) no habría producto de la reacción de PCR (Figuras 17 y 18).



- 1.- Segmento no translocado
- 2.- Puntos de ruptura
- 3.- Segmento translocado

Figura 17.- Figura representativa del gen completo de *C-MYC* identificando 3 regiones; de derecha a izquierda: región numero 1, segmento no translocado, que es una región presente tanto en células con la translocación como en las células sin translocación. El segmento numero 2 es la región de donde están presentes los puntos de ruptura encontrados en la literatura. Y por ultimo el segmento 3 es la región que abarca el segmento que se transloca hacia el locus de la cadena pesada de la inmunoglobulina en el cromosoma 14.

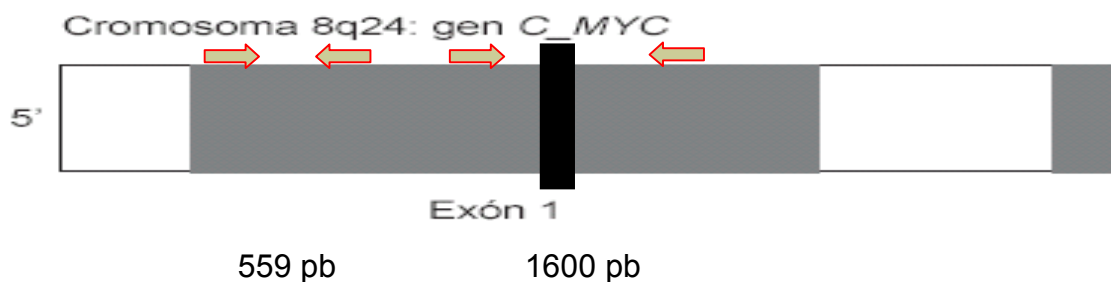


Figura 18.- Figura representativa de posición de los oligonucleótidos que se usaron como control positivo y que van a generar un amplicon de 559 pb y los oligonucleótidos que van a valorar la continuidad o la pérdida de la continuidad en el exón 1 y que en caso de que el exón 1 se encuentre integro va a generar un amplicon de 1600 pb.

El par de oligonucleótidos usados como referencia o control positivo dieron una banda de 559 pb en ambos DNA, tanto de la línea portadora de la translocación como de leucocitos normales, mostrando la presencia del gen *C-MYC* en ambos tipos celulares. Cuando se utilizó el segundo par, el amplicón

de 1600 pb solo apareció en el DNA de leucocitos normales; esto se interpreta como falta de continuidad del gen *C-MYC* y por lo tanto, presencia de la translocación; en el caso del DNA normal, no hay translocación cromosómica a nivel poblacional (Figura 19). Cabe hacer notar que este par de oligonucleótidos son útiles para determinar la falta de continuidad en *C-MYC* y por lo tanto translocación en una población celular positiva para este rearrreglo en todas las células, pero no pueden utilizarse para detectar la translocación en una baja proporción de células, como es el caso de nuestro estudio de detección de daño genotóxico, por lo que sólo se pueden tomar como una forma de confirmar que nuestra línea de referencia positiva a la t(8;14) es adecuada.

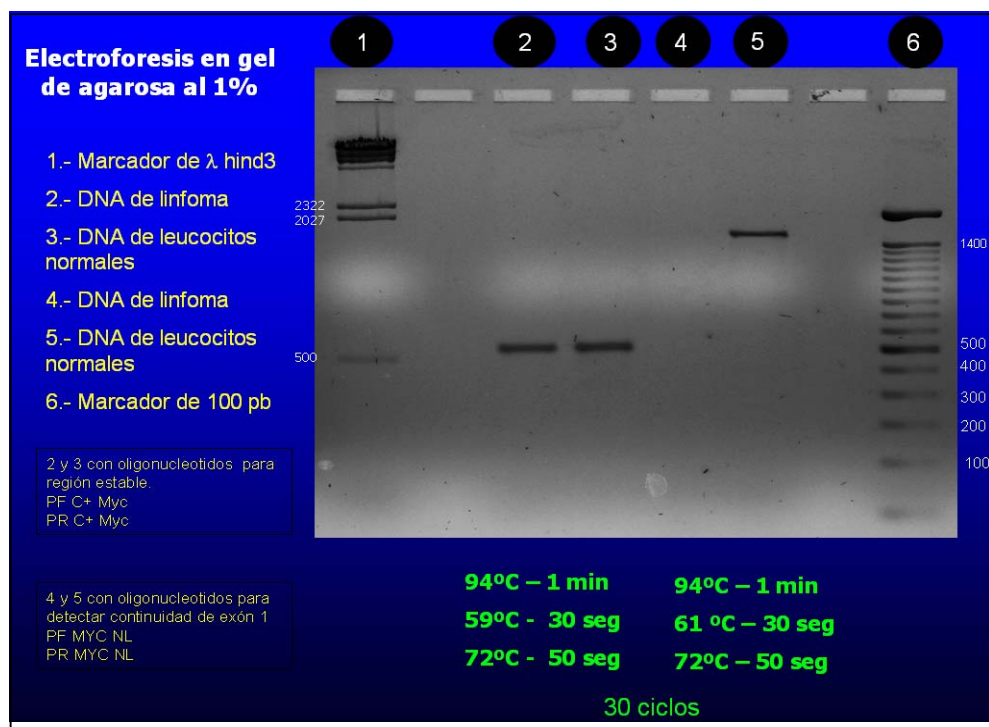


Figura 19. PCR tiempo final utilizando los oligonucleótidos para detectar la integridad del gen *C-MYC*. Se observa que en la línea portadora de la translocación no hay amplificación como se espera si existe discontinuidad en el gen.

Tabla 4. Se muestran las características de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo para detectar la t(8;14)

NOMBRE	SECUENCIA	No DE BASES	TM	REFERENCIA
C-MYC /M9	GAG ATC CTC TGG GGT TTG CGA GAT AAC CCA TGG	44	55	Busch K. 2004. Haematologica; 89(7). 818-825
C-MYC /M6	ACA GTC CTG GAT GAT GAT GTT TTT GAT GAA GG TCT	47	50	Busch K. 2004. Haematologica; 89(7). 818-825
JH	ACC TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT	32	51	Busch K. 2004. Haematologica; 89(7). 818-825. Stadt UZ. 1997. Annuals of oncology. 8 (supp 1) s31-s35. Akasaka T. 1996. Blood 88(3). 985-994
IGH/J6	TCAGACGCACCCAACCT	17	54	Este trabajo
C-MYC	GGAATGTCCGACCGGCC	17	58	Este trabajo
J6/REV	TCAGACGCACCCAACCT	17	54	Este trabajo
MYC/REV	CCGGCCAGCCTGTAA	17	58	Este trabajo
PF C+ MYC	CCGCCTGTCCTTCCCCGCT GGAAACCTTGC	31	59	Este trabajo
PR C+ MYC	CGCTTCGACTCAGCTAGTTG CCCAGCCCCAC	31	58	Este trabajo
PF MYC NL	GGGCTAAACAGACGCCTCCC GCACGGGGGCC	30	61	Este trabajo
PR MYC NL	GCAGGAATGTCCGACCGGCC GGGAGTCAGCG	31	61	Este trabajo

VII.- DISCUSIÓN

Se ha demostrado en células somáticas y germinales *in vitro* así como en modelos animales *in vivo*, que los componentes del esquema de quimioterapia MOPP son altamente genotóxicos (Witt y Bishop, 1996), sin embargo son pocos los estudios que se han realizado en humanos *in vivo* y lo que se ha detectado es primordialmente daño desbalanceado (Brandriff, 1994), esto principalmente porque la detección de daño balanceado es técnicamente muy difícil y laboriosa, sin embargo este tipo de daño podría ser de lo mas importante en este tipo de poblaciones, ya que no es letal y es estable de manera que podría tener consecuencias muy graves tanto en el individuo que las porta como en su descendencia.

Este trabajo es el primero que se realiza buscando translocaciones cromosómicas balanceadas asociadas a linfomas no Hodgkin como marcadores de daño genotóxico. Se tomó ventaja de la gran cantidad de estudios que se han realizado para detectar un bajo número de células afectadas por translocaciones, sobre todo en el campo de la oncología en donde se utilizan para detectar enfermedad residual. En nuestro estudio nos basamos en el hecho de que las rupturas cromosómicas que generan el daño cromosómico estructural estable se distribuyen al azar sobre el material genético de la célula expuesta al agente genotóxico, de manera que cualquier translocación podría originarse como efecto de la exposición. Se seleccionaron dos translocaciones que se presentan en las neoplasias secundarias a EH, la t(14;18) y la t(8;14) que se encuentran en linfomas No Hodgkin y que se han estudiado previamente en otras poblaciones, por lo que existe una buena cantidad de reportes al respecto.

VII.1 t(14;18)

La t(14;18) se ha asociado al linfoma folicular; esta translocación se encuentra en pacientes con este tipo de cáncer en una alta proporción de las células afectadas, pero también se ha encontrado en individuos sanos aunque en muy bajo porcentaje (Janz, 2003). En este estudio, no encontramos la

presencia de esta translocación ni en sujetos sanos, ni en pacientes antes del tratamiento ni como marcador de daño genotóxico en sobrevivientes a la quimioterapia MOPP. Esto contrasta con otros trabajos realizados en otros países en los cuales se ha buscado esta translocación en diversos grupos de individuos: sanos, con exposición a radiación solar (Bentham,1999) o con hábito de tabaquismo y han encontrado positividad a la presencia de la translocación mediante FISH, PCR punto final y anidado, sin embargo Galoin, et al en 1998 refiere no encontrar correlación entre el sexo, exposición a tabaco, neoplasia, quimioterapia, radioterapia o infección.

La frecuencia de células afectadas con la translocación se ha encontrado ser muy baja en cada individuo, variando desde 1 en 10,000 hasta 1 en 10 millones, sin embargo con este muy alto número de células analizadas, la frecuencia de individuos con células positivas a la translocación es mas bien alta, de 8% a 88% (Limpsen en 1991; Aster, 1992; Liu, 1994; Bell, 1995; Limpens, 1995; Ji, 1995; Fuscoe ,1996; Cole,1996; Dolken, 1996; Fuscoe, 1996; Poetsch, 1996; Liu, 1997; Paltiel, 2001; Yasukawa, 2001; Summers, et al., 2001). Aster en 1992 estudió nodos linfáticos hiperplásicos de individuos Americanos y Japoneses y encontraron la translocación en 33% en Americanos y 50% en japoneses.

Todo lo anterior indica que esta translocación se encuentra en células de sujetos tanto sanos como con afección linfática. Nuestros resultados negativos podrían explicarse primero, porque la quimioterapia MOPP no genere este tipo de translocaciones, o bien que las genere pero por el mismo tratamiento se eliminen; Ladetto ha sugerido que la translocación podría no encontrarse en los individuos tratados con agentes quimioterapeúticos porque estos agentes son tan deletéreos que podrían eliminar las células con translocación (Ladetto, 2003).

La segunda posibilidad es que sí se generen las translocaciones, pero que con nuestro diseño experimental no hayamos podido detectarlas. A este respecto, podría considerarse que el número de células analizadas fue bajo (aproximadamente de 20,000) es decir por debajo del número de células mínimo para poder detectar estos rearrreglos y así poder realizar la comparación entre nuestros diferentes grupos. Nosotros asumimos que los

pacientes expuestos al tratamiento antineoplásico tienen un incremento en la frecuencia de translocaciones cromosómicas balanceadas, sin embargo el no encontrar ningún individuo con esta translocación nos obliga a pensar que se debe incrementar el número de células y también el número de pacientes.

Por otra parte, es posible que las translocaciones sí se encuentren entre nuestros pacientes, sin embargo por el tipo de kit utilizado no se pudieron detectar, los oligonucleótidos utilizados generan un fragmento de DNA muy pequeño por PCR, lo que implica pocos puntos de ruptura detectados. Este kit está diseñado para encontrar la translocación asociada a neoplasias, pero nosotros buscamos translocaciones que se generan por genotoxicidad lo que implica que los puntos de ruptura son múltiples y al azar, así la translocación en cada célula podría tener puntos de ruptura diferentes y no necesariamente dentro del amplicón (pequeño) aquí estudiado con lo cual pasaría desapercibida.

Por último, también sería conveniente estudiar los otros dos puntos de ruptura (ICR y MCR) involucrados en la translocación en nuestra población, ya que dentro de los reportes existentes casi no hay información sobre estos dos puntos y esto incrementaría nuestras posibilidades de detección ya que abarcaríamos un segmento mayor del genoma.

VII. 2 t(8;14)

Esta translocación es muy compleja por sus diferentes puntos de ruptura, tanto en el gen *C-MYC* como también en el locus de la IGH, En este trabajo decidimos estudiar puntos de ruptura que encontramos en la literatura como frecuentes, y que nos sirve a nosotros como marcador de daño genotóxico.

En otros trabajos se ha asociado la t(8;14) con Linfoma Burkitt o a individuos con VIH y esta translocación con frecuencia se estudia en líneas celulares y / o biopsias de nódulos linfáticos de pacientes; hay un trabajo realizado por Muller en 1995 en el cual encontró 2/99 (2%) positivos para esta translocación en individuos VIH negativos usando *primers* que reconocen las regiones de

switch en la IGH (α y μ), a partir de entonces, no existe otro estudio en individuos sanos de búsqueda de t(8;14).

Debido a esto, no se tiene un kit para detectar esta translocación y se tuvo que iniciar desde la búsqueda en la literatura para determinar entre los pacientes estudiados, cuales eran los puntos de ruptura mas frecuentes y en que lugar de los genes involucrados se presentaban.

En este trabajo diseñaron un par de oligos para detectar la t(8;14) basados en las regiones con mayor densidad de puntos de ruptura sin embargo éstos no fueron capaces de amplificar la translocación en la línea G10, portadora de la translocación.

Posteriormente se utilizaron oligonucleotidos ya reportados en otros trabajos de linfoma burkitt, y con estos oligonucleotidos obtuvimos bandas inespecificas y no detectamos la banda con el tamaño esperado. Esto puede deberse a que la translocación de la línea celular de referencia tenga puntos de ruptura tan diferentes, que no puede amplificar, o bien que las condiciones del PCR no fueron las apropiadas para la amplificación.

Una posibilidad diferente en la que se pensó fue que la línea celular que estábamos estudiando como control positivo hubiera perdido la translocación; para probar esto se diseñaron oligonucleótidos adicionales que amplificaran una región de referencia, se seleccionó la región 5' del mismo gen *C-MYC*, que no participa en la translocación y también se diseñaron oligonucleótidos para la región involucrada en la translocación. Con estas herramientas se logró probar que la línea celular si mantiene la translocación, pero no son útiles para detectar el rearreglo cuando estas translocaciones aparecen en una baja frecuencia de la población celular, como se esperaría por las consecuencias genotóxicas de la quimioterapia (1 célula translocada en 10 mil células normales), ya que las células normales enmascararían la falta de continuidad del gen. translocación mientras que el resto estarían normales y es la banda que nos aparecería, por todo lo anterior, creemos que para poder continuar con este estudio será necesario diseñar nuevos oligonucleótidos después de analizar más a fondo la translocación de nuestra línea de referencia.

De manera general, también debe hacerse notar que el estudiar sólo dos translocaciones balanceadas nos generan información de una sección muy

pequeña del genoma por lo que es recomendable incluir en el estudio más translocaciones balanceadas para poder tener datos más sólidos y poder llegar a una conclusión adecuada.

VIII.- CONCLUSIONES.

1. La t(14;18) fue negativa en el total de individuos estudiados aquí, por lo que hasta este momento, no se puede considerar como un marcador de daño genotóxico secundario al tratamiento antineoplásico MOPP.
2. Ya que este rearrreglo se ha encontrado en población normal en una muy baja frecuencia y en vista de nuestros resultados negativos, es necesario incrementar el número de células estudiadas por individuo y el número de individuos por grupo para poder realizar las comparaciones de frecuencias de la t(14;18) entre grupos y entre diversos tipos celulares dentro de un mismo individuo.
3. Es necesario diseñar nuevos oligonucleótidos que permitan amplificar la t(8;14), así como aumentar el número de translocaciones balanceadas que se estudien para poder determinar si en efecto se genera daño cromosómico balanceado como consecuencia de la quimioterapia MOPP.

IX.- BIBLIOGRAFIA

Albinger-Hegyi A, Houchreutener B, Abdou MT, Hegyi I, Tours-Zimmermann MT, Kurrer MO, Heitz PU, Zimmermann DR. High Frequency of t(14;18)-Translocation Breakpoints Outside of Major Breakpoint and Minor Cluster Regions in Follicular Lymphomas. *Am J pathol.* 2002; 160(3):823-832

Alzeer J, Scharer OD. A modified thymine for the synthesis of site-specific thymine-guanine DNA interstrand crosslinks. *Nucleic Acid Res.* 2006; vol 00(00): 1-9

Aguilar-Morales J. Quimioterapia Antineoplasica. *Biocancer.*2004; 1: 1-23.

Aster JC, Kobayashi Y, Shiota M, Mori S, Sklar J. Detection of the t(14;18) at Similar Frequencies in Hyperplastic Lymphoid Tissues from American and Japanese Patients. *Am J Pathol.* 1992; 141(2): 291-299.

Akasaka T, Muramatsu M, Ohno H, Tatsumi E, Fukuhara S, Mori T, Okuma M. Application of Long-Distance Polymerase Chain Reaction to Detection of Junctional Sequences Created by Chromosomal Translocation in Mature B-Cell Neoplasms. *Blood.* 1996; 88(3): 985-994.

Bell DA, Liu Y, Cortopassi GA. Occurrence of bcl-2 oncogene translocation with increased frequency in the peripheral blood of heavy smokers. *J Natl Cancer Ins.* 1995; 87: 223-224

Bendandi M, Pileri SA, Zinzani PL. Challenging paradigms in lymphoma treatment. *Ann Oncol.* 2004;15: 703-711.

Bentham G, Wolfreys AM, Liu Y, Cortopassi G, Green MHL, Arlett CF, Cole J. Frequencies of hprt⁻ mutations and bcl-2 translocations in circulating human lymphocytes are correlated with United Kingdom sunlight records. *Mutagenesis.* 1999; 14(6):527-532.

Bilban-Jakopin C y Bilban M. Genotoxic effects of radiotherapy and chemotherapy on circulating lymphocytes in patients with Hodgkin's disease. *Mutation Res.* 2001;497;81-88.

Brandriff BF, Meistrich ML. Gordon LA, Carrano AV, Liang JC. Chromosomal damage in sperm of patients surviving Hodgkin's disease following MOPP (nitrogen mustard, vincristine, procarbazine and prednisone) therapy with and without radiotherapy. *Human Genet.* 1994; 93: 295-299

Brandt L, Kimby E, Nygren P, Glimelius B. A Systematic Overview of Chemotherapy Effects in Hodgkin's Disease. *Acta Oncol.* 2001; 40: 185 – 195.
Busch K. *Haematologica.* 2004; 89(7): 818-825

Busch K, Borkhardt A, Wobmann W, Reiter A, Harbott J. Combined polymerase chain reaction methods to detect *C-MYC/ IgH* rearrangement in childhood Burkitt's lymphoma for minimal residual disease analysis. *Haematologica.* 2004; 89(7): 818-825.

Cole J, Green MH, Bridges BA, Waugh AP, Beare DM, Henshaw D, Last R, Liu Y, Cortopassi G. Lack of evidence for an association between the frequency of mutants or translocations in circulating lymphocytes and exposure to radon gas in the home. *Radiat Res.* 1996; 145(1): 61-69.

Connors JM, Noordijk EM, Horning SJ. Hodgkin's lymphoma: Basing the treatment on the evidence. *Am J Hematol.* 2001 178 – 190

Dennis L. Kasper, Eugene Braunwald, Anthony S. Fauci, Stephen L. Hauser, Dan L. Longo, J. Larry Jameson, y Kurt J. Isselbacher, Eds. *Harrison Principios de Medicina Interna.* 16° edición. Mc GrawHill. 2005. Madrid, España .

Dhawan A. Aneugenic and clastogenic effects of doxorubicin in human lymphocytes. *Mutagenesis.* 2003;18(6): 487-90.

Dielh V, Stein H, Hummel M, Zollinger R, Connors JM. Hodgkin's lymphoma: Biology and treatment strategies for primary, refractory, and relapsed disease. Am J Hematol 2003;(1): 225-247.

Dinand V, Arya LS. Epidemiology of Childhood Hodgkin's Disease: Is it Different in Developing Countries? Indian Pediatr 2006; 43(2):141-147.

Diablos F, Feyzi E, Arne-Ass P, Vaagbo CB, Kavli B, Bratlie MS, Peña-Diaz J, Otterlei M, Slupphaug G, Krohan HE. Alkylation damage in DNA and RNA-repair mechanisms and medical significance. DNA Repair. 2004; 3:1389-1407

Dolken G, Illerhaus G, Hirt C, Mertelsmann R. BLC-2/ JH Rearrangements in Circulating B Cells of Healthy Blood Donors and Patients With Nonmalignant Diseases. J Clin Oncol.1996; 14(4); 1333-1344.

Engert A, Wolf J, Diehl V. Treatment of advanced Hodgkin's lymphoma: standard and experimental approaches. Semin Hematol. 1999; 36: 282-289.

Frias S. Consecuencias geneticas del tratamiento antineoplasico en celulas germinales de pacientes con cancer (2002) en Rivera Luna R. Oncologia Pediatrica: Conceptos Basicos y clinicos. Intersistemas S.A de C.V. Mexico pp 279-302

Foss Abrahansen A, Andersen A, Nome O, Jacobsen AB, Holte H, Kvaloy S. Long-term risk of second malignancy after treatment of Hodgkin's disease: the influence of treatment, age and follow-up time. Ann Oncol. 2002; 13(11): 1786-1791.

Formulario Modelo de la OMS. 2004. Sección 8. Antineoplasicos, inmunosupresores y fármacos utilizados en los cuidados paliativos. 183-201

Fuscoe JC, Setzer RW, Collard DD, Moore MM. Quantification of t (14;18) in the lymphocytes of healthy adult humans as a possible biomarker for environmental exposures to carcinogens. *Carcinogenesis*. 1996; 17 (5): 1013 - 1020.

Galoin RS, Chale JJ, Adoue D, Albarede JL Delsol G, Saati t. Detection of t(14;18) carrying cells in bone marrow and peripheral blood from patients affected by non-lymphoid diseases. *J Clin Pathol: Mol Pathol*. 1998;51:333-338

Harris NL. Hodgkin's Lymphoma: Classification, Diagnosis and Grading. *Semin Hematol*. 1999; 36: 220-232.

Hudson MM y Donaldson SS. Hodgkin's disease. *Pediatr Clin N Am* 1997; 44: 891-906.

Hudson MM y Donaldson SS. Treatment of paediatrics Hodgkin's lymphoma. *Semin Hematol*.1999; 36: 313-323.

Janz S, Potter M, Rabkin CS. Lymphoma- and Leukemia – Associated Chromosomal Translocations in Healthy Individuals. *Genes, Chromosomes & Cancer*. 2003; 36: 211-223.

Jansen MPM. Chromosomal abnormalities in Hodgkin's Disease are not restricted to Hodgkin/ Reed-Sternberg cells. *J Pathol*.1998; 185: 145-152.

Jenkins D, Greenberg M, Fitzgerald A. Second malignant tumours in childhood Hodgkin's disease. *Med Pediatr Oncol*.1996; 26(6): 376-379 ..

Ji W, Qu GZ, Ye P, Zhang XY, Halabi S, Ehrlich M. Frequent Detection of bcl-2/Jh Translocations in Human Blood and Organ Samples by a Quantitative Polymerase Chain Reaction Assay. *Cancer Res*.1995; 55: 2876-2882.

Klug WS, Cummings MR. Conceptos de Genetica. (2000). 5° Edición. Prentice Hall Iberia. Madrid

Lalic H, Radošević-Stasić B, Volavsek C. High Incidence of Chromosome Aberrations after Radio-chemotherapy for Hodgkin's Disease: a Report of a Case and a Review of the literature. *Folia Biologica*. 2001; 47: 101-105.

Ladetto M, Drandi D, Compagno M, Astolfi M, Volpato F, Voena C, Novarino A, Pollio B, Addeo A, Ricca I, Falco P, Cavallo F, Vallet S, Corradini P, Pileri A, Tamponi G, Palumbo A, Bertetto O, Boccadoro M, Tarella C. PCR-Detectable Nonneoplastic Bcl-2/IgH Rearrangements Are Common in Normal Subjects and Cancer Patients and Cancer Patients at Diagnosis but Rare in Subjects Treated With Chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2003; 21 (7): 1398-1403.

Lawler PD, Martin CN. Molecular mechanisms in alkylation mutagenesis. *Biochem J*. 1975; 145:85-91.

Limpens J, De-Jong D, Van-Krieken JH, Price CG, Young BD, Van-Ommen GJ, Kluin PM. Bcl-2/JH rearrangements in benign lymphoid tissues with follicular hyperplasia. *Oncogene*. 1991; 6(12): 2271-2276.

Limpens J, Stadd R, Vos C, De-Vlaam C, De-Jong D, Van-Ommen GJB, Schuurin E, Kluin PM. Lymphoma-Associated Translocation t(14;18) in Blood B Cells of Normal Individuals. *Blood*. 1995; 85 (9): 2528-2536.

LightCycler- t(14;18) Quantification Kit (mbr). Instruction Manual. Version 1, March 2001. Roche

Liu Y, Hernandez AM, Shibata D, Cortopassi GA. BCL2 translocation frequency rises with age in humans. *Proc Natl Acad Sci*. 1994; 91: 8910-8914

Liu Y, Cortopassi G, Goedert JJ, Rabkin CS. Frequency of Bcl-2 rearrangements in peripheral blood of HIV- infected individuals. *Br J Haematol*. 1997; 99: 465 – 466.

Martinez W, Folle G. Facultad de Ciencias- Sección de Genética Evolutiva. Alteraciones Cromosomicas. PDF.

<http://genetica.fcien.edu.uy/materiales/PRACTICOS/alteraciones%20cromosomicas/alteraciones%20cromosomicas.pdf>

McKinley- Gardner RJ. Chromosome Abnormalities and Genetics Counseling (2004). 3a edition. Oxford monographs on medical genetics. Cap 4. Autosomal Reciprocal Translocations.

Meistrich ML, Geara F, Nabbout B, Farah RA, Shabb NS, Hajjar T, Khogali M. Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis. Eur Urol.1993; 23(1): 135-142,.

Mesa Cuervo, JR; *et al.* Enfermedad de Hodgkin: nuevos conceptos clinico-patologicos. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter. 1999;16 (1): 21-9.

Meyer RM, Ambinder RF, Stroobants S. Hodgkin lymphoma: Envolving concepts with implications for practice. Am Society of hematol. 2004; 184 – 200.

Muwakkat S. Treatment of pediatric Hodgkin's disease with chemotherapy alone or combined modality therapy. Radiat Oncol Investig. 1999; 7(6): 365-73.

Ng AK, Bernardo P, Séller E, Backstrand K, Silver B, Marcus KC, Tarbell J, Stevenson MA, Friedberg JW, Match PM. Second malignancy after Hodgkin disease treated with radiation therapy with or without chemotherapy: long-term risk and risk factors. Blood. 2002; 100 (6); 1989 – 1996.

Quiagen- Gentra Genomic DNA Handbook. 2001. Manuales y protocolos. Kit de Extracción de DNA Genómico. PDF

Paltiel O, Zelenetz A, Sverdlin I, Gordon L, Ben- Yehuda D. Translocation t(14;18) in healthy individuals: preliminary study of its association with family history and agricultural exposure. Ann Oncol. 2001; 11 (1): 75- 80. Supp 1.

Pao WJ , Kun LE. Hodgkin's disease in children. Hematol/ Oncol Clin N Am.1989; 3: 345-363.

Pileri SA. Hodgkin's lymphoma: the pathologist's viewpoint. J. Clin Pathol 2002; 55: 162-176

Poetsch M, Wber-Matthiesen K, Plendl HJ, Grote W, Schlegelberger B. Detection of the t(14;18) chromosomal translocation by interphase cytogenetics with yeast- artificial- chromosome probes in follicular lymphoma and noneoplastic lymphoproliferation. J Clin Oncol. 1996; 14(3): 963-969.

Rivera Luna R. Diagnostico del niño con cáncer, libros Mosby/Doyma. Madrid, pp 143-149. 1994

Rivera Luna R. Hemato Oncología Pediátrica. Principios generales. Ed. ETM. pp 179-191.2006.

Ryabchenko N, Nasonova V, Antoschina M, Fesenko E, Kondrashova T, Ivanova T, Pavlov V, Ryabikhina N, Terekhova A. Persistente of chromosome aberrations in peripheral lymphocytes from Hodgkin's lymphoma remission patients. Int J Radiat Biol. 2003; 79 (4); 251-257

Rosenberg SA, Kaplan HS. Hodgkin's Disease and Other Malignant Lymphomas. Western J Med. 1970; 113 (4):23 - 38

Rodriguez-G M, Rodriguez-L- W. . PCR EN TIEMPO REAL. Metodos fisicos-quimicos en biotecnologia. IBT. UNAM. PDF

Stadt UZ, Hoser G, Reiter A, Welte K, Sykora KW. Application of long PCR to detect t(8;14) (q24;q32) translocations in childhood Burkitt's lymphoma and B-ALL. Annals of oncology. 1997; 8 (supp 1): s31-s35 .

Smith LM, Evans JW, Mori M, Brown JM. The Frequency of Translocations After Treatment For Hodgkin's Disease. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1992; 24; 737-742.

Strom SS, Gu F, Sigurdson AJ, Bailey NM, Amos CI, Spitz MR, Rodriguez MA, Liang JC. Chromosome Breaks and Sister Chromatid Exchange as Predictors of Second Cancers in Hodgkin's Disease. *Leukemia and Lymphoma*. 1998; 28:561-566.

Sanchez-Beato M, Sanchez-Aguilera A, Piris MA. Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. *Blood*. 2003;101(4):1220-1231.

Seif GS, Spriggs AI. Chromosome changes in Hodgkin's disease. *J Natl Cancer Inst*. 1967; Sep, 39(3):557-70.

Siegfried J. Lymphoma and leukemia-Associated Chromosomal translocation in healthy individuals. *Gene Chromosome Canc* 36:211- 223. 2003

Summers KE, Goff LK, Wilson AG, Gupta RK, Lister TA, Fitzgibbon J. Frequency of the BCL-2/IgH Rearrangement in Normal Individuals: Implications for the Monitoring of Disease in Patients With Follicular Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2001; 19 (2): 420 – 424.

Therman E. Human Chromosomes, Cap. 13. Chromosome Structural Aberrations. Springer, Nueva York, 2000.

Therman E. Human Chromosomes, Cap. 14. The Causes of Structural Aberrations. Springer, Nueva York, 2000.

Therman E. Human Chromosomes, Cap. 16 Clinical importance of translocations, inversions and insertions. Springer, Nueva York, 2000.

Thompson AB, Wallace WHB. Treatment of paediatric Hodgkin's disease: a balance of risks. *European J Cancer*. 2002; 38: 468 – 477

Witt KL, Bishop JB. Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis. Eur Urol .1993;23: 136-142.

Witt KL, Bishop JB. Mutagenicity of anticancer drugs in mammalian germ cells. Mutat Res.1996; 355(1-2): 209- 234.

Vela-Casas F. Linfomas no-Hodgkin y enfermedad de Hodgkin. Pediatr Int 2004;VIII(6):475-486.

Yasukawa M, Bando S, Dolken G, Sada E, Yakushijin Y, Fujita S, Makino H. Low frequency of BL-2/JH translocation in peripheral blood lymphocytes of healthy Japanese individuals. Blood. 2001; 96 (2): 486-488.

Yung L, Linch D. Hodgkin's Lymphoma. Lancet 2003; 361: 943 – 951.

X. ANEXOS

X.1.- Anexo 1

Carta de consentimiento informado:

Proyecto: Frecuencias de translocaciones cromosómicas balanceadas en células somáticas y germinales de sobrevivientes a enfermedad de Hodgkin tratados con quimioterapia MOPP.

Usted está invitado a participar en el proyecto de pacientes con enfermedad de Hodgkin que fueron tratados con Mostaza nitrogenada, Oncovin, Procarbazona y Prednisona (MOPP), que aunque son indispensables para el tratamiento del cáncer, se sabe que en algunos casos, pueden causar daño a los cromosomas de células no cancerosas. En este estudio se analizarán los espermatozoides y las células sanguíneas de los pacientes que han sido tratados con estos medicamentos para detectar el número y el tipo de anomalías cromosómicas que se encuentren en las células de las muestras que se obtendrán.

Su aceptación se considera voluntaria y no modificará el tratamiento que recibe. Usted puede desistir de participar o continuar en el estudio en el momento que lo desee y esto no afectará de ninguna manera su relación con el hospital o el grupo médico.

La decisión de participar implica que usted tenga un conocimiento completo de los riesgos y beneficios, los cuales se detallan en esta carta. Cualquier duda adicional puede ser aclarada por la Dra. Sara Frías Vázquez, responsable del proyecto, en el Laboratorio de citogenética Tel. 10840900 ext. 1326 ó 1436.

Procedimientos a realizarse

Un médico o técnico experimentado tomará una muestra de 20 ml de sangre periférica y usted donará la muestra de semen.

Efectos indeseables y riesgos

Leve dolor en el sitio de punción. Raras veces ocurren infecciones o inflamación local. Estos riesgos se reducen al emplear al personal especializado para la obtención de la muestra

Beneficios para las personas participantes en el estudio

La identificación de alteraciones cromosómicas en las células a estudiar, contribuirán al conocimiento sobre la naturaleza de la enfermedad y las consecuencias futuras que puede tener la exposición a medicamentos para tratar el cáncer.

Otras consideraciones

Este estudio no representara ningún costo adicional para el paciente y todos los expedientes serán mantenidos con carácter estrictamente confidencial

Acepto participar en el estudio y recibo copia de este documento

NOMBRE _____ FIRMA DEL TESTIGO _____

NOMBRE _____ FIRMA DEL TESTIGO _____

NOMBRE _____

FIRMA DE QUIEN SE OBTIENE EL CONSENTIMIENTO _____

FECHA _____

X. 2 Anexo 2

Cuestionario General.

Fecha

Nombre del paciente

1) Fuma? Si _____ No _____

Cuantos cigarrillos por día en los últimos 6 meses _____

Consume drogas? Si _____ No _____

Especifique _____

2) Que enfermedades ha tenido en los últimos 3 meses?

3) Tiene vasectomía? Si _____ No _____

4) Ha padecido ó se le ha practicado:

• Testículos no descendidos? Si _____

No _____

• Varicocele (venas varicosas en escroto) Si _____

No _____

• Otra enfermedad urinario ó genital Si _____

No _____

Especifique _____

• Alguna enfermedad endocrina u hormonal Si _____

No _____

Especifique _____

• Cáncer Si _____

No _____

Especifique_____

Quimioterapia_____

Radioterapia_____

5) Se ha practicado un examen de semen antes? Si_____

No_____

Especifique la Razón

6) Tiene algún problema de fertilidad? Si_____

No_____

Especifique

Criterios de exclusión de acuerdo al cuestionario

Pregunta:

1.- Si fuma mas de 10 cigarrillos al día, o consume droga, se excluye

2.- En caso de SIDA, se excluye

3.- Afirmativo, se excluye

4.- Afirmativo, se excluye (excepción de los pacientes con EH, pero un EH con cáncer secundario se excluye también)

5y6.- Si se sospecha de alguna enfermedad de origen cromosómico, se excluye.

X.3 Anexo 3

Análisis de PCR en tiempo real.-

Cinética de amplificación de la reacción de PCR.- Este proceso de amplificación presenta 3 fases: la geométrica, la lineal y la estacionaria.

Fase Geométrica. Todos los reactivos de la reacción se encuentran en abundancia y en esta etapa la eficiencia de amplificación bajo las condiciones experimentales es muy cercana al 100%. La amplificación tiene comportamientos 2^n en donde a partir de una molécula de DNA se genera 2 moléculas del DNA.

Fase lineal. Los primers, dNTP y las enzimas comienzan a ser factores limitantes, además de la generación de pirofosfato y decaimiento de la actividad enzimática que afecta la eficiencia de amplificación de manera constante.

Fase estacionaria. La amplificación y la cantidad del producto obtenido es constante sin importar cuantos ciclos mas se prolongue la reacción dado los factores mencionados previamente.

La cinética de amplificación evalúa la cantidad de templado inicial.

$$P = T \cdot 2^n$$

P=Cantidad de producto generado a N ciclos

T=Cantidad de templado inicial

2^n =Eficiencia de amplificación.

Umbral de detección (CT). número fraccional que indica cuantos ciclos le tomó a cada muestra generar la cantidad suficiente de fluorescencia para llegar al umbral de detección.

El valor CT es proporcional a la cantidad inicial de templado. A mayor cantidad de DNA menor número de ciclos.

A partir de los resultados de CT se constituye una gráfica VS logaritmo de la concentración y de ésta se grafica:

- 1.- La desviación estándar entre diferentes puntos de menor de 0.2 unidades de CT
- 2.- Pendiente de la recta que es cercana a -3.32 (eficiencia de amplificación del 100%).

Ensayos de cuantificación relativa

Este tipo de cuantificaciones permite determinar cuantas veces (más o menos) ácido nucleico se tiene de un templado o una muestra biológica determinada con respecto a un tejido o muestra de referencia. Los resultados son expresados de manera relativa por lo que no se necesita una curva de calibración con un estándar de concentración conocida.

(applied biosystem)

Primeramente debemos realizar una normalización de la cantidad relativa de cada muestra respecto a un gen normalizador, preferentemente de expresión constitutiva en la célula (control endógeno). Estos genes mantienen un nivel de expresión constante aún en diferentes estados fisiológicos de la célula y no deben afectarse en respuesta a los tratamientos que estamos evaluando, en caso de que así sea. Para que este método sea exitoso el rango dinámico de la muestra y del control endógeno debe ser similar. Un método sensible para evaluar si esta regla se cumple es calcular el ΔCt para diferentes diluciones de la muestra y del gen normalizador.

$\Delta Ct = Ct \text{ (muestra)} - Ct \text{ (normalizador)}$, donde $Ct \text{ (muestra)}$ y $Ct \text{ (normalizador)}$ es el ciclo al cual la muestra y el normalizador respectivamente alcanzan el nivel umbral de fluorescencia en el ensayo de PCR en tiempo real. El cálculo de ΔCt se realiza para diferentes diluciones del templado y de la referencia, y se grafica la dilución analizada vs el resultado del ΔCt para cada una. Esta evaluación tiene como propósito determinar la eficiencia de amplificación entre diferentes concentraciones de ARNm tanto para la muestra como para el control endógeno, y demostrar que para una misma muestra, la proporción obtenida entre el mRNA templado y la referencia sea siempre la misma. Si la eficiencia de amplificación de la muestra y de la referencia son similares, el resultado de esta gráfica debe ser una línea recta de pendiente prácticamente 0 ó menor de 0.1.

Luego procedemos al cálculo del $\Delta\Delta Ct$.- $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ (muestra)} - \Delta Ct \text{ (calibrador)}$, donde la muestra puede ser el nivel de expresión mRNA en riñón, pulmón, etc de un gen X y el calibrador puede ser el nivel de expresión de ese mismo gen en cerebro (tejido de referencia).

Entonces el $\Delta\Delta Ct$ se calcula para diferentes tejidos así como la expresión relativa de mRNA, que está dada por la ecuación: $\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$. Si el tejido de referencia a comparar es el de menor expresión de mensajero, su valor de ΔCt será el mayor y el nivel de expresión de las muestras siempre aumentará respecto a la referencia, pero de igual forma puede disminuir. (Rodríguez-G , Rodríguez-L; 2006) .

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 10 de marzo del 2008, en la Ciudad de México D.F. para optar al Grado de Maestra en Ciencias Genómicas, a la Med Cir Omar López De Lara Díaz De León.

Dra. Sara Frías Vázquez	
Dr. Josè de Jesús Olivares Trejo	
Dra. Minerva Camacho Nuez	
M en C. Bertha Molina Álvarez	
M. en C. Consuelo Salas Labadía	

