

Alteraciones cromosómicas espermáticas en pacientes con linfoma de Hodgkin

Tratados con quimioterapia ABVD

Elia Roldán Reyes y Laura Aline López García

Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis
FES-Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México
Ciudad de México, México
eliar@unam.mx

Abstract— Hodgkin's lymphoma is a derivative of B cells and one of the most common cancer. The current treatment chemotherapy this disease is ABVD (Adriamycin, Bleomycin, Vinblastine and Dacarbazine) having 60% efficiency. The treatment increases the risk of abnormal reproductive outcome. The purpose of this study was to assess the seminal quality and frequency of chromosomal abnormalities in patients with Hodgkin lymphoma treated with ABVD. The analysis was performed by direct spermatobioscopy to evaluate semen quality, and multicolour FISH assay, using several specific DNA probes simultaneously. The results show genotoxic damage as evidenced like numerical and structural chromosomal aberrations. Partial recovery of the male germinal epithelium. We conclude that lymphoma Hodgkin's survivors treated with ABVD regime presented chromosomal instability in sperm. The most important limitation in this study was access to samples from patients with Hodgkin's lymphoma.

Keyword— *Chromosomic aberrations, cancer, sperm, multicolour FISH assay, genotoxicity.*

Resumen— El linfoma de Hodgkin es un cáncer derivado de linfocitos B, es uno de los más comunes. El tratamiento actual de quimioterapia es Adriamicina, Bleomicina, Vinblastina y Dacarbazina (ABVD), posee 60% de efectividad. Sin embargo, los efectos secundarios, aumentan el riesgo de resultados reproductivos anormales. El objetivo fue evaluar la calidad seminal y la frecuencia de anomalías cromosómicas de pacientes con Linfoma de Hodgkin tratados con ABVD. El análisis fue realizado mediante espermatobioscopia directa para evaluar la calidad seminal y ensayo de Hibridación *In Situ* Fluorescente multicolor, usando varias sondas de ADN simultáneamente. Los resultados muestran daño genotóxico evidenciado como aberraciones cromosómicas y recuperación parcial del epitelio germinal. Los individuos sobrevivientes al cáncer presentan inestabilidad cromosómica en espermatozoides. La limitación más importante en este estudio fue el acceso a muestras de los enfermos de Linfoma de Hodgkin.

Palabras claves— *Aberraciones cromosómicas, cáncer, espermatozoide, FISH multicolor, genotoxicidad.*

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo; en 2012 hubo 14 millones de nuevos casos [1]. El linfoma de Hodgkin (LH) es una entidad neoplásica de las células que existen en el tejido linfoide, concretamente en los ganglios linfáticos. Sin embargo, también puede afectar órganos tales como bazo, hígado, pulmón, y médula ósea [2,3]. El LH es un cáncer derivado de linfocitos B maduros que experimentan pérdida de su fenotipo y muestran una inusual co-expresión de marcadores de diferentes células hematopoyéticas como CD15+, CD30+, CD45+, CD79a+ [3]. Este padecimiento presenta una curva de incidencia bimodal para la edad: el primer pico ocurre en individuos de entre 15 y 25 años, y el segundo en adultos de más de 50 años [2].

Actualmente los países en vías de desarrollo han mostrado una alta incidencia en niños menores de 15 años. Esto representa sólo un leve incremento a lo largo de la adolescencia y juventud [4]. La tasa de supervivencia de 5 años del LH es de 95% para los niños (edades de 1 a 14 años) y 94% para los

adolescentes (edades de 15 a 19 años), con una supervivencia de 10 años [5]. En México, en el Instituto Nacional de Pediatría, ocupa el tercer lugar dentro del grupo de las neoplasias malignas, antecedida por leucemias y tumores sólidos del sistema nervioso central, cuya media de edad en la población infantil es de 8 años [6].

Debido al progresivo incremento en la supervivencia del paciente oncológico, derivado de los avances en el diagnóstico y tratamiento del cáncer surgen cuestionamientos relacionados con los efectos secundarios, pues se ha reportado que estos fármacos contienen conocidos mutágenos, que dañan las células de la línea germinal [7].

Este hecho implica un potencial riesgo genético debido a que las anormalidades cromosómicas transmitidas a través de gametos están asociadas con pérdida de embarazo, mortalidad infantil, malformaciones congénitas, infertilidad y desordenes genéticos, incluyendo al cáncer [8]. El esquema de poliquimioterapia denominado ABVD (adriamicina, bleomicina, vinblastina, dacarbazina) de mayor uso en la actualidad para el tratamiento de LH, es menos gonadotóxico con recuperación hasta del 100% [9], en relación con otros como MOPP (mostaza nitrogenada, oncovin (vincristina), procarvacina y prednisona).

Estos fármacos tienen mecanismos de acción bien definidos dentro de la célula. Los denominados clastógenos, dañan directamente la cadena de ADN interfiriendo con la síntesis o replicación del material genético (adriamicina, bleomicina, dacarbazina). Mientras que los aneuploidógenos afectan estructuras accesorias para la replicación del genoma (microtúbulos del huso mitótico, en el caso de la vinblastina). Todos ellos muestran efectos profundos y duraderos en la función gonadal, tanto la producción de células germinales como la función endocrina pueden verse afectadas [9,10]. A pesar de ello, la magnitud del daño por antineoplásicos varía según el agente, dosis y edad del paciente, al momento del tratamiento [9].

Para estimar la severidad del impacto en la función reproductiva del varón el análisis seminal continúa siendo la herramienta básica. El análisis de semen debe practicarse e interpretarse como se señala en los lineamientos del Manual de Laboratorio de la Organización Mundial de la Salud [11,12] que ha publicado sucesivas ediciones del “Manual para el Examen del Semen Humano y la Interacción Moco Semen” 1980, 1987, 1992, 1999 y 2010 [13]. Las cualidades que se evalúan son: aspecto o color, olor, licuefacción, viscosidad; las cuantificables son: volumen, pH, concentración espermática y número total de espermatozoides (densidad espermática por ml y densidad espermática por volumen total eyaculado), movilidad, vitalidad y morfología espermática (Tabla 1) [12]. En adición debe realizarse un análisis más profundo, pues se ha comprobado que la densidad celular y morfología (parámetros determinantes de una adecuada calidad seminal) no siempre están correlacionadas con determinaciones basadas en la integridad del DNA, en la condición haploide del esperma [14,15].

Tabla 1. Valores de referencia para espermatobioscopia reportados por la OMS [12]

	Valor de referencia
Licuefacción (min)	Total en 60
pH	7.2 - 7.8
Volumen (ml)	2.0
Concentración espermática (10 ⁶ células/ml)	20
Motilidad progresiva (%)	50
Viabilidad (%)	75
Formas Normales (%)	15

Un método efectivo para el estudio de los efectos genotóxicos de la quimioterapia es la técnica molecular, hibridación *in situ* fluorescente multicolor (M-FISH) [7,8]. La técnica FISH multicolor AM8 (Tabla 2), es una adaptación para la detección simultánea de espermatozoides portadores de anomalías cromosómicas numéricas, así como dos grandes categorías de anomalías estructurales: (1) duplicaciones y (2) deleciones cromosómicas parciales [10]. Los cromosomas espermáticos en mamíferos han sido extremadamente difíciles de estudiar debido a que la cromatina está altamente condensada en un estado inactivo y ultracompactada por puentes disulfuro intra- e inter-protaminas, por lo que resulta sumamente laborioso y difícil analizarlos por métodos de bandeado citogenético convencional [12,16]. El objetivo de este trabajo fue evaluar la calidad seminal y la frecuencia de anomalías cromosómicas de pacientes con LH tratados con quimioterapia ABVD.

Tabla 2. Aberraciones estructurales y numéricas establecidas mediante el ensayo de FISH-multicolor AM8 [14].

Daño cromosómico	Anomalía	Fenotipo	Representación gráfica
Estructural	Delección	A08	
		OM8	
	Duplicación	AMM8	
		AAM8	
Numérico	Aneuploidía	AM0	
		AM88	
	Disomia	AAMM88	
	Nulisomia	000	
No hay	Ninguna	AM8	

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Tamaño de muestra

- Se Trabajó con 7,702 espermatozoides de dos pacientes jóvenes del departamento de Hematología, del servicio en Oncología del Hospital General de México, diagnosticados con LH y tratados con poliquimioterapia ABVD y, con 5000 espermatozoides de hombre sano (control, sin

antecedentes clínicos). Todos autorizaron su participación a través de una carta de consentimiento informado antes de su inclusión al protocolo de investigación. Las muestras de líquido seminal se obtuvieron al menos 6 meses después de terminar el tratamiento.

- El análisis de semen fue realizado de acuerdo con el Manual de Laboratorio de la OMS (1999) [12]. Las muestras fueron clasificadas en: NL (Normal o estándar) cuando los parámetros seminales del donador expresan valores superiores o iguales a los valores de referencia; y NN (No Normal o no estándar) cuando estos parámetros expresan valores inferiores a los de referencia. Los determinantes son la densidad y la morfología espermática.

Preparación de la muestra espermática

- Las muestras seminales se fraccionaron posterior a su recolección y se almacenaron a -20°C , hasta su uso. Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y homogenizaron gentilmente con pipeta Pasteur, un volumen de 5-7 μl de semen, se realizaron frotis (Figura 1a), y se dejaron secar a temperatura ambiente de 24 a 48 horas en una superficie limpia, protegida del polvo. Se elaboraron dos laminillas por individuo

Hibridación *in situ* fluorescente

- Esquema de sondas para FISH AM8 (Tabla 2, y Figura 1f).
- Sonda 1Cen espectro rojo (Vysis) [A]
- Sonda 1p36 espectro verde (Sure Fish) [M]
- Sonda 8Cen espectro amarillo (Vysis) [8]

a) Descondensación del núcleo espermático

Se fijó el frotis en metanol al 100%, se dejó secar a temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente la laminilla se introdujo en DTT (DL-ditiotreitol, Sigma-USA), y LIS (3,5-ácido diiodosalisílico, Sigma-USA), para descompactar el ADN (Figura 1b). Se dejó secar a temperatura ambiente de 30-60 min, posterior al secado se revisaron en el microscopio, y se delimitó la zona de hibridación.

b) Desnaturalización e hibridación de sondas comerciales y ADN espermático

Se desnaturalizó ADN espermático (Figura 1c) en solución formamida (FA) [70%/2 X SSC a 78°], se transfirieron a una serie de alcoholes (etanol frío) (70%, 85% y 100%). Simultáneamente se desnaturalizó la mezcla de sondas comerciales a 78°C , inmediatamente se aplicó sobre la zona de hibridación (ADN espermático), sin generar burbujas y se selló la laminilla. Para la hibridación (Figura 1d), se colocaron en una cámara húmeda preincubadas a 37°C , por 36-48 horas, en obscuridad .

c) Lavados post-hibridación y contraste

Las laminillas se retiraron de la cámara húmeda, y se les removió el cubreobjetos. Se realizaron lavados (Figura 1e) en una serie de soluciones salinas en un gradiente de temperatura (45° , 37° y 25°C) y se aplicó medio de contraste y contra-tinción DAPI/Vectashield para su posterior evaluación, en el microscopio de fluorescencia (Tabla 2).

d) Evaluación de laminillas

Se observó cada laminilla al microscopio con sistema de fluorescencia a 100X con los siguientes filtros: Texas red, FITC (simples); doble (FITC/Texas red) y triple banda (DAPI/FITC/Texas red). Bajo

estrictos criterios de discriminación de aberraciones, tanto numéricas como estructurales [17] (Figura 1f) y (Tabla 2).

Análisis estadístico

Se aplicó χ^2 , para cotejar la frecuencia de aberraciones cromosómicas entre espermias provenientes de individuos con quimioterapia y control (sin quimioterapia); Z para proporciones para los porcentajes espermatozoides malformados (teratozoospermia); con $p < 0.05$ para establecer diferencias significativas.

Hibridación *in situ* fluorescente en células espermáticas (FISH AM8)

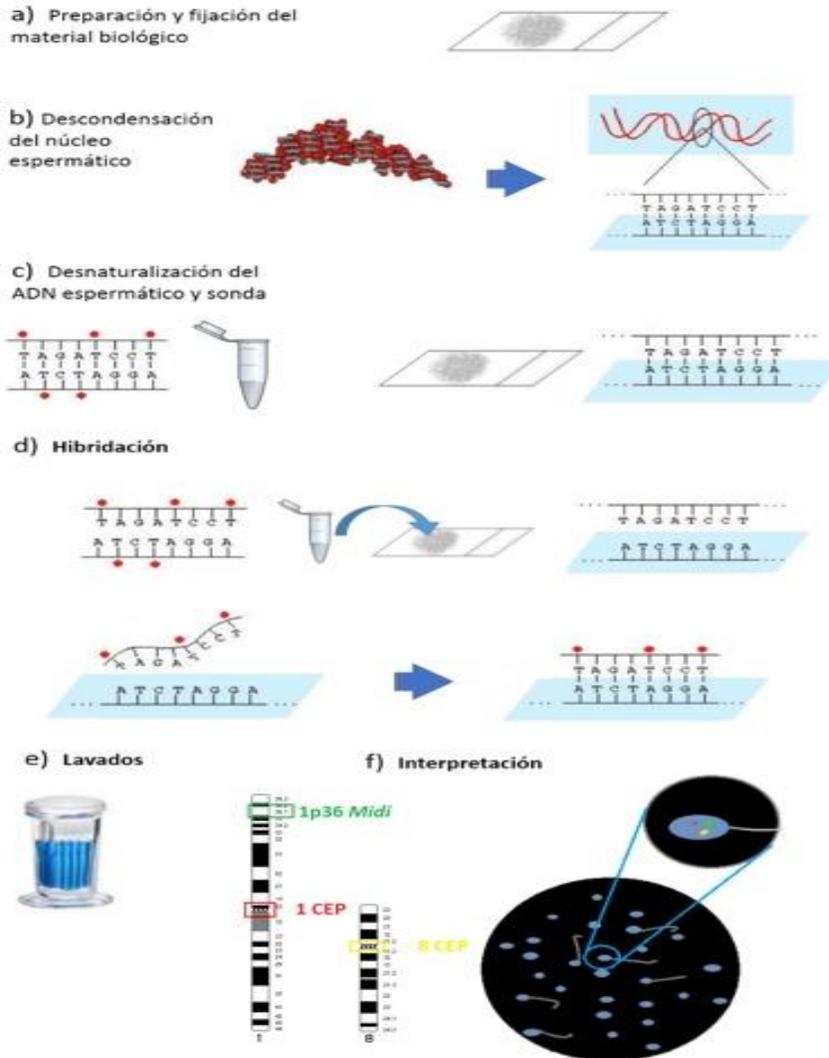


Figura 1. Esquema de procedimiento para FISH-M AM8 en esperma [21].

III. RESULTADOS

En la tabla 3 se presentan los datos clínicos de los participantes, así como los valores para establecer calidad seminal, y los porcentajes de aberraciones cromosómicas tanto numéricas como estructurales, obtenidos de las evaluaciones con el método FISH-multicolor. Como se observa las edades de los participantes son semejantes con una media de 24 años, hay variaciones en el estadio de la enfermedad, el tratamiento y su dosificación, el cual está en función del avance del proceso canceroso. El tiempo sin tratamiento de los donadores participantes, fue en promedio de 13.5 meses.

De la calidad seminal (Tabla 3), la densidad espermática de los pacientes con linfoma de Hodgkin NL190 y NN177 tratados con quimioterapia ABVD, está dentro de los valores de referencia (OMS, 1999) [12] de 20 a 200 x10⁶ células/ml, lo que significa que los pacientes con LH, han recuperado su cuenta espermática, es decir no se observa efecto citotóxico; en relación a la morfología espermática (el estándar es 15% de formas normales, 75% de formas anormales, Tabla 1), se observó que el porcentaje de teratozoospermia (formas anormales^a) en el individuo NN177 con LH y quimioterapia ABVD, es mayor (88%) que el control o estándar NL-111 (78%), presenta el 11.5 % de formas normales, y el valor de referencia es de 15%, presentando mala calidad seminal.

Tabla 3. Datos clínicos, calidad seminal y aberraciones cromosómicas de sobrevivientes a linfoma de Hodgkin

Paciente	Edad de Diagnóstico (años) / estadio	Tratamiento / Dosificación ABVD	Tiempo sin exposición (meses)	Densidad (10 ⁶ espermias / ml)	Teratozoospermia ^a (%)	ACN (%)	ACE (%)	Total Espermatozoides (N)
Control NL-111	24	--	--	154	78	0.44	0.34	5000
NL-190 LH	22 /IA	8 dosis 4 ciclos	16	62.5	72.5	0.88*	0.52*	2702
NN-177 LH	26/IVA	12 dosis 6 ciclos	11	27.0	88.5 ^(b)	1.15*	1.76**	5000
Media	24		13.5					4234

ACN y ACE, aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales. ^(b) p < 0.05 Z para proporciones; Ji² *p < 0.025; **p < 0.001.

En relación con las aberraciones cromosómicas numéricas (ACN), se leyó un promedio de cuatro mil espermias por muestra, donde los enfermos con LH y tratamiento ABVD, NL190 y NN177, mostraron una frecuencia significativamente (p < 0.025) mayor (0.88%, 1.115%) que el control (0.44%); las ACN más frecuentes fueron disomias (cromosomas 1 y 8). Así mismo, las aberraciones cromosómicas estructurales (ACE), de los pacientes con LH, mostraron un incremento (0.52% y 1.76%) significativo (p < 0.025 p < 0.001) mayor que el control (0.34%). En estos casos las ACE más frecuentes fueron las duplicaciones (región 1p36) (datos no se muestran).

IV. CONCLUSIONES

Con base en los resultados de calidad seminal, no se observó efecto citotóxico en los sobrevivientes al Linfoma de Hodgkin. Con los resultados de aberraciones cromosómicas tanto numéricas como estructurales, se evidencia efecto genotóxico, asociado a inestabilidad cromosómica, que implican riesgo reproductivo potencial, debido a que las anormalidades cromosómicas transmitidas a través de gametos están asociadas a pérdida de embarazo, mortalidad infantil, malformaciones congénitas, infertilidad y desordenes genéticos, incluyendo el cáncer.

RECONOCIMIENTOS

Agradecemos el apoyo de las Doctoras: Ema Gallardo (Departamento de Hematología Hospital General, SS), Silvia Sánchez, Bertha Molina (Laboratorio de Citogenética del INP-SS), Sara Frías (Laboratorio de Citogenética del INP-SS, IIB-UNAM).

Manifestamos nuestro agradecimiento al programa PAPIIT-UNAM, por el apoyo financiero al proyecto IN213013-3. Becas: Conclusión de estudios-licenciatura F-054014, y tesis-licenciatura F-147815, otorgadas a Laura Aline López-García.

T. Magali Roldán, por el apoyo técnico informático.

REFERENCIAS

- [1] B. W. Stewart, C.P. Wild (2014) World Cancer Report. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- [2] G. Ruiz-Argüelles (2009). Fundamentos de Hematología. (4ª ed.) México: Editorial Médica Panamericana.
- [3] R. A. Küppers, M. Engert Hansmann (2012) Hodgkin Lymphoma. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(10): 3439-3447.
- [4] P. Correa, G.T. O'Connor (1973). Geographic pathology of lymphoreticular tumors: summary of survey from the geographic pathology committee of the International Union Against Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 50: 1609–17.
- [5] J.D. Wilkinson, L.E. Fleming, J. MacKinnon, L. Volti, B. Wohler-Torres, et al. (2001). Lymphoma and lymphoid leukemia incidence in Florida children: ethnic and racial distribution. *Cancer*, 91(7): 1402-1408.
- [6] R. Rivera-Luna (2002). Cap. 16 Factores pronósticos de las neoplasias malignas en pediatría. En Rivera-Luna (Ed.). *Oncología Pediátrica: Conceptos Básicos y Clínicos* (pp. 303-335). México: Intersistemas S.A. de C.V.
- [7] M. Roca de Bes (2012). Cap. 15 Aspectos psicosociales de la preservación de la fertilidad con indicación médica y sin ella. En *Manual de Intervención Psicológica en Reproducción Asistida* (pp. 133-140). Editorial Médica Panamericana.
- [8] H.G. Tempest, E. Ko, P. Chan, B. Robaire, A. Rademaker et al. (2008). Sperm aneuploidy frequencies analysed before and after chemotherapy in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients. *Human Reproduction*, 23(2): 251-258.
- [9] R. Gerson (2000). Fertilidad y cáncer. *Revista Médica del Hospital General de México*, 63(1): 30-40.
- [10] E. Cvitkovic, J.P. Droz, J.P. Armand y S. Khoury (1993). *Handbook of chemotherapy on clinical oncology* (2ª ed.) Rhone-Poulenc Rorer, Paris: Scientific Communication International, Ltd.
- [11] R. Tapia-Serrano (2012). Una visión actual de la infertilidad masculina. *Revista Mexicana de Reproducción*, 4(3): 103-109.
- [12] World Health Organization (1999). *Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction*. Cambridge, U.K.: Cambridge University Press.

- [13] I. Sarabia, J. Munuce (2011). Nuevos valores para el espermiograma OMS 2010. Cartas al editor, *Revista Med Chile*, 139: 548-549.
- [14] D.E. Slotter, X. Lowe, I.D. Moore, J. Nath, A.J. Wyrobek (2000). Multicolor FISH analysis of chromosomal breaks, duplications, deletions, and numerical abnormalities in the sperm of healthy men. *Am J Hum Genet*, 67:862-872.
- [15] R. Balhorn (1982). A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol*, 93:298-305.
- [16] H.U. He, N. Mihar, T. Mizunoe, Y. Nakakoa, E. Okamoto y K. Ohama (1996). Detection of aneuploidy in human spermatozoa using fluorescence in situ hybridation (FISH). *Jpn J Human Genet*, 41: 381-389.
- [17] A.J. Wyrobek, T.E. Schmid, F. Marchetti (2005). Cross-Species Sperm-FISH Assay for chemical testing and assessing paternal risk for chromosomally abnormal pregnancies. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 45: 271-283.
- [18] A. Moroto Morales (2012). Evaluación objetiva de la morfometría de los espermatozoides de ovino (*Ovis aries*) relacionado con la fertilidad. Tesis Doctoral. Universidad de Castilla.
- [19] J.P. Meza, I.P. Dávalos, H. Rivera, S. Peres, F. Rivas (2006). Chromosomal abnormalities in patients with azoospermia in Western Mexico. *Arch Androl*, 52:87-90.
- [20] C. Salas, A. Niembro, V. Lozano, E. Gallardo, B. Molina, et al. (2012). Persistent Genomic Instability in Peripheral Blood Lymphocytes From Hodgkin Lymphoma Survivors. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 53: 271-280.
- [21] FISH Cartoon. Recuperado el 6 de junio de 2017 de <http://www.pathology.washington.edu/galleries/Cytogallery/main.php?file=fish>