



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**BIOMEDICINA**

**BÚSQUEDA DE DAÑO EN LA ESTRUCTURA DE LA CROMATINA EN  
ESPERMATOZOIDES DE SOBREVIVIENTES A LINFOMA DE HODGKIN QUE  
FUERON TRATADOS CON ABVD Y MOPP**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**ARMANDO GARCÍA PÉREZ**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. SARA FRIAS VÁZQUEZ**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS UNAM/  
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

**COMITÉ TUTOR: DR. JOSÉ MIGUEL BETANCOURT RULE**  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA  
**DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA UNAM

**MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO, MARZO 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**BIOMEDICINA**

**BÚSQUEDA DE DAÑO EN LA ESTRUCTURA DE LA CROMATINA EN  
ESPERMATOZOIDES DE SOBREVIVIENTES A LINFOMA DE HODGKIN QUE  
FUERON TRATADOS CON ABVD Y MOPP**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**ARMANDO GARCÍA PÉREZ**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. SARA FRIAS VÁZQUEZ**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS UNAM/  
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

**COMITÉ TUTOR: DR. JOSÉ MIGUEL BETANCOURT RULE**  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA  
**DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA UNAM

**MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO, MARZO 2018**

Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM.  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 11 de septiembre del 2017, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **GARCÍA PÉREZ ARMANDO** con número de cuenta **095148704** con la tesis titulada "**Búsqueda de daño en la estructura de la cromatina en espermatozoides de sobrevivientes a Linfoma de Hodgkin que fueron tratados con ABVD y MOPP**", realizada bajo la dirección de la **DRA. SARA FRÍAS VÁZQUEZ**:

Presidente: DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO  
Vocal: DRA. ELIA ROLDÁN REYES  
Secretario: DR. JOSÉ MIGUEL BETANCOURT RULE  
Suplente: DRA. PATRICIA RAMOS MORALES  
Suplente: DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO

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

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mx. a 14 de noviembre del 2017.

  
DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA  
COORDINADOR DEL PROGRAMA



## **Agradecimientos**

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM

A CONACYT por la beca No. 330559 recibida durante el periodo del 1 de agosto del 2014 al 31 de julio del 2016

Este proyecto contó con el apoyo de los proyectos CONACyT FOSISSS SALUD 2011-1-162003, INP 003/2013

A la Tutora principal: Dra. Sara Frias Vázquez (Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM/Instituto Nacional de Pediatría), y a los miembros del comité tutorial: Dr. José Miguel Betancourt Rule (Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa), Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano (Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM). Por su apoyo, tiempo y críticas para la realización de este proyecto.

## **Agradecimientos a título personal**

A la Dra. Sara Frias por su confianza, paciencia e invaluable motivación, gracias totales.

Al laboratorio de citogenética del Instituto Nacional de Pediatría (INP) en donde se realizó la presente tesis, y en especial a las M. en C. Bertha Molina y Silvia Sánchez por su valiosa ayuda en la realización de las espermotobioscopías y procesamiento de muestras. Gracias por enseñarme predicando con el ejemplo.

A la clínica de sobrevivientes de linfoma de Hodgkin del INP, especialmente a la Dra. Ana Niembro y del Hospital General de México, especialmente a la Dra. Emma Gallardo, por su valiosa ayuda en el reclutamiento de pacientes.

A la Dra. Betzabet Quintanilla Vega, Jefa del Departamento de Toxicología. (Departamento de Toxicología-Cinvestav), así como a su estudiante de Doctorado Pamela Tello, por su invaluable ayuda para la realización e interpretación de la metodología SCSA.

A los miembros del jurado, por su valioso tiempo, puntuales observaciones y recomendaciones. Dra. Elia Roldán Reyes, Dra. Patricia Ramos Morales, Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo, Dr. José Miguel Betancourt Rule y Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano.

## **Dedicatoria**

*Para mis amores:*

*Atenea y Abril.*

## ÍNDICE

### RESUMEN

### I. INTRODUCCIÓN

### II. OBJETIVOS

### III. ANTECEDENTES

#### III.1. Linfoma de Hodgkin

##### III.1.1 Subgrupos de Linfoma de Hodgkin Clásico

##### III.1.2 Predominancia linfocítica nodular

#### III.2. Tratamiento para el Linfoma de Hodgkin

##### III.2.1 Estadificación de la enfermedad

##### III.2.2 Quimioterapia

##### III.2.3 Radioterapia

#### III.3. Antecedentes de daño genotóxico por quimioterapia

#### III.4. Daño a la cromatina, ensayo SCSA

### IV. METODOLOGÍA

#### IV.1. Población de estudio

#### IV.2. Técnicas

##### IV.2.1 Espermatobioscopía directa

##### IV.2.2 Evaluación de la estructura de la cromatina espermática por citometría de flujo (ensayo-SCSA)

##### IV.2.3 Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) en espermatozoides

### V. RESULTADOS

#### V.1. Población estudiada

#### V.2. Espermatobioscopía

#### V.3. Daño en la estructura de la cromatina

#### V.4. Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) en espermatozoides metodología AM8

### VI. DISCUSIÓN

#### VI.1. Se encontró alteración de la cromatina en pacientes pretratamiento

#### VI.2. Una tercera parte del grupo de sobrevivientes a tratamiento con MOPP/ABVD o sólo ABVD, presentaron alteración en la estructura de la cromatina

VI.3. Daño cromosómico por FISH AM8 y su relación con el daño a la cromatina detectado por SCSA

VII. CONCLUSIONES

VIII. LITERATURA CITADA

ANEXOS

Anexo 1. Carta de consentimiento informado

Anexo 2. Cuestionario de tamizaje

Anexo 3. Cuestionario principal

Anexo 4. Hoja para ser llenada por el médico

Anexo 5. Análisis por individuo del estudio de integridad de la cromatina (Gráficas de puntos e Histogramas del ensayo SCSA)

## RESUMEN

**Introducción:** El linfoma de Hodgkin (LH), es una neoplasia maligna que se presenta primordialmente en adolescentes. Los tratamientos empleados son muy eficientes, con sobrevivida a 10 años en el 80% de todos los pacientes diagnosticados; esto genera una población en edad reproductiva expuesta a agentes identificados como genotóxicos. Se sabe que ABVD (adriamicina, bleomicina, vinblastina, dacarbazina) produce oligospermia y azoospermia transitoria mientras que MOPP (mostaza nitrogenada, vincristina, procarbazona y prednisona), produce oligospermia o azoospermia de larga duración y azoospermia permanente en aproximadamente 80% de los pacientes, sin que se sepa la condición genotóxica de los espermatozoides remanentes en ellos.

**Objetivo:** Evaluar las consecuencias genotóxicas del tratamiento anticáncer que incluye ABVD y MOPP en células germinales de pacientes con LH.

**Metodología:** Se estudiaron muestras de semen de cuatro grupos de individuos: (I) 19 individuos sanos, (II) 4 pacientes con LH antes de recibir tratamiento, (III) 23 pacientes con LH tratados con ABVD y (IV) 21 pacientes con LH tratados con MOPP/ABVD. A todos los individuos se les solicitó muestra de semen para realizar espermatobioscopia directa. Se evaluó la estructura de la cromatina espermática por la metodología SCSA (por sus siglas en inglés: sperm chromatin structure assay) la cual detecta por citometría de flujo, el DNA desnaturalizado, por daño estructural. Se obtuvo el índice de fragmentación del DNA (DFI) (por sus siglas en inglés: DNA fragmentation index); se consideró un DNA estructuralmente dañado cuando el DFI > 25%. A algunas de las muestras que resultaron positivas y otras negativas para el DFI, se les realizó FISH (por sus siglas en inglés: fluorescence in situ hybridization) con la metodología AM8 para detectar daño estructural y numérico en los espermatozoides, para fines de comparación con la metodología SCSA.

**Resultados:** En los individuos del grupo I (testigo), grupo II (antes de tratamiento) y grupo III (tratados con ABVD) todos los valores promedio de las espermatobioscopias están dentro de los límites normales, de acuerdo a la OMS 2010; en el caso de los valores correspondientes al Grupo IV (tratados con MOPP/ABVD) se encuentran dentro de lo sugerido como normal, excepto en el parámetro de movilidad el cual se encontró por debajo 31.62 versus  $\geq 40\%$ . Con respecto al ensayo SCSA los 19 sujetos del grupo testigo tuvieron DFI  $\leq 25\%$ , media de  $12.21 \pm 4.72$ , rango de 7-25%. 2/4 individuos del grupo II tuvieron un DFI >25% la media fue de

19.5 ± 15.86 con un rango de 4-36. Del grupo III 5/23 individuos tuvieron el DFI >25%, la media fue de 16.65 ± 10.58, rango de 4-42 y del grupo IV 7/21 individuos tuvieron un DFI ≥ 25%. la media fue de 21.9 ± 12.54, rango de 8-53.

De los datos correspondientes al daño estructural detectado por FISH-AM8, se analizaron dos testigos, ambos presentaron delección de la región 1p, con una frecuencia promedio de 0.00069. En el caso del grupo III, se escogieron dos muestras con DFI bajo y dos con alto, se encontró mayor daño en las muestras de los pacientes con DFI bajo, con una frecuencia de daño estructural de 0.00072/cel y las muestras con DFI alto de 0.00024/cel. Para el grupo IV se analizaron dos muestras representativas con DFI bajo, éstas presentaron un promedio de frecuencia de daño estructural de 0.0022/cel y una muestra con DFI alto, que presentó una frecuencia de 0.0012 alteraciones por célula, sin diferencias significativas.

Con respecto a los datos obtenidos de daño numérico detectado por FISH-AM8, las muestras de los dos testigos presentaron una frecuencia de 0.00039/cel, mientras que las muestras tanto de bajo como de alto DFI presentaron una frecuencia promedio de aneuploidías mayor que la de los testigos, con frecuencias de entre 0.00055 a 0.00076/cel, sin diferencia significativa entre ellos.

**Discusión:** Es evidente que el tratamiento anticáncer en los pacientes con LH puede inducir daño en la cromatina, persistente en algunos de ellos. En cuanto a la quimioterapia ABVD, aunque aparentemente no es capaz de alcanzar las células madre germinales, una tercera parte de los pacientes presentaron daño en la cromatina espermática. Específicamente, en cuanto al grupo IV tratado con QT MOPP/ABVD se observó que se encuentra más afectado que el grupo III tratado con ABVD. Es muy probable que la procarbazona sea la responsable de los altos índices de daño en la cromatina observados en los pacientes con MOPP/ABVD.

Los resultados de este estudio, mostraron una mala calidad de la espermatobioscopia y un mayor número de pacientes con DFI alto cuando fueron tratados con MOPP. El uso de QT sin agentes alquilantes, como lo es la terapia ABVD parece ser menos agresiva para los espermatozoides, sobre todo si se considera que en este estudio sólo se están considerando los pacientes tratados con QT que incluye MOPP, que tienen producción de espermatozoides, por lo que un sesgo importante es que los pacientes más afectados a nivel gonadal, no se están estudiando puesto que tuvieron azoospermia permanente o de larga duración. En general, podemos sugerir que el uso tanto de ABVD como de MOPP/ABVD, da como

resultado una población de individuos sobrevivientes de cáncer que llegan a una edad reproductiva con esperanza de fertilidad, pero con gametos con cromatina afectada, lo cual los convierte en foco de atención ya que podrían presentar fertilidad, pero con posibles problemas de concepción o en su descendencia.

En este estudio no se encontró correlación entre las frecuencias del daño detectado con las metodologías SCSA y el realizado con FISH, es probable que esta falta de asociación se deba a que no fueron estudiados con FISH todos los pacientes, sino solamente uno o dos de cada grupo con DFI alto y bajo. Por otra parte, el FISH es un estudio que genera información de célula individual y tan sólo de 2/24 cromosomas, por lo que es probable que, aunque ambos procedimientos detecten daño estructural del DNA, se requiera de un estudio de población más grande para poder encontrar coincidencias relativas al daño genotóxico conferido por los agentes anticáncer que aquí se estudiaron.

**Conclusiones:** En el grupo pretratamiento, dos de los cuatro pacientes tuvieron también alteración de la estructura de la cromatina, por lo que es necesario incrementar el tamaño de muestra, para determinar si es una característica propia de la enfermedad.

Se encontraron individuos con valores altos de DFI en todos los grupos de pacientes, así como en el grupo testigo.

La QT que incluye MOPP, indujo valores más altos de DFI en un mayor número de pacientes, comparados con los que recibieron solo tratamiento ABVD.

No se encontró correlación entre el daño detectado por DFI y el encontrado por el ensayo de FISH-AM8. Es posible que las metodologías SCSA y el FISH-AM8 detecten diferentes tipos de daño genómico estructural.

Es necesario aumentar el número de individuos estudiados con este tipo metodologías, ya que proporcionan información de gran relevancia para detectar el daño generado por la enfermedad y el ocasionado por el tratamiento administrado, así como para obtener información del daño postratamiento con probables consecuencias a nivel de fertilidad o bien, después de la concepción, en la descendencia.

## SUMMARY

**Introduction:** Hodgkin's lymphoma (HL) is a malignant neoplasm that occurs primarily in adolescents. The treatments used are very efficient, with a 10-year survival in 80% of all patients diagnosed; this generates a population in reproductive age, that was exposed to agents identified as genotoxic. It is known that ABVD (adriamycin, bleomycin, vinblastine, dacarbazine) produces transient oligospermia and azospermia while MOPP (nitrogen mustard, vincristine, procarbazine and prednisone), produces oligospermia, long-lasting azospermia or permanent azospermia in approximately 80% of patients, without information on the genotoxic condition of the sperm remaining in them.

**Objective:** To evaluate the genotoxic consequences of anticancer treatment that includes ABVD and MOPP in germ cells of patients with LH.

**Methodology:** Semen samples from four groups of individuals were studied: (I) 19 healthy individuals, (II) 4 patients with LH before-treatment, (III) 23 patients with LH after treatment with ABVD and (IV) 21 patients with LH after treatment with MOPP / ABVD. All individuals donated a sample of semen and direct spermatobioscopy was performed. The structure of the chromatin from the sperm was evaluated by the methodology SCSA (sperm chromatin structure assay) which detects, by flow cytometry, the fragmented DNA, denatured as a consequence of structural damage. The DNA fragmentation index (DFI) was obtained; a DNA was considered structurally damaged when the DFI >25%. Some of the samples that were positive and others negative for the DFI, were additionally studied by FISH (fluorescence in situ hybridization) using the AM8 methodology which detects structural and numerical damage in sperm, this, for comparison with the SCSA methodology.

**Results:** In the group I (control), group II (before treatment) and group III (treated with ABVD) all the average values of spermatobioscopies were within normal limits, according to WHO 2010; values corresponding to Group IV (treated with MOPP / ABVD) were found within normal values, except in the mobility parameter which was found below 31.62 versus  $\geq 40\%$  reported as normal. With respect to the SCSA trial, the 19 subjects of the control group had DFI  $\leq 25\%$ , mean of  $12.21 \pm 4.72$ , range of 7-25%. 2/4 individuals from group II had a DFI > 25%, the mean was  $19.5 \pm 15.86$  with a range of 4-36. In group III 5/23 individuals had the DFI >25%, the mean was  $16.65 \pm 10.58$ , range of 4-42 and in the group IV 7/21 individuals had a DFI  $\geq 25\%$ , the mean was  $21.9 \pm 12.54$ , range of 8-53.

Regarding the data on the structural damage detected by FISH-AM8, two controls were analyzed, both of them presented structural damage in 1p region, with an average frequency of 0.00069. In the case of group III, two samples were chosen with low DFI and two with high, a greater damage was found in the samples of patients with low DFI, with a frequency of structural damage of 0.00072 / cel and samples with high DFI of 0.00024 / cel. In group IV, two representative samples with low DFI were analyzed, these presented an average structural damage frequency of 0.0022 / cel and a sample with high DFI, which presented a frequency of 0.0012 alterations per cell, without significant differences.

Regarding numerical damage detected by FISH-AM8, the samples from patients with both low and high DFI presented an average frequency of aneuploidies greater than of the controls, however they did not present a significant difference between them.

**Discussion:** It is evident that in patients with LH, anticancer treatment can induce chromatin damage, persistent in some of them. ABVD chemotherapy, although apparently it is not able to reach the germ cells, a third of the patients presented damage in the sperm chromatin. Specifically, we observed that group IV treated with MOPP / ABVD, was more affected than group III treated with ABVD. It is probably that procarbazine is mainly responsible for the high rates of chromatin damage observed since it is the only compound that can reach the germ stem cells.

The results of this study showed a poor quality of spermatobioscopy and a higher number of patients with high DFI when treated with MOPP. The use of QT without alkylating agents, as in ABVD therapy, seems to be less aggressive for sperm, especially considering that in this study only patients with sperm production were include, even when were treated with MOPP, a chemotherapy that induces a high rate of azoospermic patients, therefore, an important bias is that the patients most affected at the gonadal level are not being studied since they had permanent or long-lasting azoospermia. In general, we can suggest that the use of both ABVD and MOPP / ABVD results in a population of cancer survivors reaching a reproductive age with hope of fertility, but with gametes with affected chromatin, which makes them focus of attention since they could present fertility, but with possible problems of conception or problems in their offspring.

In this study, no correlation was found between the frequencies of the damage detected with the SCSA methodologies and that performed with FISH, it is likely that this lack of

association is due to the fact that not all the patients were studied with FISH, but only one or two of each group with high and low DFI. On the other hand, FISH is a study that generates individual cell information and only 2/24 chromosomes, so although both procedures detect DNA structural damage, a larger population of study is required to find coincidences regarding the genotoxic damage conferred by the anticancer agents studied here.

**Conclusions:** In the pretreatment group, two of the four patients also had alteration of the chromatin structure, so it is necessary to increase the sample size, to determine if it is a characteristic of the disease.

Individuals with high DFI values were found in all groups of patients, as well as in the control group.

The QT that includes MOPP, induced higher values of DFI in a greater number of patients, compared with those who received only ABVD treatment.

No correlation was found between the damage detected by DFI and that found by the FISH-AM8 assay. It is possible that the SCSA and FISH-AM8 methodologies detect different types of structural genomic damage.

It is necessary to increase the number of individuals studied with this type of methodologies, since they provide information of great relevance to detect the damage generated by the disease and the one caused by the administered treatment, as well as to obtain information on post-treatment damage with probable consequences at the level of fertility or, after conception, in offspring.

## I. INTRODUCCIÓN

El linfoma de Hodgkin (LH), es una neoplasia maligna que se presenta primordialmente en adolescentes. Los tratamientos empleados son muy eficientes, con sobrevida a 10 años en el 80% de todos los pacientes diagnosticados; esto genera una población en edad reproductiva expuesta a agentes identificados como genotóxicos. Se sabe que ABVD (adriamicina, bleomicina, vinblastina, dacarbazina) produce oligospermia y azoospermia transitoria mientras que MOPP (mostaza nitrogenada, vincristina, procarbazona y prednisona), produce oligospermia o azoospermia de larga duración y azoospermia permanente en aproximadamente 80% de los pacientes, sin que se sepa la condición genotóxica de los espermatozoides remanentes en ellos.

En los supervivientes a LH, se presentan segundas neoplasias hasta en un 20%. La pérdida de función testicular por la exposición a ABVD representa citotoxicidad de células gonadales y esto es un fuerte indicador de daño genético, sin embargo, para demostrar genotoxicidad en las células germinales, se requiere hacer el estudio directo del material genético (Frias, 2002). La búsqueda de daño estructural en la cromatina de espermatozoides es necesaria, debido a que su presencia tendría una repercusión muy importante en la salud reproductiva de los pacientes y de sus descendientes. Sin embargo, hasta la fecha existen muy pocos reportes en la literatura en los que se haya investigado la existencia de daño estructural de la cromatina por estos tratamientos. Una de las razones por las que se propuso estudiar daño cromosómico estructural en células germinales, es que en linfocitos de pacientes tratados con ABVD, nuestro grupo encontró una alta frecuencia de daño cromosómico predominantemente estructural (Salas *et al.*, 2012), por lo que es probable que existan alteraciones en la integridad de la cromatina de los espermatozoides, ya que éstas son las lesiones precursoras de las alteraciones cromosómicas estructurales. La metodología SCSA es una de las más utilizadas para determinar la integridad de la cromatina y el método de FISH multicolor AM8 se puede utilizar para corroborar la presencia de daño cromosómico en los pacientes con un alto índice de fragmentación de la cromatina.

El presente trabajo se realizó en pacientes que fueron tratados con los esquemas quimioterapéuticos MOPP y/o ABVD, por lo menos un año antes de la recolección de la muestra, de manera que los espermatozoides que estuvieron en contacto con la quimioterapia

ya no están presentes, sin embargo si el tratamiento afectó a algunas de las células troncales germinales, es posible que pudieran directamente generar células diferenciadas con daño en el DNA, afectando la integridad de la cromatina, o bien éstas podrían portar mutaciones en genes involucrados con el reconocimiento y/o reparación de daño al DNA, y las células troncales afectadas podrían estar generando continuamente células germinales que podrían diferenciarse a espermatozoides con alteraciones en su genoma. El daño del tipo condensación anormal de la cromatina y rupturas del DNA en espermatozoides que se detectan con las metodologías propuestas, se ha correlacionado con un decremento en la fertilidad de los varones (Bungum *et al.*, 2011). Cabe mencionar que los resultados obtenidos de este estudio pueden colaborar al conocimiento sobre la genotoxicidad *in vivo* producida por los compuestos de ABVD y MOPP, además a nivel clínico contribuye a la selección más adecuada de los esquemas de tratamiento anticáncer y directamente en los pacientes es un factor pronóstico de la fertilidad.

## **II. OBJETIVOS**

### **General:**

Evaluar las consecuencias genotóxicas del tratamiento anticáncer que incluye ABVD y MOPP en células germinales de pacientes con LH.

### **Particulares:**

1. Investigar mediante estudio de espermatobioscopía, la calidad de semen de pacientes con LH que fueron tratados con quimioterapia ABVD y MOPP.
2. Investigar si los tratamientos ABVD y MOPP inducen daño en la estructura de la cromatina de espermatozoides de pacientes con LH, mediante los ensayos de integridad de la cromatina espermática SCSA y corroborar en pacientes representativos, el daño cromosómico estructural mediante FISH en interfase, ensayo AM8.

### **III. ANTECEDENTES**

#### **III.1. Linfoma de Hodgkin**

Linfoma de Hodgkin (LH) es una neoplasia maligna linfoide y representa entre el 10-15 % de todos los linfomas. Durante las últimas décadas, los avances en radioterapia y quimioterapia han aumentado significativamente la sanación de los pacientes. En la actualidad, más del 80% de todos los pacientes diagnosticados menores de 60 años son sobrevivientes. Sin embargo, algunos de ellos mueren debido a las complicaciones agudas o tardías, ya que el tratamiento induce tumores secundarios y enfermedades cardiovasculares (Gobbi *et al.*, 2013).

Este tipo de cáncer se asocia a dos procesos distintos: un agente infeccioso de baja infectividad puede estar relacionado con la enfermedad en un 30% a 50% de los adultos jóvenes, mientras que un mecanismo compartido con otros linfomas puede ser la causa de la patogénesis del LH que se produce en el grupo de mayor edad. El genoma del virus de Epstein-Barr (VEB) ha sido detectado en los LH que ocurren en pacientes sin inmunodeficiencias conocidas, las personas con mononucleosis infecciosa están en mayor riesgo de desarrollar LH asociado con el VEB. Los mecanismos patogénicos de este virus aún no se conocen en su totalidad. Para confirmar el diagnóstico, es necesario identificar la célula maligna Reed Sternberg, dentro de un ambiente celular apropiado de linfocitos reactivos normales, eosinófilos e histiocitos (Gobbi *et al.*, 2013; Domínguez *et al.*, 2015; Ansell, 2016.)

Se reconocen dos grupos histológicos de la enfermedad: predominancia linfocítica nodular, que incluye aproximadamente el 5% de todos los casos y el clásico, que comprende a la mayoría de los pacientes. En el LH clásico, se pueden identificar los siguientes subgrupos: esclerosis nodular, celularidad mixta, depleción linfocítica y predominancia linfocítica (Ansell, 2016).

##### **III.1.1 Subgrupos de Linfoma de Hodgkin Clásico**

*Esclerosis Nodular:* es el subtipo más común y que con mayor frecuencia afecta a los adolescentes y adultos jóvenes, por lo general involucra la región cervical, supraclavicular y del mediastino.

*Celularidad mixta*: es más común que se presente tanto en edad pediátrica, como en adultos mayores y se asocia comúnmente con un mal pronóstico.

*Depleción linfocítica*: su incidencia es mucho menor, con muchos casos reclasificados como linfoma no Hodgkin. Se presenta principalmente en pacientes adultos mayores y aquellos con síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

*Predominancia linfocítica*: son un subtipo similar a predominancia linfocítica nodular; sin embargo, las células de Reed-Sternberg tienen un inmunofenotipo más clásico consistente con LH clásico.

### **III.1.2 Predominancia linfocítica nodular**

Es una entidad significativamente diferente al LH clásico. Patológicamente, carece de células Reed-Sternberg típicas, en su lugar se caracteriza por una población de células neoplásicas más grandes con núcleos lobulados y plegados, conocidas como células linfocíticas e histiocíticas. Se presenta con mayor frecuencia en hombres. Los pacientes generalmente muestran daño en ganglios que afecta la región del cuello y mediastino (Ansell, 2016).

### **III.2. Tratamiento para el Linfoma de Hodgkin**

Los avances en radioterapia y quimioterapia han aumentado significativamente la esperanza de vida de los pacientes. En la actualidad, más de un 80% de todos los pacientes recién diagnosticados menores de 60 años tienen expectativa de vida libre de cáncer. Al momento del diagnóstico, la mayoría presentan daño a nivel supradiafragmático. Suelen tener alteraciones en ganglios linfáticos axilar, cervical, mediastino anterior y supraclavicular. Aproximadamente un tercio de los pacientes presentan síntomas que incluyen fiebre, sudores nocturnos y pérdida de peso y muchos pacientes también muestran prurito crónico (Ansell, 2016).

Una evaluación precisa de la etapa de la enfermedad es crítica para la selección de una terapia apropiada. La estadificación se basa en si los ganglios linfáticos afectados están en uno o ambos lados del diafragma, el número de sitios implicados, si los sitios comprometidos son voluminosos, si existe afectación extraganglionar contigua o enfermedad extranodal diseminada y si los síntomas típicos están presentes.

### III.2.1 Estadificación de la enfermedad:

- I. Se ve afectada solo una región de nódulo linfático o estructura linfoide (bazo o timo, por ejemplo).
- II. Se muestran alterados dos o más nódulos linfáticos cercanos.
- III. Nódulos linfáticos o estructuras linfoides afectados a ambos lados del diafragma.  
III-1 caracterizado por efectos en bazo y nódulos portales.  
III-2 presenta trastornos en los nódulos para aórticos, iliacos y / o mesentéricos.
- IV. Implicación difusa o diseminada de uno o más órganos extralinfáticos con o sin afectación de los nódulos linfáticos asociados.

Las letras A y B, se usan para describir si son asintomáticos o sintomáticos, respectivamente.

Los pacientes en etapa temprana son tratados con estrategias de modalidad combinada que utilizan cursos cortos de quimioterapia combinada, seguida de radioterapia dirigida al área afectada, mientras que aquellos con enfermedad en estado avanzado reciben un curso más largo de la quimioterapia sin radioterapia (Ansell, 2016).

*Etapa temprana favorable de LH.* La estrategia de tratamiento en estadios iniciales (I-IIA) consiste en quimioterapia de corta duración para el control de las lesiones ocultas en combinación con radioterapia de campo afectado restringido sólo a las áreas de ganglios linfáticos comprometidos. Dos ciclos de esquema ABVD (adriamicina, bleomicina, vinblastina, dacarbazina), seguido de 20 Gy de radioterapia es actualmente el estándar para esta etapa.

*Etapa temprana desfavorable de LH.* En general se acepta que los pacientes con estadios I y II de la enfermedad que presentan factores de riesgo deben ser tratados con quimioterapia combinada con radioterapia. Sin embargo, el número óptimo de ciclos de quimioterapia, así como el régimen de quimioterapia óptima y la dosis de radiación, así como los tamaños de los campos, son objeto de estudio. Este grupo de pacientes por lo general consiste en aquellos con masas mediastínicas voluminosas o con enfermedad extranodal. En estos pacientes el

uso de cuatro ciclos de quimioterapia combinada con radioterapia se acepta generalmente como el tratamiento de elección.

*Enfermedad avanzada.* En los pacientes con enfermedad avanzada (etapas II- IVB) la quimioterapia ABVD es el tratamiento más utilizado en países como Estados Unidos de América (Engert *et al.*, 2010; Ansell, 2016).

### **III.2.2 Quimioterapia**

Actualmente hay una diversa gama de agentes químicos que se emplean para tratar al cáncer, siendo todos ellos citotóxicos sin tener un blanco celular específico. Se clasifican en:

*Agentes alquilantes,* pueden ser subdivididos en mostazas nitrogenadas, compuestos basados en platino y otros. Son mutágenos que introducen grupos alquilo al DNA siendo capaces de ocasionar daño genético, como son alteraciones estructurales y numéricas, así como mutaciones génicas. La segregación cromosómica defectuosa y la aneuploidía pueden ser causadas por la disfunción de los factores que regulan el ensamblaje y la dinámica del aparato mitótico, la cohesión de las cromátidas hermanas, la unión bipolar de cinetocoros al huso mitótico y el punto de control de ensamblaje del huso. La adecuada segregación cromosómica y el mantenimiento de la estabilidad del genoma dependen de la coordinación que exista en su duplicación, ciclo celular y progresión mitótica. Estudios recientes han demostrado que las estructuras del DNA sub-replicadas o no resueltas que se forman como consecuencia del estrés en la replicación causados por agentes antineoplásicos y que persisten en la mitosis pueden obstaculizar la segregación cromosómica que conduce a la micronucleación y a la ganancia o pérdida de material genético (Fragkos y Naim, 2017). Estos compuestos son muy efectivos para tratar el cáncer, pero son carcinogénicos.

*Antimetabolitos,* son análogos de bases nitrogenadas que se utilizan como componentes del DNA celular, por lo que es necesario un periodo de síntesis de DNA para que se incorporen, de tal manera que los tejidos en división continua son blanco para su actividad. Este cambio de bases ocasiona mutaciones puntuales y aberraciones cromosómicas.

*Inhibidores del huso mitótico,* son alcaloides obtenidos de vinca, interfieren en la formación y estabilidad del huso mitótico, el cual es primordial para la segregación normal de los

cromosomas durante la mitosis y meiosis. Se unen a la tubulina, principal componente de los microtúbulos causando inhibición en la polimerización de estas moléculas, y producen alteraciones cromosómicas numéricas como son aneuploidías y poliploidías.

*Inhibidores de la topoisomerasa II*, son compuestos que interfieren con la actividad de esta enzima, cuya función es cortar la molécula de DNA y girarla para relajar superenrollamientos, actividad que se requiere para que el DNA realice sus funciones tanto de transcripción como de replicación. La interferencia en la interacción DNA-topoisomerasa II inhibe la síntesis de DNA e introduce rupturas de una y dos hebras en la doble hélice. Algunos agentes de este grupo, también se intercalan en el DNA causando más daño.

*Antibióticos*, atacan a las células por diferentes mecanismos, por ejemplo, la bleomicina es un compuesto radiomimético, su actividad es similar a la radiación ionizante, no es dependiente de síntesis de DNA y produce rupturas cromosómicas por dos vías: una directa por interacción con el DNA y otra indirecta por generación de radicales libres (Arnon *et al.*, 2001; Frias, 2002).

Componentes de la quimioterapia esquema MOPP (Mostaza Nitrogenada, Oncovin, Procarbazona y Prednisona) y ABVD (Adriamicina, Bleomicina, Vinblastina y Dacarbazina).

Esquema MOPP (Mostaza Nitrogenada, Oncovin, Procarbazona y Prednisona).

*Mostaza Nitrogenada o Mecloretamina*. Pertenece al grupo de los agentes alquilantes bifuncionales, provoca daño al DNA e inhibe su síntesis. Este tipo de agente, produce mutaciones en estadios post-meióticos como espermatocitos y espermátidas. Fue el primer agente utilizado para el tratamiento anticáncer (Witt y Bishop, 1996).

*Oncovin o Sulfato de Vincristina*. Alcaloide derivado de vinca, evita el ensamblaje de la tubulina para la formación del huso mitótico e inhibe la incorporación de timidina en el DNA de espermatogonias, sin embargo, no existe evidencia sólida de que pueda ser mutagénico en las células germinales (Witt y Bishop, 1996).

*Procarbazina*. Agente alquilante que sufre auto-oxidación, dando como resultado la formación de radicales libres citotóxicos que dañan el DNA a través de una reacción de alquilación. Es uno de los únicos tres compuestos en los que se ha demostrado que inducen daño genotóxico en células madre germinales masculinas, así como en espermatozoides de ratón. La procarbazina puede inducir mutaciones letales dominantes y translocaciones heredables a la F1 en modelos murinos (Witt y Bishop, 1996).

*Prednisona*. Corticoesteroide sintético anti-inflamatorio, tiene acción sobre la formación y distribución linfocítica, desde la circulación sanguínea hasta el tejido linfoide. Antagoniza fisiológicamente los procesos estimulados por las hormonas que son necesarios para la proliferación celular (Lares-Assef, 2002).

Esquema ABVD (Adriamicina, Bleomicina, Vinblastina y Dacarbazina).

*Adriamicina (doxorubicina)*. Agente intercalante e inhibidor de la topoisomerasa II. Citotóxica para meiosis temprana y todas las etapas de espermatogonias (Witt y Bishop, 1996).

*Bleomicina*. Compuesto radiomimético, su actividad es similar a la radiación ionizante, no es dependiente de síntesis de DNA y produce rupturas cromosómicas por dos vías: una directa por interacción con el DNA y otra indirecta por generación de radicales libres; se ha descrito que causa genotoxicidad en células germinales femeninas, pero no en masculinas de ratón (Witt y Bishop, 1996).

*Vinblastina*. Alcaloide de vinca que se une a la proteína tubulina componente principal del huso mitótico, produciendo un estado estático al evitar su polimerización. En consecuencia, las células en división se detienen en etapa de metafase, es capaz de inducir aneuploidías identificadas como micronúcleos con centrómero en espermátidas de ratón (Witt y Bishop, 1996).

*Dacarbazina*, Comparte un mecanismo común de acción con otros agentes alquilantes, provoca formación de enlaces cruzados entre las moléculas de DNA (Seling *et al.*, 2012).

### **III.2.3 Radioterapia**

Antes de emplearse la quimioterapia (QT) para tratar al LH, se utilizó radioterapia (RT) para su tratamiento. A pesar de que tuvo buenos resultados, hubo efectos secundarios adversos, como son, segundos tumores malignos sólidos y enfermedades cardiovasculares, lo más probable es que fuese debido a las altas dosis de radiación en tejido normal. Hoy en día los avances tecnológicos han permitido un mejor diagnóstico por imagen en la identificación de blancos apropiados, lo que aumenta la precisión de la RT y disminución de radiación en tejido circundante normal. Actualmente, después de la QT, la RT se emplea en etapa temprana, es variable su uso en estado avanzado, o después de una respuesta no favorable. Con poca frecuencia, la RT se utiliza como modalidad única en casos muy cuidadosamente seleccionados de LH clásico, como lo es una recaída aislada después del tratamiento con QT sola. La delimitación correcta de los campos para RT depende de la anatomía de la región de interés y la distribución de los ganglios linfáticos, delimitación de áreas involucradas, así como las estructuras normales en riesgo de toxicidad (Terezakisa y Kasamon, 2012).

Esquemas más frecuentes de radioterapia.

En sus inicios se demostró que altas dosis en campos extensos ayudaban a curar a muchos pacientes, pero esto cambió y la RT ha ido modificándose, de ser una terapia sola a ser el componente de una terapia combinada, los principios clásicos de radioterapia de campos, dosis y la técnica en sí han cambiado. Principalmente la presencia de eventos posteriores perjudiciales, llevó a la disminución de su uso como único agente y el éxito de su combinación con QT condujo a programas menos dañinos para los pacientes. Esta mejora en la terapia consiste en usar técnicas de RT de campo afectado que mejoran la conformación y homogeneidad de la dosis. Estas reducciones de campo requieren de información adecuada para actuar con precisión. El empleo de metodologías como son la tomografía computarizada y la tomografía por emisión de positrones, ayudan en mucho en el diseño del tratamiento de campo. La adaptación de la radiación de campo a los ganglios linfáticos implicados se ha denominado terapia de radiación de ganglio implicado. Las regiones tratadas son más pequeñas en la terapia de ganglio implicado, en comparación con la clásica terapia de radiación de campo, donde se abarcaban extensas regiones anatómicas. Hoy en día la RT como componente de tratamiento combinado es muy diferente de cómo se usó en el pasado,

ya que se ha disminuido el volumen y la dosis. La combinación con QT ha logrado reducir la toxicidad. Y como resultado la caída en su administración ha descendido la tasa de mortalidad y los efectos secundarios adversos (Engert y Horning, 2011).

#### Sitios y dosis

Actualmente la RT de campo abarca un volumen menor pero adecuado cuando se usa después de la QT. En el caso de su empleo para LH de predominancia linfocítica nodular el campo debe limitarse a los sitios involucrados y nodos adyacentes, por lo que es importante diferenciar entre LH clásico y LH de predominancia linfocítica nodular, ya que el abordaje es distinto. En el caso de predominancia linfocítica nodular, la mayoría de los pacientes son atendidos con RT sola, en tanto que para LH clásico la modalidad de terapia combinada es la pauta. En una gran mayoría de los pacientes con predominancia linfocítica en estadios IA o IIA, la enfermedad está limitada a un sitio periférico (cuello, axilas o ingle). La dosis de radiación recomendada es de 30-36 Gy con un aumento adicional de 4 Gy en sitios muy voluminosos. Para el caso de LH clásico en estadio temprano I-II favorable y no favorable, ha cambiado mucho, y hoy en día la modalidad combinada que consiste de un curso corto de QT (más a menudo ABVD) seguido de dosis reducidas de RT cuidadosamente dirigida al nodo linfático es el estándar para el tratamiento. En el caso de estadio avanzado III-IV, la irradiación se añade a menudo en pacientes con enfermedad voluminosa o que permanecen en dudosa remisión después de la QT. Y para el caso de los pacientes que recaen, se emplean dosis altas junto con un trasplante autólogo de células madre (Engert y Horning, 2011; Yeoh y Mikhaeel, 2011; Specht *et al.*, 2014).

#### Tipos de Campos de irradiación usados en LH:

Campo implicado. Éste se limita a la región de ganglios linfáticos clínicamente involucrados.

Campo extendido. Incluye el grupo de ganglios linfáticos afectados más la región o regiones adyacentes clínicamente no alteradas.

Campo de ganglio(s) involucrado(s). Es el de radiación más limitado recientemente introducido. El volumen clínico tratado incluye sólo el o los ganglios linfáticos implicados

originalmente con la adición de 1 cm de margen para crear el volumen de tratamiento planificado.

Campos de irradiación linfoide subtotal y total. Incluye manto y campos paraórticos; si también se incluye la pelvis, el campo se llama irradiación linfoide total (Engert y Horning, 2011).

### **III.3. Antecedentes de daño genotóxico por la terapia anticáncer**

Se ha demostrado que los distintos tratamientos administrados para atender el cáncer incrementan el riesgo de neoplasias malignas secundarias. En el caso de LH éstas representan una importante causa de mortalidad y el riesgo ha sido observado tanto para RT como para QT (Ng y Shuryak, 2014).

En la década de los ochenta se demostró que en periodos de 5 a 10 años después de tratamiento con RT había un incremento del riesgo de presentarse un tumor sólido, principalmente cáncer de pulmón (Boivin *et al.* 1984; van Leeuwen *et al.* 1989; Engert y Horning, 2011).

Actualmente se reconoce que la aparición de segundos tumores no se debe únicamente al tratamiento si no que, puede ser provocado por distintas causas. Algunas de ellas podrían ser factores de susceptibilidad del individuo, como lo es la predisposición genética o la inmunodeficiencia (Engert y Horning, 2011).

Es importante mencionar el trabajo hecho por Brandriff y colaboradores sobre la evaluación de daño cromosómico en espermatozoides, mediante la técnica de fusión de espermatozoides humanos con óvulos de hámster, con lo que se logró obtener cromosomas que fueron analizados citogenéticamente. Se investigó sobre los efectos a nivel citogenético, de la radiación ionizante sobre linfocitos y espermatozoides humanos, encontrando una correlación positiva entre las aberraciones cromosómicas inducidas y la cantidad de radiación administrada (Brandriff *et al.*, 1994; Frias, 2002).

A finales de la década de los noventa Robbins y colaboradores realizaron un estudio en células germinales masculinas de ocho pacientes con LH que fueron tratados con QT NOVOP (Novantrone, Oncovin, Vinblastin y Prednisona). Evaluaron aneuploidías en esperma usando la técnica de FISH multicolor y encontraron un incremento de cinco veces de disomías y

diploidías y de genotipos complejos que involucraban a los cromosomas sexuales X, Y así como al cromosoma 8 (Robbins *et al.*, 1997).

En el Instituto Nacional de Pediatría en conjunto con otros Hospitales e Instituciones, se ha estudiado al LH por medio de distintos métodos, principalmente en células somáticas (linfocitos) y en células sexuales (espermatozoides). Frias y colaboradores en el 2003 por medio de un ensayo de hibridación *in situ* evaluaron simultáneamente los cromosomas 18, 21 y los sexuales X, Y. El tamaño de la muestra fue de cuatro individuos sanos y de ocho pacientes con LH antes del tratamiento, durante y después del tratamiento con NOVP para examinar el efecto genotóxico en los espermatozoides y también después de uno a dos años para medir la persistencia al daño. La disomía del 21 fue aproximadamente dos veces más frecuente que la disomía del 18, y ninguno mostró una segregación preferencial con un cromosoma sexual. Se encontró un incremento de los espermatozoides con aneuploidías durante el tratamiento; después de 3 meses los efectos inducidos no persistieron, lo que les permitió sugerir que las células madre germinales no fueron sensibles al tratamiento. Estos resultados los llevaron a la hipótesis de que la concepción poco después de ciertas quimioterapias puede aumentar transitoriamente el riesgo de engendrar embarazos con productos aneuploides que terminen durante el desarrollo o que den como resultado el nacimiento de niños con síndromes por aneuploidía (Frias *et al.*, 2003).

A nivel de células somáticas, Salas y colaboradores en el 2012, detectaron inestabilidad genómica en cromosomas de linfocitos de sangre periférica de pacientes con LH, de 2 a 17 años después de tratamiento MOPP, con o sin radioterapia. El tamaño de muestra fue de once individuos sanos, cinco pacientes pretratamiento y veinte postratamiento. Realizaron análisis citogenético con bandas GTG en 1000 metafases por donador para identificar a través de aberraciones numéricas y estructurales, inestabilidad genómica. En sus resultados encontraron que la QT MOPP no induce diferencias significativas en la frecuencia de aneuploidías entre los grupos de estudio. Sin embargo, el grupo de pacientes postratamiento presentaron una alta frecuencia de rupturas cromosómicas y reordenamientos cromosómicos complejos (Salas *et al.*, 2012), lo cual hizo evidente que esta QT afectó a las células madre hematopoyéticas.

#### **III.4. Daño a la cromatina, ensayo SCSA**

El ensayo utilizado en este estudio SCSA (por sus siglas en inglés: sperm chromatin structure assay) consiste en tratar el espermatozoide con pH ácido para desnaturalizar el DNA en los sitios de rotura de la cadena, seguido por una tinción de naranja de acridina que informa sobre la detección de daño al DNA y alteración en las proteínas en núcleos de los espermatozoides de las muestras colectadas, a través de citometría de flujo; es una técnica que inició Evenson y colaboradores en los años ochenta. Se considera un ensayo preciso y reproducible que proporciona datos en parámetro de fluorescencia roja y verde, de color verde para el DNA nativo y rojo para el DNA desnaturalizado, arrojando datos de la fragmentación del DNA y también del intercambio anormal de histonas a protaminas medido como el porcentaje de espermatozoides con alta capacidad de tinción de DNA, HDS (por sus siglas en inglés: High DNA stainability) que se relaciona con espermatozoides inmaduros. Las muestras pueden tratarse en crudo o pueden ser congeladas y ser procesadas posteriormente. Existe un software (SCSAsoft ®) para transformar los datos obtenidos de la tinción total del DNA frente a la fluorescencia roja / roja + verde, proporcionando una determinación más exacta del porcentaje para obtener un índice de fragmentación del DNA final, representado por el DFI (por sus siglas en inglés: DNA Fragmentation Index).

Hay un umbral clínico establecido de 25% de DFI por debajo del cual se considera normal y por encima se ubica a un varón en la probabilidad de tardar más tiempo para lograr con su pareja un embarazo natural, probabilidades bajas de embarazo asistido IUI (Inseminación intrauterina), abortos espontáneos o no embarazo. La técnica es considerada amigable en tiempo y costo-eficiencia, precisa y repetible para el análisis de fragmentación del DNA y con un umbral clínico aceptado para colocar a un hombre en riesgo de infertilidad (Evenson y Wixon, 2006; Evenson, 2013).

El SCSA es uno de los primeros ensayos que inició con la detección de daño en el DNA y alteración de las proteínas en núcleos de espermatozoides, por medio de citometría de flujo; surgió de la necesidad de saber más allá de lo que los parámetros utilizados en una espermatozoides convencional muestran. Los individuos que han estado en contacto con agentes genotóxicos físicos o químicos, por distintos factores como son enfermedad (cáncer-RT y QT), laborales (exposición a plomo), ambientales (bifenilos policlorados), accidente

(explosiones nucleares), condiciones adversas (guerras-radiación/agentes químicos) u otras; dependiendo de la edad en la que hayan tenido la exposición, a corto mediano o largo plazo y dependiendo del agente, podrían ser portadores de alteraciones en la cromatina, o mutaciones a nivel genético germinal que podrían causar daño en los procesos involucrados en concebir a un individuo o que éste sea portador de anomalías en su genoma. Dado la necesidad de conocer la calidad de las células germinales en varones es que se desarrolló este tipo de técnicas.

Varios estudios han evaluado la estructura de la cromatina espermática en pacientes con LH y otros tipos de cáncer principalmente el testicular. Evenson realizó un estudio pionero analizando muestras, principalmente de tumores testiculares y de algunos linfomas (no especifica cuáles) con el uso de esta tecnología, encontrando que el método ofrecía ventajas significativas para el análisis del nivel de maduración de las células y de la estructura de la cromatina. Estas ventajas incluían rapidez de análisis de un gran número de células, proporcionando fuerza estadística y cuantificación precisa de cantidades y/o estructura del DNA, lo cual no era posible mediante microscopía óptica (Evenson y Melamed, 1983).

Kobayashi *et al.* (2001), examinaron la relación entre defectos de cromatina evaluados por el ensayo SCSA y características seminales en muestras de semen criopreservadas de pacientes diagnosticados con varios tipos de cáncer entre ellos LH los cuales representaban 11 de los 37 pacientes de la población total del estudio. Encontraron que las muestras de semen de los pacientes tuvieron un daño al DNA significativamente más elevado en comparación con un grupo testigo y no encontraron ninguna correlación entre daño al DNA y parámetros clásicos de la espermatobioscopía. Detectaron daño al DNA en la mayoría de los pacientes con cáncer, puntualizando que el ensayo SCSA proporciona información importante acerca de la integridad bioquímica del DNA espermático en hombres con cáncer, aún antes del tratamiento.

Por su parte, O'Flaherty y colaboradores hicieron una evaluación de la calidad de la cromatina de espermatozoides en pacientes con cáncer testicular y LH antes de la quimioterapia y la compararon con la calidad de cromatina de individuos sanos y con infertilidad. Evaluaron el daño en el DNA con los ensayos SCSA, TUNEL (por sus siglas en inglés: Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling) y ensayo cometa; encontraron que tanto pacientes con cáncer testicular como con LH presentaron muestras de espermatozoides

con un incremento en daño al DNA, en comparación con los testigos. Los pacientes con cáncer también mostraron una baja compactación del DNA, por lo que concluyeron que la integridad y la compactación del DNA espermático están afectados en pacientes con cáncer testicular y LH antes de la QT. Sugirieron que una combinación de ensayos que evalúen daño al DNA y su compactación, es una estrategia confiable para caracterizar la calidad de la cromatina del espermatozoide en pacientes con cáncer (O'Flaherty *et al.*, 2008).

Paoli y colaboradores investigaron el daño al DNA espermático inducido por RT y QT en más de 100 pacientes con cáncer testicular, evaluaron la integridad del DNA antes y 3, 6, 9, 12 y 24 meses después del tratamiento con la técnica de SCSA. La QT administrada fue BEP (bleomicina, etopósido y cisplatino) y la RT aplicada fue a los ganglios linfáticos lumbar-aórticos. Después de la QT, encontraron un marcado aumento en el DFI a 3 y 6 meses y una reducción significativa a 12 y 24 meses, lo cual indicó una mejora en la cromatina. En contraste, después de la radioterapia el DFI aumentó a 3 y 6 meses y la reducción a 12 y 24 meses fue mucho menos marcada, sus resultados sugieren que la radioterapia induce mayor daño, aunque evidentemente los diferentes tratamientos contra el cáncer causan distintos tipos de daño nuclear, por lo que el perfil de cromatina proporciona sólo una imagen incompleta de tal daño, especialmente porque estos tratamientos pueden causar cambios a largo plazo en el perfil de expresión génica y el patrón de metilación, con un posible impacto en el desarrollo embrionario (Paoli *et al.*, 2014).

En todos los casos anteriores, los pacientes estuvieron expuestos a condiciones que previamente se ha reportado que pueden inducir daño al DNA, ya sea por la enfermedad *per se* o bien por los tratamientos anticáncer, sin embargo también se ha encontrado que la SCSA puede detectar daño en la cromatina cuando existen alteraciones cromosómicas en las células, al respecto Vozdova y colaboradores analizaron en 13 portadores de translocaciones robertsonianas y 37 portadores con translocaciones recíprocas y compararon sus resultados con un grupo testigo, las relaciones entre parámetros seminales, integridad de la cromatina y las frecuencias de desbalances cromosómicos en espermatozoides, como disomías y diploidías. Realizaron análisis convencional de semen, ensayo SCSA y FISH para los cromosomas individuales X, Y, 7, 8, 13, 18 y 21. En sus resultados encontraron parámetros normales de semen en el 30.8% de los portadores de translocaciones Robertsonianas y en el 59.5% de los portadores de translocaciones recíprocas. Determinaron un aumento

significativo en las frecuencias de espermatozoides que muestran defectos en integridad y condensación de cromatina, detectaron aneuploidía para los cromosomas no implicados en una translocación y diploidía en los portadores de translocación con parámetros anormales de semen. Los portadores con translocación recíproca y normospermicos mostraron un aumento en disomía del cromosoma 13 comparado con el grupo testigo. No notaron relación entre aneuploidías encontradas en espermatozoides y linfocitos de 12 portadores de translocación. La frecuencia de movilidad espermática no tuvo correlación con la frecuencia de espermatozoides que presentaron disomía, diploidía y mala condensación de cromatina. Concluyen mencionando que los parámetros anormales del semen pueden servir como indicadores de un riesgo adicional de formación de espermatozoides con cromatina defectuosa y aneuploidía en los portadores de translocaciones (Vozdova *et al.*, 2013).

Por los antecedentes mencionados, es muy probable que los pacientes con LH que han sido tratados con RT y QT puedan tener consecuencias de genotoxicidad en sus células germinales, que sea posible detectar mediante la metodología de SCSA. En este estudio, se analizaron los espermatozoides de 4 pacientes antes del tratamiento y 23 pacientes después de QT ABVD y 21 después de QT MOPP, se les determinó el DFI y en algunos casos seleccionados de muestras que resultaron positivas y negativas, se realizó FISH con la metodología AM8. El ensayo AM8 es un FISH (por sus siglas en inglés: Fluorescence *In Situ* Hybridization) que consiste en una hibridación *in situ* con fluorescencia en espermatozoides en la que se emplean las sondas de DNA para el centrómero del cromosoma 1 en color Rojo con abreviatura A (alfa satélite), una segunda sonda en el cromosoma 1, para el telómero 1p en color verde con abreviatura M (Midi 1p) y la sonda para el centrómero del 8 en color azul (Aqua 8). Esta metodología nos permite detectar daño estructural, y se realizó con la finalidad de determinar si los datos de la integridad de la cromatina se correlacionan con la frecuencia de aneuploidía y/o con alteraciones cromosómicas estructurales tipo delección y duplicación segmental.

## **IV. METODOLOGÍA**

### **IV.1. Población de estudio**

El tamaño de muestra de este proyecto se definió a conveniencia.

- I. Grupo de 19 individuos sanos.
- II. Grupo de 4 pacientes con LH antes de recibir tratamiento.
- III. Grupo de 23 pacientes con LH tratados con quimioterapia que incluya ABVD.
- IV. Grupo de 21 pacientes con LH tratados con quimioterapia que incluya MOPP.

Se estudió una población de individuos sanos y una población de pacientes diagnosticados con LH, de por lo menos 18 años o mayores (por razones éticas, ya que la obtención del semen fue por masturbación) y que aceptaron participar voluntariamente en el estudio.

El grupo de individuos con LH fueron canalizados de la Clínica de sobrevivientes a LH de la Subdirección de Hemato-Oncología del Instituto Nacional de Pediatría y de la Clínica de Linfoma de Hodgkin del Hospital General de México.

#### **Criterios de Inclusión:**

##### *Individuos sanos*

- I. De 18 años o mayores.
- II. Que aceptaron participar voluntariamente y firmaron carta de consentimiento informado (Anexo 1).
- III. Que contestaron adecuadamente los cuestionarios de tamizaje y general (Anexo 2).

##### *Pacientes con LH con y sin tratamiento ABVD o tratamiento que incluya MOPP*

- I. De 18 años o mayores.
- II. Que aceptaron participar voluntariamente y firmaron carta de consentimiento informado (Anexo 1).
- III. Se incluyeron los pacientes que se diagnosticaron con LH de acuerdo con los criterios médicos y de laboratorio pertinentes y se les solicitó donación de semen antes de recibir la quimioterapia para integrar el Grupo II (antes del tratamiento).
- IV. Se incluyeron a todos los pacientes con LH que tenían al menos un año de haber recibido el tratamiento ABVD o tratamiento que incluía MOPP.
- V. Que contestaron adecuadamente los cuestionarios de tamizaje y general (Anexo 2).

## Criterios de Exclusión

- I. Pacientes que recibieron otro tipo de tratamiento antineoplásico no considerado en el presente estudio.
- II. Pacientes que por la evolución de la enfermedad no pudieron donar muestra.
- III. Pacientes que desarrollaron algún cáncer secundario.
- IV. Pacientes que tuvieron algún parámetro indicativo de exclusión de acuerdo al cuestionario de tamizaje.

A cada individuo que ingresó al estudio se le aplicaron dos cuestionarios, uno de tamizaje, que determinó que pacientes se excluyeron y un cuestionario general (ver anexo de cuestionarios). A todos los donadores, tanto sanos como pacientes, se les solicitó firmaran la carta consentimiento informado antes de ser incluidos en el estudio.

## IV.2. Técnicas

### IV.2.1. Espermatobioscopia directa

A todos los individuos que ingresaron al estudio se les solicitó muestra de semen para realizar espermatobioscopia directa. Los parámetros fisicoquímicos que se evaluaron son: volumen, licuefacción, viscosidad y pH; también se determinó la viabilidad celular (eosina amarillenta), densidad celular, progresión y morfología celular. Se utilizaron los valores de la OMS (Organización Mundial de Salud) como referencia (Tabla 1).

Tabla 1. Valores de corte para variables de semen publicados en la quinta edición del Manual de la Organización Mundial de Salud.

| Variable                                     | OMS 2010*                                  |
|--|--|
| Volumen                                      | ≥ 1.5 mL                                   |
| Concentración de espermas                    | ≥ 15 millones de espermatozoides/mL        |
| Número total de espermas                     | ≥ 39 millones de espermatozoides/eyaculado |
| Movilidad progresiva                         | ≥ 32 %                                     |
| Movilidad total (progresiva y no progresiva) | ≥ 40 %                                     |
| Morfología                                   | ≥ 4.0 % formas normales                    |
| Viabilidad/ Vitalidad                        | ≥ 58% vivos                                |

\*Organización Mundial de Salud 2010.

### **Densidad celular**

La cuenta celular se realizó por duplicado en una mezcla 1:9 (semen: H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) en una cámara de Neubauer. Con el promedio de ambas se calculó la densidad espermática. Cuando el análisis de densidad celular indicó que no había espermatozoides, las muestras se centrifugaron a 600 -1000 rpm durante 30 minutos y el paquete celular se revisó al microscopio para confirmar la azoospermia.

### **Viabilidad celular**

Se utilizó la técnica de tinción con eosina amarillenta (método de exclusión); una alícuota de semen se mezcló vol/vol con eosina al 0.5% y se analizaron 100 células al microscopio para determinar el porcentaje de viabilidad. Las células teñidas son las muertas.

### **Progresión**

Para su evaluación sólo se consideró a los espermatozoides libres y no a los aglutinados. Se registraron 4 tipos de progresión espermática:

- A)** Movimiento progresivo rápido. Aquellos que se desplazan de forma rectilínea y rápida.
- B)** Movimiento progresivo lento. Los que se desplazan más lentamente de forma recta o en curvas.
- C)** Movimiento no progresivo (en su lugar). Se mueven, pero no cambian de posición.
- D)** Inmóviles. Sin ningún tipo de movimiento.

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

### **Morfología espermática**

Una alícuota de semen se fijó con formaldehído al 10% (vol/vol), se analizó con el objetivo 40X en microscopio con contraste de fases y se determinó las alteraciones morfológicas de los espermatozoides, de acuerdo a los criterios de la OMS.

#### **IV.2.2 Evaluación de la estructura de la cromatina espermática por citometría de flujo (ensayo-SCSA)**

La técnica de SCSA tiene como objetivo evaluar la susceptibilidad de la cromatina espermática a la desnaturalización *in situ*. Basada en la técnica descrita por Evenson y Melamed (1983), ésta consiste en someter a los espermatozoides a un tratamiento ácido capaz de inducir la desnaturalización del DNA, para posteriormente incubar la muestra con un fluorocromo (naranja de acridina) que puede intercalarse entre las bases de DNA de doble cadena y emitir una fluorescencia verde (que representa el DNA íntegro) o asociarse entre las bases de la cadena sencilla de DNA, emitiendo una fluorescencia roja (que representa el DNA desnaturalizado). Los resultados se expresan como la media de DFI (DNA Fragmentation Index) que representa el grado de condensación de la cromatina y como el porcentaje de DFI (DFI%) que muestra la proporción de células que, de acuerdo con sus valores de fluorescencia, se encuentran fuera de la condición normal y que por lo tanto tienen DNA desnaturalizado (Evenson, 2013).

Los porcentajes de los índices de fragmentación de DNA y de la alta colorabilidad del DNA se valorarán bajo los siguientes criterios:

Índice de Fragmentación del DNA (% DFI= % de daño en el DNA medible en espermatozoides).

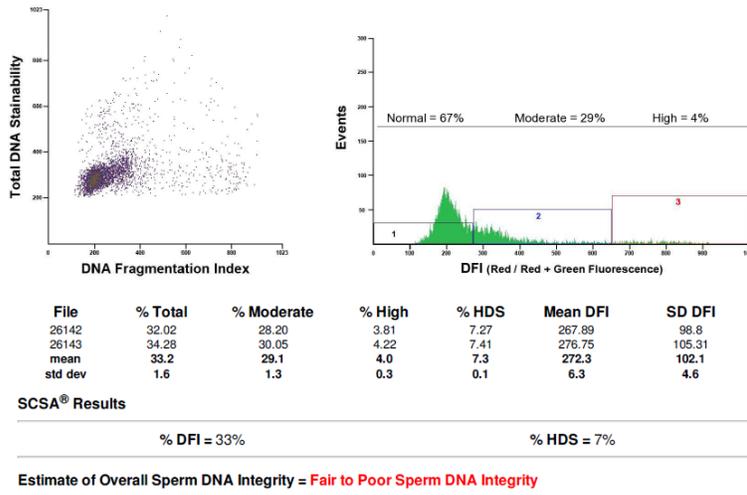
- a.  $\leq 15\%$  DFI = De excelente a buena la calidad del DNA espermático.
- b.  $> 15\%$  a  $< 25\%$  DFI = De buena a regular integridad del DNA espermático.
- c.  $\geq 25\%$  a  $< 50\%$  DFI = De regular a mala integridad del DNA espermático.
- d.  $\geq 50\%$  DFI = Muy mala integridad del DNA espermático.

El ensayo SCSA también proporciona el dato en porcentaje, de la alta colorabilidad del DNA, % HDS (High DNA Stainability, por sus siglas en ingles).

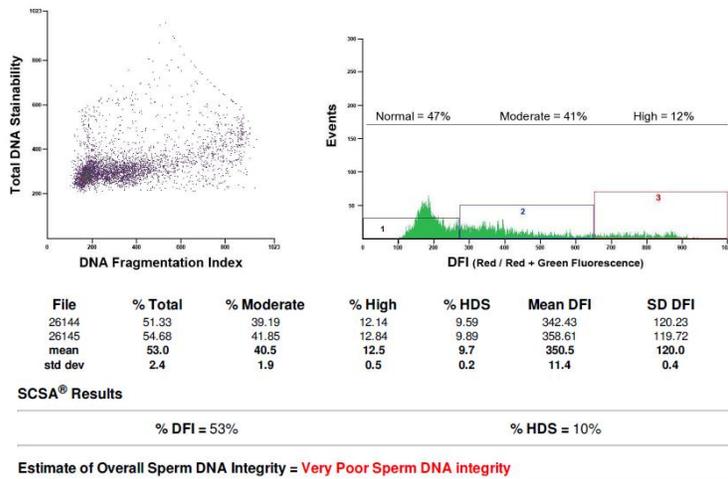
Los porcentajes de espermatozoides con cromatina inmadura y proteínas anormales en el rango  $>25\%$  se consideran de mala calidad.



c) De regular a mala integridad del DNA espermático.  $\geq 25\%$  a  $< 50\%$  DFI



d) Muy mala integridad del DNA espermático.  $\geq 50\%$  DFI



### IV.2.3 Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) en espermatozoides

#### a) Preparación de frotis con las muestras de espermatozoides

De algunas de las muestras que resultaron positivas y negativas para el DFI, se realizaron frotis con 5 a 7  $\mu$ L, los cuales se dejaron secar durante toda la noche a temperatura ambiente. Cuando no se procesaron durante las 24 horas siguientes se almacenaron dentro de una caja cerrada con desecadores en congelación (Wyrobek *et al.*, 1990; Van Hummelen *et al.*, 1996).

#### b) Descondensación de núcleos espermáticos

Los frotis se trataron con ditioneitol (DTT, 10 mM) en hielo, durante 30 minutos para eliminar protaminas y descondensar el DNA de los espermatozoides. Posteriormente, se pasaron a una solución de ácido 3,5 diyodosalicílico (LIS, 4 mM) a temperatura ambiente (TA) durante 90 min. Finalmente se dejaron secar a TA durante 45 min. Se revisó el material del frotis al microscopio con contraste de fases y se delimitó el área donde se colocó la sonda.

#### c) Desnaturalización del DNA

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

#### d) Hibridación

Las sondas se desnaturalizaron a 78 °C durante 6 min y se colocaron en el área delimitada del frotis, se colocó un cubreobjetos limpio (22x22 mm) y se aplicó sellador alrededor del mismo. Las preparaciones se colocaron en la oscuridad, en una cámara húmeda previamente calentada a 37 °C, donde se incubaron durante 12 a 36 horas.

Las sondas de DNA que se utilizaron estaban marcadas directamente con fluorocromos (Vysis/Kreatech-Poseidon) y fueron las siguientes:

#### Ensayo AM8 multicolor para células interfásicas.

| Sonda de DNA     | Color | Abreviatura       |
|------------------|-------|-------------------|
| Telómero 1p      | Verde | M (Midi 1p)       |
| Centrómero del 1 | Rojo  | A (alfa satélite) |
| Centrómero del 8 | Aqua  | 8 (cromosoma 8)   |

#### *e) Lavado y contratinción*

Las laminillas se sacaron de la cámara húmeda, se les retiró el sellador y se colocaron en una solución 2XSSC a TA para que el cubreobjetos se deslizara y no se maltratara el material biológico. Se colocaron en formamida al 50% /2XSSC previamente calentada a 45 °C durante 10 min, después se transfirieron a 2XSSC a 37 °C por 10 min y por último a otra solución 2XSSC a TA por otros 10 min. Cada laminilla se contratiñó con 10 µL de DAPI (4', 6-diamino-2-fenilindol 0.01µg/mL) diluido en medio de montaje para fluorescencia Vectashield.

#### *f) Análisis y criterios de lectura*

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

Se utilizó un microscopio de fluorescencia con los siguientes filtros: DAPI, fluoresceína, rodamina/rojo Texas, aqua. Doble banda: FITC/rojo Texas. Triple banda: DAPI / FITC / rojo Texas.

Los criterios en el conteo de las señales fueron estrictos: dos dominios fluorescentes del mismo color (por ejemplo, para M-M o 8-8) debían estar separados por una distancia de más de la mitad del diámetro de un dominio fluorescente dentro de la célula para poder ser registradas como dos señales. De encontrar señales anormales fue importante asegurarse de que la célula evaluada fuera un espermatozoide; esto se llevó a cabo con el uso de contraste de fases en 100X en donde se buscó intencionadamente la presencia del punto de inserción del flagelo y el flagelo mismo, además se revisó que no hubiera otras células superpuestas, así como la morfología nuclear del espermatozoide.

Se contaron y analizaron entre 1594 y 12096 células por individuo para las distintas muestras y todo se llevó a cabo en dos pasos: una vez codificadas las preparaciones se contaron y analizaron hasta tener una cuenta total (fue variable dependiendo de la muestra) y después las preparaciones fueron recodificadas y se hizo un segundo análisis y conteo (Wyrobek *et al.*, 1990; Robbins *et al.*, 1995; Van Hummelen *et al.*, 1996). Si ambos análisis tuvieron diferencia en las frecuencias obtenidas de más de un 10% entre sí, se realizó un tercer análisis. El uso de la metodología AM8 a pesar de que cubre una porción pequeña de todo el genoma nos permite detectar simultáneamente anomalías cromosómicas numéricas, así como las estructurales de tipo duplicación y delección parcial del cromosoma 1, en espermatozoides.

## **V. RESULTADOS**

### **V.1. Población estudiada**

Se obtuvieron 19 muestras de individuos normales los cuales respondieron al cuestionario principal y de tamizaje y cumplieron los criterios de inclusión y exclusión establecidos previamente. En cuanto a los pacientes con LH, se consideraron 4 muestras antes del tratamiento, 23 muestras de pacientes que fueron tratados con quimioterapia ABVD y 21 tratados con quimioterapia MOPP/ABVD. Cabe destacar que todos los individuos involucrados en el presente estudio y que recibieron RT fueron protegidos en la zona gonadal con placas de plomo.

### **V.2. Espermatobioscopía**

Se realizaron espermatobioscopías a las muestras de semen de todos los individuos estudiados los cuales fueron registrados con un código, cada uno de los parámetros fue documentado y archivado en bases de datos y bitácoras, se analizaron tomando en cuenta los parámetros de la OMS 2010 y se obtuvieron los siguientes datos que se muestran en su totalidad para los grupos de estudio:

En las siguientes tablas (1, 2, 3 y 4) se muestran los datos de los parámetros de semen obtenidos por espermatobioscopía de los cuatro grupos (Grupo I n=19, Grupo II n=4, Grupo III n=23 y Grupo IV n=21), así como los resultados del ensayo SCSA (DFI y HDS). Con un promedio de edad en años y una desviación estándar (DE) para cada grupo de: Grupo I = 27.3 años  $\pm$  6.1, Grupo II= 24.5  $\pm$  8.43, Grupo III= 29.17  $\pm$  8.73 y para el Grupo IV= 21.3  $\pm$  4.22.

El volumen obtenido de las muestras está dado en mililitros (mL), la densidad y eyaculado total de espermatozoides está dado en millones ( $\times 10^6$ ), la viabilidad es el porcentaje de espermatozoides vivos, la movilidad es la suma de los porcentajes de espermatozoides con movimiento progresivo rápido más el movimiento progresivo lento y la morfología corresponde al porcentaje de espermatozoides normales. En cuanto a los resultados de ensayo SCSA se presentan en porcentaje tanto para DFI como para el HDS. Se resalta en color naranja las muestras consideradas como anormales para los distintos parámetros analizados. También se presentan promedio, desviación estándar y rango de cada uno de los parámetros

obtenidos de las espermatobioscopías y del ensayo SCSA de los grupos de estudio. En la última fila de las tablas, a modo de comparación, se presentan los parámetros aceptados por la Organización Mundial de Salud (2010).

**Tabla1.** Datos de los parámetros de espermatobioscopía y ensayo SCSA, correspondientes al Grupo I.

| Grupo I. Testigo n=19 | Volumen mL        | Densidad x 10 <sup>6</sup>   | Esperma x eyaculado x 10 <sup>6</sup> | Viabilidad %         | Movilidad %          | Morfología % Normales | pH                | DFI %               | HDS %               |
|-----------------------|-------------------|------------------------------|---------------------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-------------------|---------------------|---------------------|
| NL18                  | 1.6               | 137.5                        | 220                                   | 70                   | 60                   | 52                    | 8                 | 17                  | 13                  |
| NL25                  | 1.5               | 260                          | 390                                   | 86.5                 | 17.5                 | 38                    | 8.5               | 13                  | 12                  |
| NL26                  | 4                 | 134                          | 538                                   | 89                   | 58                   | 45                    | 8                 | 11                  | 12                  |
| NL27                  | 2.7               | 241.75                       | 652.72                                | 79                   | 18                   | 44                    | 8                 | 19                  | 21                  |
| NL29                  | 1.5               | 485                          | 727.5                                 | 92                   | 83.5                 | 67                    | 8                 | 7                   | 12                  |
| NL33                  | 4                 | 187                          | 748                                   | 74                   | 74                   | 66                    | 8                 | 18                  | 13                  |
| NL36                  | 2.8               | 120.75                       | 338.1                                 | 70                   | 68                   | 90                    | 8.5               | 25                  | 6                   |
| NL37                  | 3                 | 22.2                         | 66.6                                  | 60                   | 20.5                 | 68                    | 8                 | 10                  | 22                  |
| NL38                  | 4                 | 178                          | 712                                   | 83                   | 57                   | 76.81                 | 8.5               | 12                  | 12                  |
| NL39                  | 2.5               | 9.2                          | 23                                    | 75                   | 22                   | 63                    | 8                 | 11                  | 10                  |
| NL40                  | 1.6               | 84.25                        | 134.8                                 | 77                   | 50                   | 64                    | 8.5               | 14                  | 8                   |
| NL41                  | 1.1               | 78.37                        | 86.21                                 | 79                   | 63                   | 43                    | 8.5               | 10                  | 17                  |
| NL42                  | 2.1               | 97.16                        | 204.03                                | 89                   | 68                   | 68                    | 8.5               | 7                   | 12                  |
| NL43                  | 2.8               | 25.5                         | 71.4                                  | 81                   | 35                   | 45                    | 9                 | 12                  | 11                  |
| NL44                  | 2.3               | 64.62                        | 148.64                                | 76                   | 52                   | 66                    | 8.5               | 12                  | 13                  |
| NL45                  | 3.3               | 49                           | 161                                   | 82.5                 | 64                   | 57                    | 8.5               | 7                   | 21                  |
| NL47                  | 1.8               | 111                          | 199.8                                 | 73                   | 73                   | 86                    | 8.5               | 10                  | 9                   |
| NL48                  | 3.6               | 262.16                       | 943.8                                 | 80                   | 73.9                 | 92                    | 8                 | 10                  | 8                   |
| NL49                  | 2.8               | 170.25                       | 467.7                                 | 60                   | 95                   | 86                    | 8                 | 7                   | 7                   |
| <b>Media ± (DE)</b>   | <b>2.5 (1.58)</b> | <b>143.04 (113.32)</b>       | <b>359.65 (283.15)</b>                | <b>76.88 (25.67)</b> | <b>57.13 (29.76)</b> | <b>63.33 (21.99)</b>  | <b>8.1 (4.16)</b> | <b>12.21 (4.72)</b> | <b>12.58 (4.66)</b> |
| <b>Rango</b>          | <b>(1.1-4)</b>    | <b>(9.2-485)</b>             | <b>(23-943.8)</b>                     | <b>(60-92)</b>       | <b>(17.5-95)</b>     | <b>(38-92)</b>        | <b>(8-9)</b>      | <b>(7-25)</b>       | <b>(6-22)</b>       |
| <b>OMS 2010</b>       | <b>≥ 1.5 ml</b>   | <b>≥ 15 x 10<sup>6</sup></b> | <b>≥ 39 x 10<sup>6</sup></b>          | <b>≥ 58%</b>         | <b>≥ 40%</b>         | <b>≥ 4%</b>           |                   |                     |                     |

En los individuos del grupo I (testigo), todos los valores promedio de las espermatobioscopías están dentro de los límites normales, de acuerdo a la OMS 2010. Analizando los valores individuales con respecto a los sugeridos por la OMS, la muestra NL41 está por debajo del valor sugerido para volumen 1.1 versus 1.5 mL, con respecto al parámetro de movilidad las muestras NL25, NL27, NL37, NL39 y NL43 presentaron un valor bajo a lo sugerido 17.5, 18, 20.5, 22 y 35 respectivamente versus 40%. La muestra NL39 es la que presentó valores bajos

para distintos parámetros, para densidad 9.2 versus  $\geq 15 \times 10^6$ , para cuenta total por eyaculado 23 versus  $\geq 39 \times 10^6$  y para movilidad 22 versus  $\geq 40 \times 10^6$ . Con respecto a los valores de DFI cabe destacar que una de las muestras la NL36 evidenció un DFI= 25% encontrándose este valor en el umbral de lo sugerido como buena a regular integridad del DNA espermático. Todos los valores para HDS (cromatina inmadura y proteínas anormales) estuvieron por debajo del valor considerado como negativo > 25%.

**Tabla 2.** Datos de los parámetros de espermatobioscopía y ensayo SCSA, correspondientes al Grupo II.

| Grupo II.<br>Antes de<br>Tratamiento<br>n=4 | Volumen<br>mL  | Densidad<br>$\times 10^6$ | Esperma x<br>eyaculado<br>$\times 10^6$ | Viabilidad %    | Movilidad %      | Morfología<br>% normales | pH             | DFI %           | HDS %       |
|---|----------------|---------------------------|---|-----------------|------------------|--------------------------|----------------|-----------------|-------------|
| 131-I                                       | 3.4            | 23.8                      | 80.92                                   | 42              | 5                | 54                       | 8              | 36              | 6           |
| 135-I                                       | 1.1            | 16.9                      | 18.59                                   | 74              | 74               | 66                       | 8.5            | 4               | 11          |
| 160-I                                       | 0.9            | 116.75                    | 105.08                                  | 75              | 20               | 74                       | 8.5            | 8               | 12          |
| 164-I                                       | 1.65           | 57.875                    | 95.49                                   | 67              | 76               | 78.5                     | 8.5            | 30              | 7           |
| Media<br>$\pm$ (DE)                         | 1.90<br>(1.44) | 53.83<br>(45.61)          | 93.83<br>(47.95)                        | 64.5<br>(15.42) | 43.75<br>(36.61) | 68.13<br>(10.74)         | 8.38<br>(0.25) | 19.5<br>(15.86) | 9<br>(2.94) |
| Rango                                       | (0.9-3.4)      | (16.9-<br>116.75)         | (80.92-105.08)                          | (42-75)         | (5-76)           | (54-78.5)                | (8-8.5)        | (4-36)          | (6-12)      |
| OMS 2010                                    | $\geq 1.5$     | $\geq 15 \times 10^6$     | $\geq 39 \times 10^6$                   | $\geq 58\%$     | $\geq 40\%$      | $\geq 4\%$               |                |                 |             |

Los datos promedio para los parámetros obtenidos de espermatobioscopía, correspondientes al Grupo II se encuentran dentro de lo sugerido como normal por la OMS 2010. En el análisis por individuo para el grupo II, los casos 135-I y 160-I tuvieron valores bajos para el parámetro de volumen 1.1 y 0.9 respectivamente versus 1.5 mL; para el parámetro de cuenta total la muestra 135-I tuvo un valor por debajo del sugerido 18.59 versus  $39 \times 10^6$ ; para el parámetro de viabilidad el paciente 131-I presentó valor por debajo 42 versus  $\geq 58\%$ ; para el parámetro de movilidad los pacientes 131-I y 160-I encontraron valores bajos 5 y 20 respectivamente versus  $\geq 40 \times 10^6$ . En relación al DFI, dos de los pacientes, el 131-I y el 164-I, mostraron un DFI alterado 36 y 30%, respectivamente, lo que representó el 50% de la población total de este grupo. Cabe resaltar que el paciente 131-I, el cual reveló el valor más alto para el DFI tuvo valores bajos en los parámetros de viabilidad y movilidad. Todos los datos para HDS (cromatina inmadura y proteínas anormales) estuvieron por debajo del valor considerado como negativo > 25%.

**Tabla 3.** Datos de los parámetros de espermotobioscopía y ensayo SCSA, correspondientes al Grupo III. En el caso de la celda que se encuentra vacía no hubo dato.

| Grupo III.<br>ABVD<br>n=23 | Volumen<br>mL         | Densidad<br>x 10 <sup>6</sup> | Esperma x<br>eyaculado<br>x10 <sup>6</sup> | Viabilidad %             | Movilidad %              | Morfología<br>% Normales | pH                     | DFI %                    | HDS %                   |
|----------------------------|-----------------------|-------------------------------|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|--------------------------|-------------------------|
| ABVD-49-III                | 2                     | 216                           | 432  | 73                       | 55                       | 52                       | 8.5                    | 22                       | 7                       |
| ABVD-51-III                | 3.5                   | 178.25                        | 624  | 80.5                     | 54                       | 77                       | 8.5                    | 6                        | 13                      |
| ABVD-53-III                | 3.9                   | 98.8                          | 385  | 80                       | 28                       | 71                       | 8.5                    | 19                       | 8                       |
| ABVD-54-III                | 0.8                   | 82.3                          | 69.5                                       | 76                       | 28                       | 60                       | 8.5                    | 42                       | 12                      |
| ABVD-56-III                | 3.8                   | 26.2                          | 99.56                                      | 87                       | 58                       | 71                       | 8                      | 18                       | 7                       |
| AVBD-62-III                | 1.1                   | 179                           | 197  | 82                       | 55                       | 74                       | 8                      | 4                        | 16                      |
| ABVD-67-III                | 3.8                   | 123.3                         | 468.35                                     | 85.5                     | 24                       | 49.5                     | 8                      | 11                       | 12                      |
| ABVD-77-III                | 1.5                   | 25                            | 37.5                                       | 61                       | 51                       | 47.5                     | 9                      | 12                       | 11                      |
| ABVD-88-III                | 2                     | 18.5                          | 37   | 93                       | 65                       | 42                       | 8.5                    | 14                       | 8                       |
| ABVD-90-III                | 1.2                   | 250.5                         | 300.6                                      | 80.5                     | 79                       | 76                       | 8.5                    | 29                       | 3                       |
| ABVD-91-III                | 4.4                   | 70.37                         | 309.62                                     |                          | 56                       | 62                       | 8                      | 26                       | 8                       |
| ABVD-95-III                | 1.7                   | 147.5                         | 250.75                                     | 84                       | 60.7                     | 73                       | 8                      | 33                       | 7                       |
| ABVD-98-III                | 0.8                   | 78.7                          | 62.96                                      | 53                       | 48                       | 41                       | 8.5                    | 22                       | 10                      |
| ABVD-110-III               | 1.6                   | 7.6                           | 12.16                                      | 74.5                     | 46.5                     | 68                       | 9                      | 5                        | 13                      |
| ABVD-112-III               | 2.5                   | 107                           | 267.5                                      | 82                       | 51                       | 72                       | 8                      | 14                       | 5                       |
| ABVD-120-III               | 0.7                   | 125.5                         | 87.5                                       | 68                       | 4                        | 60                       | 8                      | 22                       | 12                      |
| ABVD-126-III               | 1.2                   | 35.5                          | 40.2                                       | 70                       | 8.5                      | 55                       | 8.5                    | 6                        | 17                      |
| ABVD-127-III               | 1.5                   | 96.75                         | 145  | 69                       | 68                       | 67                       | 8.5                    | 12                       | 7                       |
| ABVD-128-III               | 1.4                   | 81.5                          | 114.1                                      | 81                       | 62                       | 64                       | 8.5                    | 14                       | 11                      |
| ABVD-148-III               | 2.4                   | 47                            | 113.1                                      | 74                       | 39.5                     | 71                       | 8.5                    | 4                        | 23                      |
| ABVD-176-III               | 2.7                   | 27                            | 72.9                                       | 60.5                     | 65                       | 11.5                     | 8                      | 6                        | 16                      |
| ABVD-178-III               | 1.5                   | 28.12                         | 42.18                                      | 74.75                    | 66                       | 8.5                      | 8                      | 9                        | 16                      |
| ABVD-183-III               | 7.7                   | 64.25                         | 495  | 61                       | 64.44                    | 9.25                     | 8                      | 33                       | 16                      |
| <b>Media<br/>± (DE)</b>    | <b>2.3<br/>(0.58)</b> | <b>100.19<br/>(59.55)</b>     | <b>330.67<br/>(190.35)</b>                 | <b>74.63<br/>(35.19)</b> | <b>50.94<br/>(27.04)</b> | <b>64.22<br/>(28.72)</b> | <b>8.17<br/>(4.18)</b> | <b>16.65<br/>(10.58)</b> | <b>11.22<br/>(4.68)</b> |
| <b>Rango</b>               | <b>(0.7-7.7)</b>      | <b>(7.6-<br/>250.5)</b>       | <b>(12.16-624)</b>                         | <b>(53-93)</b>           | <b>(4-79)</b>            | <b>(8.5-77)</b>          | <b>(8-9)</b>           | <b>(4-42)</b>            | <b>(3-23)</b>           |
| <b>OMS 2010</b>            | <b>≥ 1.5</b>          | <b>≥ 15 x 10<sup>6</sup></b>  | <b>≥ 39 x 10<sup>6</sup></b>               | <b>≥ 58%</b>             | <b>≥ 40%</b>             | <b>≥ 4%</b>              |                        |                          |                         |

Los valores promedio para los parámetros obtenidos de espermotobioscopía, correspondientes al Grupo III se encuentran dentro de lo sugerido como normal por la OMS 2010. En el análisis por individuo para el parámetro de volumen los pacientes 54, 62, 90, 98, 120, 126 y 128 presentaron valores por debajo 0.8, 1.1, 1.2, 0.8, 0.7, 1.2 y 1.4, respectivamente versus 1.5 mL; para el parámetro de densidad del paciente 110 se tuvo valor por debajo del normal 7.6 versus  $\geq 15 \times 10^6$ ; para la cuenta total por eyaculado los pacientes 77, 88 y 110 manifestaron valores bajos 37.5, 37 y 12.16, respectivamente versus  $\geq 39 \times 10^6$ ; para el parámetro de viabilidad la muestra 98 registró valor por debajo 53 versus 58% y para el parámetro de movilidad las muestras 53, 54, 67, 120, 126 y 148 exhibieron valores por debajo 28, 28, 24,

4, 8.5 y 39.5 respectivamente versus  $\geq 40\%$ . Con respecto a los valores del DFI las muestras 54, 90, 91, 95 y 183, que representan el 21.7% de la población total para este grupo, tuvo valores altos 42, 29, 26, 33 y 33% respectivamente versus  $< 25\%$ . Se destaca que el paciente 54 que reveló el valor más alto para DFI y en la espermatobioscopia indicó valores por debajo de lo aceptado para los parámetros de volumen y movilidad. Todos los valores para HDS (cromatina inmadura y proteínas anormales) estuvieron por debajo del valor considerado como negativo  $> 25\%$ .

**Tabla 4.** Datos de los parámetros de espermatobioscopia y ensayo SCSA, correspondientes al Grupo IV. Para las celdas que se encuentran vacías no hubo datos.

| Grupo IV.<br>ABVD/MOPP<br>N=21 | Volumen<br>mL  | Densidad<br>$\times 10^6$ | Esperma x<br>eyaculado $\times 10^6$ | Viabilidad %  | Movilidad %      | Morfología<br>%Normales | pH             | DFI %            | HDS %           |
|--------------------------------|----------------|---------------------------|--------------------------------------|---------------|------------------|-------------------------|----------------|------------------|-----------------|
| MOPP-2-III                     | 3.3            | 0.28                      | 0.92                                 |               |                  |                         |                | 25               | 14              |
| MOPP-3-III                     | 3.5            | 42                        | 147                                  | 70            |                  |                         |                | 8                | 26              |
| MOPP-6-III                     | 1.4            | 51.13                     | 71.57                                | 76            |                  |                         |                | 53               | 10              |
| MOPP-7-III                     | 2.4            | 72.25                     | 173.4                                |               |                  |                         |                | 33               | 7               |
| MOPP-14-III                    | 1.9            | 64.5                      | 122.55                               | 76            | 34               | 18                      | 8              | 20               | 27              |
| MOPP-16-III                    | 1.8            | 27.75                     | 49.95                                |               |                  |                         |                | 36               | 22              |
| MOPP-17-III                    | 3              | 2.8                       | 8.4                                  |               |                  |                         |                | 49               | 9               |
| MOPP-19-III                    | 2.4            | 130                       | 312                                  |               |                  |                         |                | 8                | 37              |
| MOPP-29-III                    | 1.5            | 361.1                     | 541.6                                | 81            |                  |                         | 8.5            | 22               | 14              |
| MOPP-31-III                    | 2.1            | 6.55                      | 13.7                                 | 60.5          | 7                | 40                      | 8.5            | 16               | 7               |
| MOPP-59-III                    | 6.5            | 5.7                       | 37.05                                | 60            | 19.5             | 24                      | 8              | 13               | 22              |
| MOPP-81-III                    | 2              | 27.75                     | 55.5                                 | 80            | 22.5             | 46.5                    | 8.5            | 18               | 15              |
| MOPP-85-III                    | 1.2            | 117                       | 140.4                                | 86.7          | 43               | 76                      |                | 13               | 17              |
| MOPP-105-III                   | 2.8            | 105                       | 294                                  | 70            | 71               | 59                      | 8.5            | 28               | 9               |
| MOPP-106-III                   | 0.5            | 139.5                     | 69.75                                | 72            | 49               | 45                      | 8.5            | 16               | 11              |
| MOPP-158-III                   | 1              | 0.8                       | 0.8                                  | 50            | 2                | 32                      | 8.5            | 13               | 30              |
| MOPP-169-III                   | 2              | 248                       | 496                                  | 85.5          | 40.5             | 79.3                    | 7.5            | 13               | 8               |
| sMOPP-170-III                  | 3.2            | 169.5                     | 542.4                                | 71            | 50               | 58.5                    | 8              | 13               | 23              |
| MOPP-171-III                   |                |                           |                                      |               |                  |                         |                | 11               | 20              |
| MOPP-172-III                   | 6.3            | 0.45                      | 2.8                                  | 30            | 4                | 46                      | 7.5            | 31               | 16              |
| MOPP-174-III                   | 3.5            | 108                       | 380.625                              | 72            | 37               | 46                      | 8              | 21               | 12              |
| Media<br>$\pm$ (DE)            | 2.62<br>(1.54) | 93.28<br>(94.39)          | 192.15<br>(188)                      | 69.38 (14.65) | 31.62<br>(21.96) | 47.52<br>(18.60)        | 8.17<br>(0.39) | 21.90<br>(12.54) | 16.95<br>(4.22) |
| Rango                          | (0.5-6.5)      | (08-361.1)                | (0.8-542.4)                          | (30-85.5)     | (2-71)           | (18-79.3)               | (7.5-8.5)      | (8-53)           | (7-37)          |
| OMS 2010                       | $\geq 1.5$     | $\geq 15 \times 10^6$     | $\geq 39 \times 10^6$                | $\geq 58\%$   | $\geq 40\%$      | $\geq 4\%$              |                |                  |                 |

En el caso de los valores promedio para los parámetros obtenidos de espermatobioscopia, correspondientes al Grupo IV se encuentran dentro de lo sugerido como normal por la OMS 2010, excepto en movilidad que se encontró por debajo 31.62 versus  $\geq 40\%$ . En el análisis por individuo para el parámetro de volumen los pacientes 6, 85, 106 y 158 presentaron valores menores 1.4, 1.2, 0.5 y 1 respectivamente versus  $\geq 1.5$  mL; para la densidad las muestras de

los pacientes 2, 17, 31, 59, 158 y 172 presentaron valores por debajo 0.28, 2.8, 6.55, 5.7, 0.8 y 0.45 respectivamente versus  $\geq 15 \times 10^6$ ; En la cuenta total de espermatozoides por eyaculación, las muestras 2, 17, 31, 59, 158 y 172 tuvieron valores por debajo 0.92, 8.4, 13.7, 37.05, 0.8 y 2.8 respectivamente versus  $\geq 39 \times 10^6$  y para el parámetro de movilidad los pacientes 14, 31, 59, 81, 158, 172 y 174 manifestaron valores bajos 34, 7, 19.5, 22.5, 2, 4 y 37 respectivamente versus  $\geq 40\%$ . Con respecto a los valores del DFI se encontró daño alto en los pacientes 2, 6, 7, 16, 17, 105 y 172, que representan el 33.3% de la población total para este grupo 25, 53, 33, 36, 49, 28 y 31% respectivamente versus  $< 25\%$ . Algunas de las muestras que revelaron valores altos para DFI también demostraron valores por debajo de lo aceptado para algunos parámetros de espermatobioscopía. La muestra 2 evidenció valores bajos para densidad y cuenta total, la muestra 6 para volumen, la 17 para densidad y cuenta total, la 172 para densidad, cuenta total, viabilidad y movilidad y la 174 para movilidad. Las muestras 3, 14, 19 y 158 tuvieron valores elevados para HDS 26, 27, 13 y 30 respectivamente, estuvieron por encima del valor considerado como negativo  $> 25\%$ . Cabe mencionar que no se contó con muchos de los datos para distintos parámetros, por ello es que algunas celdas se encuentran vacías sin dato alguno; esto se debió a que las muestras de este Grupo fueron tomadas de un banco de células criopreservadas y lamentablemente los registros que se hicieron están incompletos.

### **V.3. Daño en la estructura de la cromatina**

El ensayo SCSA fue usado para detectar daño en la estructura de la cromatina de los espermatozoides de los grupos de estudio, la integridad de la cromatina fue expresada por los parámetros DFI y HDS. En este estudio se puso particular atención en el DFI, la tabla 5 resume los valores de DFI encontrados como anormales para los cuatro grupos de estudio.

**Tabla 5. Resultados de la Evaluación de la estructura de la cromatina espermática por el ensayo SCSA.**

| GRUPOS |                                 | Muestras con DFI $\geq$ 25% | DFI de Muestras alteradas (%) |
|--------|---------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| I.     | Testigo<br>n=19                 | 1/19<br>(5.3%)              | 25                            |
| II.    | Antes de tratamiento<br>n=4     | 2/4<br>(50%)                | 30 y 36                       |
| III.   | Tratados con ABVD<br>n=23       | 5/23<br>(21.7%)             | 26,29, 33,33 y 42             |
| IV.    | Tratados con MOPP/ABVD<br>n= 21 | 7/21<br>(33.3%)             | 25, 28, 31, 33, 36,49 y 53    |

Para el Grupo I con una n=19 (individuos testigo), la media para el DFI fue de  $12.21 \pm 4.72$  y un rango de 7-25. Cabe mencionar que tan solo un individuo el NL36 se encuentra en el umbral de daño con un valor de 25%; para los valores de HDS la media fue de  $12.58 \pm 4.66$  y un rango de 6-22. Para el Grupo II con una n=4 (pacientes pretratamiento), la media para el DFI fue de  $19.5 \pm 15.86$  y un rango de 4-36; para los valores de HDS la media fue de  $9 \pm 2.94$  y un rango de 6-19. Para el Grupo III con una n=23 (pacientes tratados con ABVD), la media para el DFI fue de  $16.65 \pm 10.58$  y un rango de 4-42; para los valores de HDS la media fue de  $11.22 \pm 4.68$  y un rango de 3-23. Y por último para el Grupo IV con una n=21 (pacientes tratados con ABVD/MOPP), la media para el DFI fue de  $21.9 \pm 12.54$  y un rango de 8-53; para los valores de HDS la media fue de  $16.95 \pm 4.22$  y un rango de 7-30.

**Tabla 6. Valores promedio de DFI.**

| GRUPOS | MEDIA PARA VALORES DEL DFI | $\pm$ DE | RANGO  |
|--------|----------------------------|----------|--------|
| I      | 12.21                      | 4.72     | (7-25) |
| II     | 19.5                       | 15.86    | (4-36) |
| III    | 16.65                      | 10.58    | (4-42) |
| IV     | 21.9                       | 12.54    | (8-53) |

Los valores promedio más altos por grupo para el valor del DFI corresponden al grupo de pacientes antes del tratamiento y al grupo de pacientes tratados con QT que incluye MOPP 19.5 y 21.9%, respectivamente.

A continuación, se expresan las gráficas correspondientes de las muestras que presentaron los valores más altos para DFI de los cuatro grupos de estudio. Se exponen los citogramas e histogramas obtenidos por el “software SCSA”; tan solo se ubicarán en este apartado las muestras con valor máximo para el DFI por grupo, para el resto de las demás muestras con DFI menor sus gráficas se podrán consultar en el Anexo 5 de este documento.

Breve descripción de las gráficas obtenidas del ensayo SCSA:

**a)** Las gráficas de puntos, citograma o (“dot plot”) como se conoce en citometría de flujo muestran el índice de fragmentación del DNA, cada punto en el diagrama representa la fluorescencia del DNA de un espermatozoide analizado por el láser del citómetro de flujo, en el eje de las (Y) se representan las células con DNA de doble cadena intacto versus el eje de las (X) que representa al DNA desnaturalizado o de cadena sencilla.

**b)** Los histogramas muestran la distribución del índice de fragmentación del DNA (dado por la proporción de fluorescencia roja/fluorescencia roja + verde por el número de eventos). Donde la suma de las fracciones moderado a alto nos da la proporción total del porcentaje de DFI.

Los porcentajes de los índices de fragmentación del DNA se valorarán bajo los siguientes criterios:

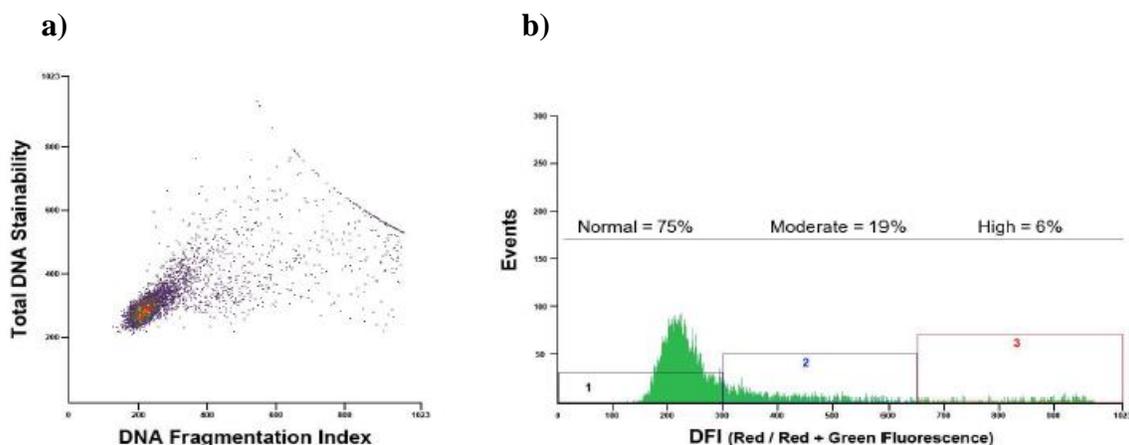
$\leq 15\%$  DFI = De excelente a buena la calidad del DNA espermático.

$> 15\%$  a  $< 25\%$  DFI = De buena a regular Integridad del DNA espermático.

$\geq 25\%$  a  $< 50\%$  DFI = De regular a mala integridad del DNA espermático.

$\geq 50\%$  DFI = Muy mala integridad del DNA espermático.

**Grupo I. Valor máximo con daño en la cromatina expresado por el DFI (Caso NL36).**



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 37387   | 23.98   | 17.92      | 6.06   | 5.24  | 293.76   | 124.72 |
| 37388   | 26.60   | 20.07      | 6.53   | 5.78  | 301.06   | 123.01 |
| mean    | 25.3    | 19.0       | 6.3    | 5.5   | 297.4    | 123.9  |
| std dev | 1.9     | 1.5        | 0.3    | 0.4   | 5.2      | 1.2    |

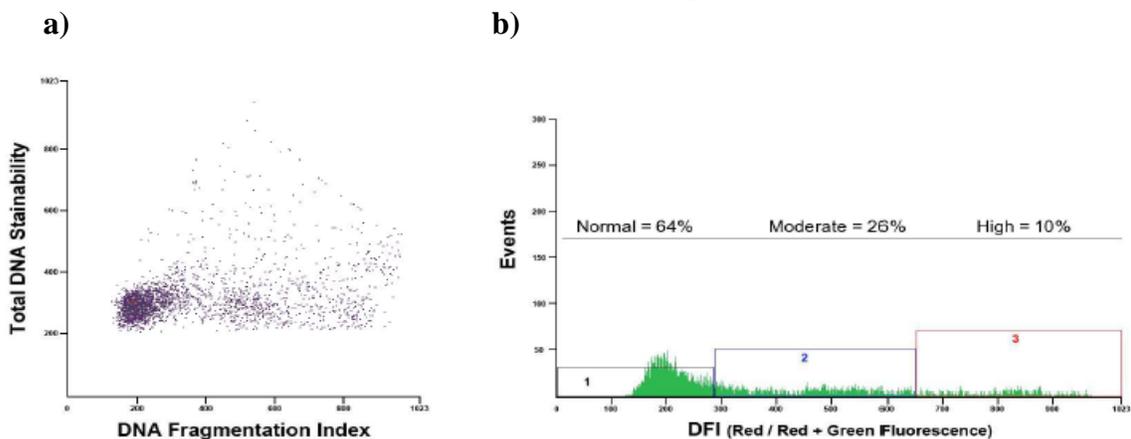
**SCSA® Results**

% DFI = 25%

% HDS = 6%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Fair to Poor Sperm DNA Integrity**

**Grupo II Valor máximo con daño en la cromatina expresado por el DFI (Caso 131-I).**



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 33836   | 42.98   | 30.29      | 12.68  | 4.00  | 355.72   | 141.39 |
| 33837   | 28.83   | 21.71      | 7.12   | 8.11  | 289.79   | 134.89 |
| mean    | 35.9    | 26.0       | 9.9    | 6.1   | 322.8    | 138.1  |
| std dev | 10.0    | 6.1        | 3.9    | 2.9   | 46.6     | 4.6    |

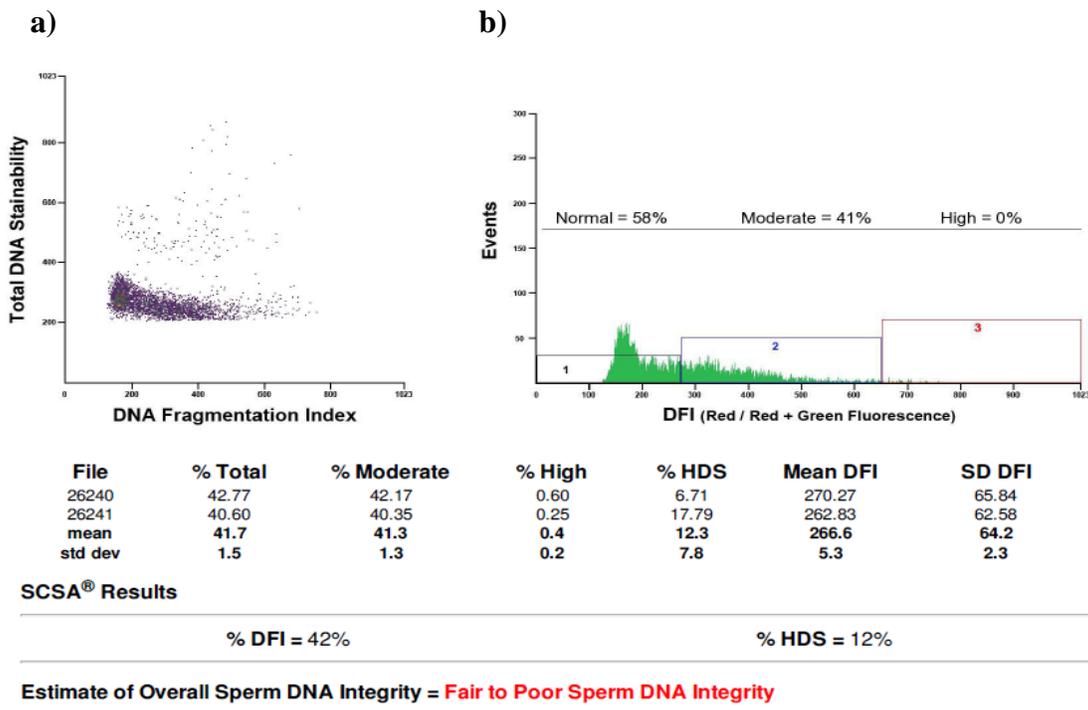
**SCSA® Results**

% DFI = 36%

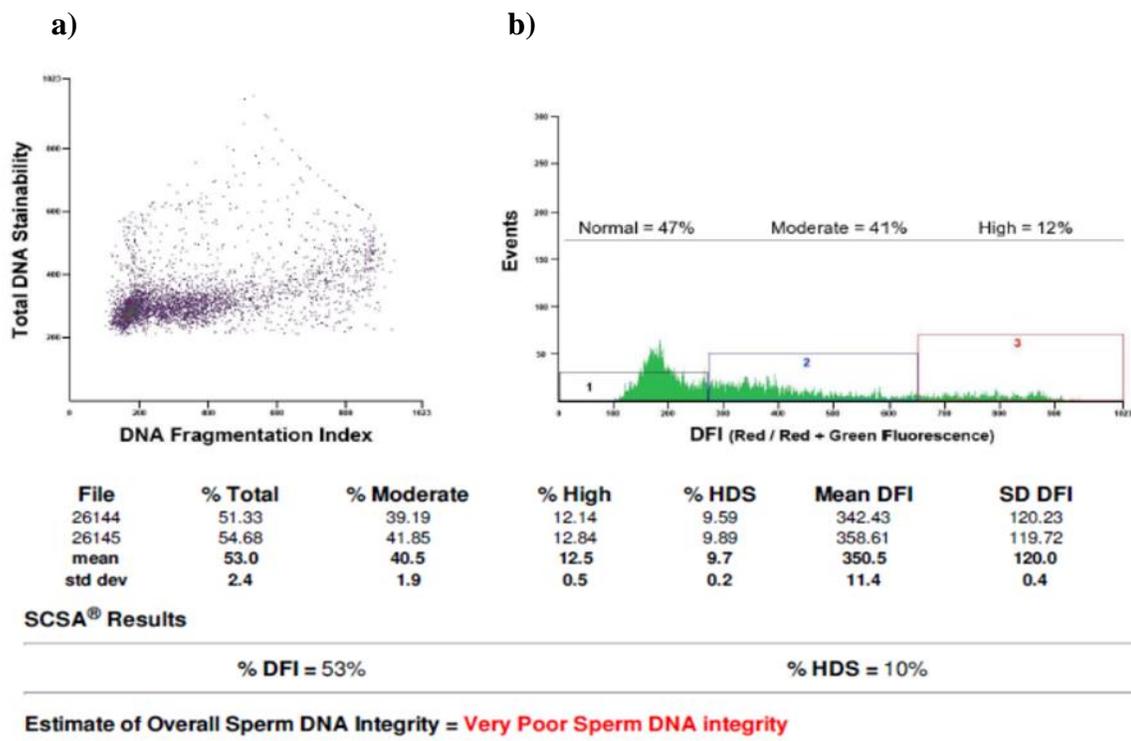
% HDS = 6%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Fair to Poor Sperm DNA Integrity**

**Grupo III Valor máximo con daño en la cromatina expresado por el DFI (Caso ABVD 54).**



**Grupo IV Valor máximo con daño en la cromatina expresado por el DFI (Caso MOPP 6).**



Datos clínicos de los pacientes que tuvieron DFI elevado por grupo.

Del grupo II, pacientes antes del tratamiento, para el caso 131-I con el DFI más elevado de 36% al momento del diagnóstico y tratamiento se encontraba en estadio IVB de la enfermedad, condición histológica de Celularidad Mixta y una edad de 37 años al momento de la donación de muestra de semen para el presente estudio.

Para el grupo III, pacientes tratados con la terapia ABVD, el caso ABVD-54 con el DFI más elevado de 42%, al momento del diagnóstico y tratamiento se encontraba el paciente en estadio IIIB de la enfermedad y una condición celular de esclerosis nodular. La edad a la que fue diagnosticado el paciente, que fue la misma en la que comenzó el tratamiento, fue a los 17 años y la edad a la que donó muestra de semen para participar en el presente estudio fue a los 23 años, es decir, 6 años después del tratamiento. Los registros de RT mencionan que se aplicó en región de cuello con una dosis de 40 Gy, y la QT ABVD fue administrada a las siguientes dosis: adriamicina 44 mg/m<sup>2</sup>, bleomicina 18 mg/m<sup>2</sup>, vincristina 10 mg/m<sup>2</sup> y dacarbacina de 650 mg/m<sup>2</sup>, aplicada en 6 ciclos.

En el grupo IV, pacientes tratados con terapia MOPP/ABVD, el caso MOPP-6 el cual presentó el DFI más elevado de todos los pacientes estudiados, con 53%, al momento del diagnóstico y tratamiento se encontraba en estadio I de la enfermedad. La edad del paciente al tiempo del diagnóstico y tratamiento fue a los 14 años y la edad al lapso de la donación de la muestra de semen fue a los 24 años, es decir 10 años después el tratamiento. Los registros de RT mencionan que fue administrada en la región de cuello con una dosis de 30 Gy; la QT administrada ABVD/MOPP fue de 3 ciclos cada una, con dosis de mostaza de 6 mg/m<sup>2</sup> y de procarbazona de 100 mg/m<sup>2</sup>.

#### V.4. Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) en espermatozoides metodología AM8

Daño numérico y estructural detectado con la metodología AM8

De los pacientes del grupo III, tratamiento ABVD se procesaron las muestras mediante la técnica FISH en interfase, ensayo AM8, para corroborar daño cromosómico estructural (Tabla 7) y numérico (Tabla 8), se escogieron dos muestras de pacientes que tuvieron DFI elevado y dos que presentaron DFI bajo. Y para el grupo IV, pacientes con tratamiento MOPP/ABVD se logró analizar una muestra de un paciente que presentó DFI elevado y dos con DFI bajo. Dos muestras de individuos normales fueron utilizadas como testigo.

**Tabla 7. Daño cromosómico estructural detectado en muestras de esperma por AM8**

| MUESTRA             | Total de células analizadas | A08 deleción 1p | AMM8 duplicación 1p | TOTAL ANORMALES | TOTAL NORMALES | Frecuencia |
|---------------------|-----------------------------|-----------------|---------------------|-----------------|----------------|------------|
| NL -10              | 4918                        | 6               |                     | 6               | 4912           | 0.0012     |
| NL-46               | 10010                       | 2               |                     | 2               | 10008          | 0.00019    |
| ABVD-53 / BAJO DFI  | 2991                        | 2               |                     | 2               | 2989           | 0.00066    |
| ABVD-49 / BAJO DFI  | 10205                       | 4               | 4                   | 8               | 10197          | 0.00078    |
| ABVD-54 / ALTO DFI  | 12087                       | 3               |                     | 3               | 12084          | 0.00024    |
| ABVD-90 / ALTO DFI  | 10821                       |                 |                     | 0               | 10821          | 0          |
| MOPP-174 / BAJO DFI | 5610                        | 12              | 8                   | 20              | 5590           | 0.0035     |
| MOPP-171 / BAJO DFI | 4571                        | 3               | 2                   | 5               | 4566           | 0.001      |
| MOPP-17 / ALTO DFI  | 1595                        | 1               | 1                   | 2               | 1593           | 0.0012     |

La tabla 7, reúne los datos correspondientes al daño estructural detectado mediante la técnica AM8. Se analizaron dos testigos, el NL-10 y el NL46 ambos presentaron alteración estructural con deleción de la región 1p, con un total de ocho células anormales. Lo que representó una frecuencia en promedio de daño estructural de 0.00069.

En el caso de las muestras analizadas del grupo III, pacientes tratados con terapia ABVD, se escogieron dos muestras con DFI bajo y dos con alto, ABVD 53, ABVD 49 y ABVD 54, ABVD 90, respectivamente. Se encontró mayor daño en las muestras de los pacientes con DFI bajo, con un total de 10 células anormales: 6 con deleción de la región 1p y 4 con duplicación de la

región 1p; en comparación con las que presentaron DFI alto, con un total de 3 células anormales con delección 1p. En promedio las muestras con DFI bajo presentaron una frecuencia de daño estructural medido por la técnica AM8 de 0.00072 y las muestras con DFI alto presentaron una frecuencia promedio de 0.00024.

Para el grupo IV pacientes tratados con MOPP/ABVD se analizaron dos muestras representativas con DFI bajo y una muestra con DFI alto, MOPP174/MOPP171 y MOPP17, respectivamente. Se encontró mayor daño en las muestras con DFI bajo, que en las muestras con DFI alto, para este grupo hubo un total de 25 células anormales: 15 presentaron delección de la región 1p, y 10 presentaron duplicación de la región 1p, lo cual represento un promedio de frecuencia de daño estructural de 0.0022. Y para la muestra con DFI alto hubo presencia de 2 células anormales: 1 con delección 1p y la otra con duplicación 1p, lo cual significó una frecuencia de 0.0012.

**Tabla 8. Daño cromosómico numérico detectado en muestras de esperma por FISH AM8**

| MUESTRA                | Total de células analizadas | OO8 | AAMM8 | AM0 | AM88 | TOTAL ANORMALES | TOTAL NORMALES | Frecuencia |
|------------------------|-----------------------------|-----|-------|-----|------|-----------------|----------------|------------|
| NL -10                 | 4914                        |     |       | 2   |      | 2               | 4912           | 0.0004     |
| NL-46                  | 10012                       |     |       | 2   | 2    | 4               | 10008          | 0.00039    |
| ABVD-53 /<br>BAJO DFI  | 2391                        |     |       | 1   |      | 1               | 2989           | 0.00033    |
| ABVD-49 /<br>BAJO DFI  | 10210                       | 5   | 1     | 5   | 2    | 13              | 10197          | 0.0012     |
| ABVD-54 /<br>ALTO DFI  | 12096                       |     |       | 10  | 2    | 12              | 12084          | 0.00099    |
| ABVD-90 /<br>ALTO DFI  | 10825                       | 1   |       | 2   | 1    | 4               | 10821          | 0.00036    |
| MOPP-174 /<br>BAJO DFI | 5595                        | 1   |       | 3   | 1    | 5               | 5590           | 0.00089    |
| MOPP-171 /<br>BAJO DFI | 4567                        |     |       |     | 1    | 1               | 4566           | 0.00021    |
| MOPP-17 /<br>ALTO DFI  | 1594                        |     |       | 1   |      | 1               | 1593           | 0.00062    |

La tabla 8, reúne los datos correspondientes al daño numérico detectado por la técnica AM8 en espermatozoides. Las muestras correspondientes a los dos testigos NL-10 y NL46 presentaron

dos células con disomía del cromosoma ocho y cuatro células con nulisomía para el mismo cromosoma, lo cual representó una frecuencia promedio de daño numérico de 0.00039.

En el caso de las muestras analizadas del grupo III, se encontró daño numérico elevado tanto en pacientes con DFI bajo como pacientes con DFI alto. La muestra ABVD-49/bajo DFI fue la que evidenció la frecuencia más alta 0.0012, con un total de 13 células anormales: 5 con delección de las regiones centroméricas y teloméricas del cromosoma uno, 1 con duplicación de la región centromérica y telomérica de cromosoma uno, 5 con nulisomía del cromosoma ocho y 2 con disomía del cromosoma ocho. Después la muestra ABVD-54 / alto DFI con una frecuencia de daño de 0.00099, con un total de 12 células anormales: 10 con nulisomía del cromosoma ocho y 2 con disomía del cromosoma ocho. Para el caso de las muestras del grupo IV se encontró el siguiente daño numérico, la muestra MOPP-174/bajo DFI presentó la frecuencia más alta siendo de 0.00089, con un total de 5 células anormales: 1 con delección de las regiones centroméricas y teloméricas del cromosoma uno, 3 con nulisomía del cromosoma ocho y 1 con disomía del cromosoma ocho. La muestra con bajo DFI presentó una frecuencia de 0.00021, con 1 célula anormal con disomía del cromosoma ocho. El promedio de las frecuencias de las muestras con bajo DFI es de 0.00055. La muestra MOPP-17/alto DFI presentó una frecuencia de 0.00062, con la presencia de una célula anormal con nulisomía del cromosoma ocho.

## **VI. DISCUSIÓN**

### **VI.1. Se encontró alteración de la cromatina en pacientes pretratamiento.**

En este estudio se detectaron resultados positivos para alteración de la cromatina en dos de los cuatro pacientes del grupo II antes de tratamiento; estos pacientes con un DFI elevado, presentaron síntomas B de la enfermedad, que incluye fiebre, por lo que podrían estar relacionados con el daño a nivel de cromatina. De hecho, uno de estos dos pacientes con valor elevado de DFI, el más alto de su grupo, también manifestó valores alterados en la espermatobioscopia, por debajo de la media aceptada para los parámetros de viabilidad y movilidad comparado con el grupo testigo y con los valores de la OMS 2010.

El linfoma activo y en especial los períodos de fiebre influyen negativamente en la espermatogénesis (Dohle, 2010). Engert y Horning (2011) señalan que el paciente con LH presenta fiebres, sudores nocturnos, pérdida de peso, prurito y fatiga. Describen que es uno de los padecimientos que pueden causar fiebre de origen y que se manifiesta intermitentemente durante varios días que alternan con periodos sin fiebre; estos datos se asocian con un mal pronóstico. Las alteraciones en muestras de espermatozoides antes del tratamiento han sido descritas en distintos trabajos (van der Kaaij *et al.*, 2009; Paoli *et al.*, 2016), las causas de estas alteraciones no se saben con claridad, pero entre los factores de riesgo están la fiebre, el estrés fisiológico y los mecanismos inflamatorios mediados por la respuesta inmune. Louis Bujan y colaboradores (2014) citan dos trabajos importantes sobre la posible relación que existe entre los episodios febriles y las alteraciones espermáticas que se puedan encontrar; Evenson y colaboradores (2000) realizaron mediciones bioquímicas y de citometría de flujo en muestras de semen de un paciente fértil que presentó gripe y fiebre de 39.9 °C y después se analizaron muestras en serie al día 18 y hasta el día 66, para proteínas nucleares, tinción del DNA, tioles libres (SH) y susceptibilidad a la desnaturalización del DNA *in situ*; sus resultados mostraron que los efectos de este episodio de influenza / fiebre indujeron un aumento de la susceptibilidad a la desnaturalización del DNA *in situ*, una mayor capacidad de tinción del DNA, una disminución del número de tioles libres (SH) y una alteración en la composición de la proteína nuclear en las muestras de espermatozoides eyaculados, los cambios en la composición de la cromatina parecen reflejar un efecto de la fiebre que afecta en las etapas tempranas de la espermatogénesis. Por su parte Sergiere y colaboradores (2007) reportan parámetros de cuenta total de espermatozoides, movilidad y viabilidad, así como la integridad del DNA mediante los ensayos SCSA y TUNEL, en un individuo voluntario fértil que presentó fiebre por 2 días de 39 ± 40 °C y encontraron que la cuenta total de espermatozoides disminuyó significativamente a los días 15, 37 y 58 después de la fiebre, regresando a la normalidad a los 79 días posteriores a la elevación de temperatura. En ese trabajo, se concluyó que el DFI, presentó un aumento significativo en un 24% y 36% a los días 15 y 37 después de la fiebre, respectivamente y disminuyó al 15% y 8%, respectivamente, en los días 58 y 79. Por otro lado, la fragmentación del DNA espermático, medida por el ensayo TUNEL, manifestó un aumento no significativo (23%) al día 15 después de la fiebre. Concluyendo que su estudio muestra que un episodio febril puede tener efectos marcados en los parámetros del semen y en la integridad del DNA.

Es de hacer notar que por cuestiones relacionadas con fertilidad hay pacientes que solicitan que se conserve en un banco de criopreservación muestra de su semen antes de iniciar la terapia anticáncer, para ser usada a futuro. Con base en los resultados de este trabajo, junto con los encontrados en la literatura, nos permiten sugerir que se realicen estudios de calidad de semen y de cromatina de espermatozoides para determinar si es recomendable o no preservar estas células.

## **VI.2. Una tercera parte del grupo de sobrevivientes a tratamiento con MOPP/ABVD o sólo ABVD, presentaron alteración en la estructura de la cromatina.**

En los dos grupos de pacientes estudiados se presentaron un número considerable de individuos con daño en la cromatina cuantificado por DFI; en el grupo III, 5 de 23 pacientes 21.7%, y en el grupo IV, 7 de 21 pacientes 33.3%. En general, se observó mayor daño en el grupo IV con quimioterapia MOPP/ABVD; los valores promedio de daño en cromatina detectado por SCSA para el grupo III fueron DFI  $16.65 \pm 10.58$  con un rango de 4-42, para los pacientes del grupo IV tratados con terapia MOPP/ABVD se encontró una media para el DFI de  $21.9 \pm 12.54$  con rango de 8-53. En cuanto al HDS del grupo III fue de  $11.22 \pm 4.68$  con un rango de 3-23, ningún paciente presentó valor por encima del sugerido como normal  $\geq 25\%$ , mientras que el grupo IV reveló una media HDS de  $16.95 \pm 4.22$  con un rango de 7-37, y 4 de los 21 pacientes indicaron valores por encima de lo sugerido como normal  $\geq 25\%$ .

En este estudio se encontró variabilidad intragrupo en la respuesta al tratamiento, ya que la mayoría de los pacientes no tuvieron datos de alteración de la cromatina, ni DFI ni HDS, sin embargo, un subgrupo de ellos si presentaron datos de genotoxicidad como DFI y HDS mayor a 25. Es evidente entonces que el tratamiento anticáncer en los pacientes con LH puede inducir daño en la cromatina, persistente en algunos de ellos.

Los registros de los participantes que fueron positivos para genotoxicidad, muestran que el único dato que tienen en común es que a la mayoría se les administró RT, aunque como se mencionó con anterioridad todos los pacientes tratados con RT fueron protegidos con placas de plomo en el área de los genitales. Todas las muestras con tratamiento ABVD y que presentaron genotoxicidad, los pacientes fueron tratados con RT administrada en diferentes regiones, el

promedio de la dosis aplicada fue de 34.5 Gy con un rango de 21-40 Gy. A excepción de la muestra ABVD 91, la cual no tiene registro de RT y que de su grupo con presencia de genotoxicidad, es la que tuvo el valor más bajo de DFI, siendo este de 26%. Para el grupo de muestras tratadas con MOPP/ABVD y que presentaron genotoxicidad, se encontró en común que todos los individuos recibieron RT administrada en distintas regiones, con un promedio de dosis de 30.3 Gy con un rango de 15 - 40 Gy.

En cuanto a los agentes componentes de la quimioterapia ABVD, aparentemente ninguno de ellos es capaz de alcanzar las células madre germinales.

Específicamente, en la QT MOPP/ABVD se encuentra la procarbazona, sustancia que es capaz de alcanzar las células madre germinales masculinas. Es muy probable que este compuesto sea el responsable de los altos índices de daño en la cromatina que se observó en el grupo IV y que se encuentre más afectado que el grupo III tratado con ABVD. Esto está de acuerdo con hallazgos anteriores de nuestro grupo en el que se encuentra genotoxicidad a largo plazo con este esquema de tratamiento (Sánchez, 2006).

Se sabe que los agentes alquilantes son capaces de inducir tumores malignos secundarios, los más comunes que resultan del tratamiento contra linfomas son las leucemias y tumores sólidos, por ejemplo, de riñón, vejiga, pulmón, mama, tiroides, hueso, tejido blando, estómago, esófago, colon y recto, cérvix, así como de cabeza y cuello. Estos ocurren principalmente después de RT o con tratamiento combinado y aproximadamente el 75% sucede dentro de las zonas radiadas; en un seguimiento de 15 años el riesgo de los segundos tumores sólidos se aproxima al 13% según estimaciones de la literatura (Dores *et al.* 2002; Gangopadhyay *et al.*, 2012), lo cual indica la alta genotoxicidad de los compuestos que se utilizan en la terapia anticáncer.

Bujan *et al.* (2014), en un análisis multivariado realizado a un grupo de pacientes con LH antes y después de tratamiento, mencionan que las características espermáticas alteradas antes del tratamiento son más sensibles a los agentes terapéuticos que aquellas que se encuentran en parámetros de normalidad. Dentro de sus resultados notan que un porcentaje de sus pacientes permaneció azoospermico dos años después del tratamiento con terapia MOPP, por lo que sugieren que los efectos ocasionados por el tratamiento contra el cáncer durante la espermatogénesis y principalmente el provocado a las células madre germinales podría ser la explicación al daño encontrado tiempo después del tratamiento.

Dado lo anterior, se puede mencionar que las alteraciones en la espermatogénesis dependen de un conjunto de factores heterogéneos entre ellos la condición de la enfermedad, tipo y dosis de los tratamientos administrados, condición del paciente, antecedentes de enfermedades genitales que afectaron la producción normal de la calidad espermática, entre otros (Martinez *et al.*, 2017).

Respecto a los pacientes que recibieron QT ABVD, aunque ninguno de los componentes del esquema ABVD se ha reportado que alcance a dañar a las células madre germinales, en este estudio, 5 de las 23 muestras (21.7%) de los pacientes presentaron alteración de la cromatina. Como se mencionó la espermatogénesis puede estar alterada desde el momento del diagnóstico del cáncer, por lo que el tratamiento podría afectar aún más la función gonadal, aunque estos efectos pueden ser parcialmente reversibles, dependiendo de los agentes y la dosis acumulativa utilizada. En los pacientes de este trabajo, no se tiene la información completa sobre la espermatobioscopía antes del tratamiento, pero en 21.7% de los pacientes, se encontró por lo menos 2 parámetros de la espermatobioscopía alterados.

Los agentes actualmente empleados para la QT, como ABVD y los protocolos de tratamiento de RT permiten la curación de la enfermedad evitando a largo plazo infertilidad relacionada con el tratamiento. A diferencia de esto, los agentes alquilantes como la mostaza nitrogenada, la procarbazona y la ciclofosfamida, utilizados anteriormente para tratar los linfomas, causan azoospermia permanente en hasta el 90% de los pacientes, mientras que la terapia actual contra el LH con una combinación de agentes no alquilantes como ABVD da como resultado una recuperación en la espermatogénesis después del tratamiento en el 90% de los pacientes. En cuanto a la genotoxicidad, el protocolo ABVD, actualmente el más utilizado para el tratamiento contra el LH, se asoció con daño genotóxico, aunque en menor número de pacientes y un mínimo daño cuantificado por DFI y como se ha reportado anteriormente (Smit *et al.*, 2010), la espermatogénesis se recuperó en el 90% de los pacientes en este estudio, aunque como se mencionó un 21.7% presentó por lo menos dos parámetros de espermatobioscopía alterados, no es posible afirmar las posibles causas de esta respuesta, por lo que se puede suponer que existen factores diversos como probables causantes del daño en la cromatina.

Finalmente, se puede decir que los datos de este estudio, sugieren que el tratamiento para el LH puede afectar negativamente la fertilidad, estas alteraciones dependerán del tipo de QT, dosis

y cantidad de ciclos administrados, de si recibieron o no RT, así como de la edad del paciente. La QT con agentes alquilantes especialmente los que contienen procarbazona y ciclofosfamida es más perjudicial para la función gonadal y los resultados de este estudio, mostraron una mala calidad de la espermatobioscopía y un mayor número de pacientes con DFI alto cuando fueron tratados con MOPP. El uso de QT sin agentes alquilantes, como lo es la terapia ABVD parece ser menos agresiva para los espermatozoides, sobre todo si se considera que en este estudio sólo se están considerando los pacientes tratados con QT que incluye MOPP, que tienen producción de espermatozoides, por lo que un sesgo importante es que los pacientes más afectados a nivel gonadal, no se están estudiando puesto que tuvieron azoospermia permanente o de larga duración. En general, podemos sugerir que el uso de estos agentes en la terapia, da como resultado una población de individuos sobrevivientes de cáncer que llegan a una edad reproductiva con esperanza de fertilidad, pero con gametos con cromatina afectada, lo cual los convierte en foco de atención ya que podrían presentar fertilidad, pero con posibles problemas de concepción o en su descendencia (van der Kaaij, *et al.* 2010).

### **VI.3. Daño cromosómico determinado por FISH AM8 y su relación con las alteraciones a la cromatina detectado por SCSA.**

La búsqueda del posible daño ocasionado por el uso de agentes genotóxicos empleados en la quimioterapia administrada a pacientes con LH, ha llevado a distintos estudios encargados de demostrar la presencia del daño a nivel de células germinales, esto se ha hecho utilizando muestras de semen, ya que el manejo de espermatozoides es más fácil dado la cantidad de células. Dentro de las metodologías empleadas para abordar esta problemática ha sido de gran ayuda el uso de FISH principalmente en el marcaje de los cromosomas implicados en las principales aneuploidías en seres humanos, de manera que distintos investigadores han empleado esta metodología para demostrar daño evidente en LH, tanto antes, durante y después de la enfermedad (Brandriff *et al.* 1994; Martin *et al.*, 1995; Monteil *et al.*, 1997; Robbins *et al.*, 1997; Frias *et al.*, 2003 y Tempest *et al.*, 2008).

Recientemente Martinez *et al.* (2017) publicaron un trabajo donde analizaron parámetros convencionales de semen y datos obtenidos por metodología FISH para los cromosomas 18, X y Y, para una población analizada prospectivamente de pacientes con LH y Linfoma no

Hodgkin encontraron en su población de pacientes una alta frecuencia de aneuploidías antes del tratamiento, los parámetros del semen siguieron un curso similar antes y después del tratamiento. Los autores destacan la importancia del estudio al ser un análisis prospectivo, pero al igual ven las debilidades que tiene únicamente reportar tres tasas de aneuploidías tan solo para tres cromosomas y el no investigar anomalías estructurales, mencionando que esto podría subestimar los efectos de los tratamientos en todos los cromosomas espermáticos, dado que algunos autores han sugerido que podría existir un efecto intercromosómico (Frias *et al.*, 2003; Rogenhofer *et al.*, 2012).

En este estudio no se encontró correlación entre las frecuencias del daño detectado con las metodologías SCSA y el realizado con FISH, es probable que esta falta de asociación se deba a que no fueron estudiados con FISH todos los pacientes, sino solamente uno o dos de cada grupo con DFI alto y bajo, como se puede observar en las tablas 7 y 8. El estudio de FISH por otra parte, detecta daño al DNA ya consumado en las células, mientras que el estatus de la cromatina estudiado por SCSA lo que está revelando es una alteración en la condensación y estructura de la cromatina, lo cual es muy probable que sea el precedente de las rupturas de doble hebra, que evidencia la metodología y que son más bien, precursoras de las lesiones que se detectan mediante el FISH. Por otra parte, el FISH es un estudio que genera información de célula individual y tan sólo de 2/24 cromosomas, por lo que es probable que, aunque ambos procedimientos detecten daño estructural del DNA, se requiera de un estudio de población más grande para poder encontrar coincidencias relativas al daño genotóxico conferido por los agentes anticáncer que aquí se estudiaron. A pesar de esta falta de correlación, se considera que es de gran importancia obtener información de daño cromosómico espermático tanto numérico como estructural, para fortalecer el entendimiento de la enfermedad.

## **VII. CONCLUSIONES**

Se encontraron valores altos de DFI en todos los grupos de pacientes, así como en el grupo testigo. Una tercera parte del grupo de pacientes tratados con MOPP/ABVD presentaron alteración en la estructura cromatínica, mientras que en el grupo ABVD se encontraron alteraciones en 5 de los 23 casos (21.7%); en el grupo tratado con MOPP se encontró un alto número de pacientes, 7 de 21 (33.3%). En la QT que incluye MOPP, se sabe que el componente

procarbazona puede inducir genotoxicidad en células madre germinales masculinas, mientras que la terapia ABVD, que actualmente es el estándar, no hay evidencia de que sus componentes alcancen las células madre germinales, es posible que, debido a esto, se haya encontrado menor genotoxicidad. Es muy importante mencionar que en todos los pacientes en los que se encontró un alto nivel de daño cromatínico, también tuvieron tratamiento con RT, por lo que aun cuando se protegieron las zonas genitales, es probable que a RT pudiera tener un efecto genotóxico generalizado y no localizado, aunque se requiere de otro tipo de diseño de estudio para resolver este punto.

Llama la atención que en el grupo pretratamiento, dos de los cuatro pacientes tuvieron también alteración de la estructura de la cromatina, por lo que es necesario incrementar el tamaño de muestra, para determinar si es una característica propia de la enfermedad y no efecto del tratamiento anticáncer y corroborar si al partir de una basal alta en los pacientes, el tratamiento pudiera específicamente en ellos, incrementar también la afectación resultante de la QT/RT, aumentando el número de pacientes afectados.

No se encontró correlación entre el daño detectado por DFI y el encontrado por el ensayo de FISH AM8. Es necesario aumentar el estudio de los individuos con este tipo metodologías, ya que proporcionan información de gran relevancia para entender el comportamiento del daño generado por la enfermedad y el ocasionado por el tratamiento administrado, así como la predicción del posible daño postratamiento con probables consecuencias a nivel de fertilidad o bien, después de la concepción, en la descendencia.

## VIII. LITERATURA CITADA

- Ansell SM. 2016. Hodgkin lymphoma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American Journal of Hematology*. 91, 435-442.
- Arnon J, Meirow D, Lewis-Roness H, Ornoy A. 2001. Genetic and teratogenic effects of cancer treatments on gametes and embryos. *Human Reproduction Update*.7, 394-403.
- Brandriff BF, Meistrich ML, Gordon LA, Carrano AV, Liang JC. 1994. Chromosomal damage in sperm of patients surviving Hodgkin's disease following MOPP (nitrogen mustard, vincristine, procarbazine, and prednisone) therapy with and without radiotherapy. *Human Genetics*. 93, 295-299.
- Boivin JF, Hutchison GB, Lyden M, Godbold J, Chorosh J, Schottenfeld D. 1984. Second primary cancers following treatment of Hodgkin's disease. *Journal of the National Cancer Institute*. 72, 233-241.
- Bujan L, Walschaerts M, Brugnol F, Daudin M, Berthaut I, Auger J, Saias J, Szerman E, Moinard N, Rives N, Hennebicq S. 2014. Impact of lymphoma treatments on spermatogenesis and sperm deoxyribonucleic acid: a multicenter prospective study from the CECOS network. *Fertility and Sterility*. 102, 667-674.
- Bungum M, Bungum L, Giwercman A. 2011. Sperm chromatin structure assay (SCSA): a tool in diagnosis and treatment of infertility. *Asian Journal of Andrology*. 13, 69-75.
- Dohle GR. 2010. Male infertility in cancer patients: Review of the literature. *International Journal of Urology*. 17, 327-331.
- Domínguez AR, Lizaso JA, Merino L, Padro JG, Blanco CQ, Codina JG, Muñoz M, Banaclocha NM, Abreu DR, Pulla MP. 2015. SEOM clinical guidelines for the treatment of Hodgkin's lymphoma. *Clinical and Translational Oncology*. 17, 1005-1013.
- Dores GM, Metayer C, Curtis RE, Lynch CF, Clarke EA, Glimelius B, Storm H, Pukkala E, van Leeuwen FE, Holowaty EJ, Andersson M, Wiklund T, Joensuu T, van't

Veer MB, Stovall M, Gospodarowicz M, Travis LB. 2002. Second malignant neoplasms among long-term survivors of Hodgkin's disease: a population-based evaluation over 25 years. *Journal of Clinical Oncology*. 20, 3484-3494.

- Engert A, Plütschow A, Eich HT, Lohri A, Dörken B, Borchmann P, Berger B, Greil R, Willborn KC, Wilhelm, M, Debus J, Eble MJ, Sökler M, Ho A, Rank A, Ganser A, Trümper L, Bokemeyer C, Kirchner H, Schubert J, Král Z, Fuchs M, Müller-Hermelink H, Müller R, Diehl V. 2010. Reduced treatment intensity in patients with early-stage Hodgkin's lymphoma. *The New England Journal of Medicine*. 363, 640-652.
- Engert A, Horning SJ. 2011. Hodgkin Lymphoma. A comprehensive update on diagnostics and clinics. *Hematologic Malignancies*. Springer. 373.
- Evenson DP, Melamed MR. 1983. Rapid analysis of normal and cell types in human semen and testis biopsies by flow cytometry. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 31, 248-253.
- Evenson DP, Jost LK, Corzett M, Balhorn R. 2000. Characteristics of human sperm chromatin structure following an episode of influenza and high fever: a case study. *Journal of Andrology*. 21, 739-746.
- Evenson DP, Wixon R. 2006. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology*. 65, 979-991.
- Evenson DP. 2013. Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA). In spermatogenesis: methods and protocols, methods in molecular biology. Chapter 14. Douglas TC, Kenneth IA. *Springer Science Business Media*. 927, 147-164.
- Fragkos M, Naim V. 2017. Rescue from replication stress during mitosis. *Cell cycle*. 16, 613-633.
- Frias S. Consecuencias genéticas del tratamiento antineoplásico en células germinales de pacientes con cáncer. En: Rivera-Luna R. *Oncología pediátrica; Conceptos básicos y clínicos*. México. Ed. Intersistemas S.A. de C.V. 2002. p. 303-335.

- Frias S, Van Hummelen P, Meistrich ML, Lowe XR, Hagemester FB, Shelby MD, Bishop JB, Wyrobek AJ. 2003. NOVP Chemotherapy for Hodgkin's disease transiently induces sperm aneuploidies associated with the major clinical aneuploidy syndromes involving chromosomes X, Y, 18 y 21. *Cancer Research*. 63, 44-51.
- Gangopadhyay A, Nath P, Khan MR, Biswas J. 2012. Bladder carcinoma after ABVD chemotherapy for Hodgkin's lymphoma: a case report. *Case Reports in Oncology*. 5, 148-153.
- Gobbi PG, Ferreri AJM, Ponzoni M, Levis A. 2013. Hodgkin lymphoma. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 85, 216-237.
- Kobayashi H, Larson K, Sharma RK, Nelson DR, Evenson DP, Toma H, Thomas AJ, Agarwal A. 2001. DNA damage in patients with untreated cancer as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertility and Sterility*. 75, 469-475.
- Lares-Assef. 2002. Agentes antineoplásicos. En: *Oncología pediátrica; Conceptos básicos y clínicos*. Cap. 3. Rivera-Luna Ed. Intersistemas S.A. de C.V. México. 33-62.
- Martinez G, Walschaerts M, Le Mitouard M, Borye R, Thomas C, Auger J, Berthaut I, Brugnon F, Daudin M, Moinard N, Ravel C, Saias J, Szerman E, Rives N, Hennebicq S, Bujan L. 2017. Impact of Hodgkin or non-Hodgkin lymphoma and their treatments on sperm aneuploidy: a prospective study by the French CECOS network. *Fertility and Sterility*. 107, 341-350.
- Martin RH, Rademaker AW, Leonard NJ. 1995. Analysis of chromosomal abnormalities in human sperm after chemotherapy by karyotyping and fluorescence in situ hybridization (FISH). *Cancer Genetics Cytogenetics*. 80, 29-32.
- Monteil M, Rousseaux S, Chevret E, Pelletier R, Cozzi J, Sèle B. 1997. Increased aneuploid frequency in spermatozoa from a Hodgkin's disease patient after chemotherapy and radiotherapy. *Cytogenetics and Cell Genetics*. 76, 134-138.
- Ng J, Shuryak I. 2014. Minimizing second cancer risk following radiotherapy: current perspectives. *Cancer Management and Research*: 7, 1-11.

- O'Flaherty C, Vaisheva F, Hales BF, Chan P, Robaire B. 2008. Characterization of sperm chromatin quality in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients prior to chemotherapy. *Human Reproduction*. 23, 1044-1052.
- Paoli D, Gallo M, Rizzo F, Spanò M, Leter G, Lombardo F, Lenzi A, Gandini L. 2014. Testicular cancer and sperm DNA damage: short- and long-term effects of antineoplastic treatment. *Andrology*. 3, 122-128.
- Paoli D, Rizzo F, Fiore G, Pallotti F, Pulsoni A, Annechini G, Lombardo F, Lenzi A, Gandini L. 2016. Spermatogenesis in Hodgkin's lymphoma patients: a retrospective study of semen quality before and after different chemotherapy regimens. *Human Reproduction*. 31, 263-272.
- Robbins WA, Baulch JE, Moore D, Weier HU, Blakey D, Wyrobek AJ. 1995. Three-probe fluorescence hybridization to assess chromosome X, Y and 8 aneuploidy in sperm of 14 men from two healthy groups: evidence for a paternal age effect on sperm aneuploidy. *Reproduction Fertility Development*. 7, 799-809.
- Robbins WA, Meistrich ML, Moore D, Hagemester FB, Weier HU, Cassel MJ, Wilson G, Eskenazi B, Wyrobek AJ. 1997. Chemotherapy induces transient sex chromosomal and autosomal aneuploidy in human sperm. *Nature Genetics*. 16, 74-78.
- Rogenhofer N, Dürl S, Ochsenkühn R, Neusser M, Aichinger E, Thaler CJ, Müller S. 2012. Case report: elevated sperm aneuploidy levels in an infertile Robertsonian translocation t(21;21) carrier with possible interchromosomal effect. *Journal Assisted Reproduction and Genetics*. 29, 343-346.
- Salas C, Niembro A, Lozano V, Gallardo E, Molina B, Sánchez S, Ramos S, Carnevale A, Pérez-Vera P, Rivera Luna R, Frias S. 2012. Persistent genomic instability in peripheral blood lymphocytes from Hodgkin lymphoma survivors. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 53, 271-280.
- Sánchez SSR. 2006. Detección de aneuploidías en espermatozoides de pacientes con enfermedad de Hodgkin tratados con quimioterapia. Tesis de posgrado en ciencias biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF. 119.

- Seling BP, Furr JR, Huey RW, Moran C, Alluri VN, Medders GR, Mumm CD, Hallford HG, Mulvihill JJ. 2012. Cancer chemotherapeutic agents as human teratogens. Birth defects research, part A. *Clinical and Molecular Teratology*. 94, 626-650.
- Sergerie M, Mieusset R, Croute F, Daudin M, Bujan L. 2007. High risk of temporary alteration of semen parameters after recent acute febrile illness. *Fertility and Sterility*. 88, 1-7.
- Smit M, van Casteren NJ, Wildhagen MF, Romijn JC, Dohle GR. 2010. Sperm DNA integrity in cancer patients before and after cytotoxic treatment. *Human Reproduction*. 25, 1877-1883.
- Specht L, Yahalom J, Illidge T, Berthelsen AK, Constone LS, Eich HT, Girinsky T, Hoppe RT, Mauch P, Mikhaeel NG, Ng A. 2014. Modern radiation therapy for Hodgkin lymphoma: field and dose guidelines from the international lymphoma radiation oncology group (ILROG). *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. 89, 854-862.
- Tempest HG, Ko E, Chan P, Robaire B, Rademaker A, Martin RH. 2008. Sperm aneuploidy frequencies analysed before and after chemotherapy in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients. *Human Reproduction*. 23, 251-258.
- Terezakisa SA, Kasamon YL. 2012. Tailored strategies for radiation therapy in classical Hodgkin's lymphoma. *Critical Reviews in Oncology Hematology*. 84, 71-84.
- van der Kaaij MA, Heutte N, van Echten-Arends J, Raemaekers JM, Carde P, Noordijk EM, Fermé C, Thomas J, Eghbali H, Brice P, Bonmati C, Henry-Amar M, Kluin-Nelemans HC. 2009. Sperm quality before treatment in patients with early stage Hodgkin's lymphoma enrolled in EORTC-GELA lymphoma group trials. *Haematologica*. 94, 1691-1697.
- van der Kaaij MA, van Echten-Arends J, Simons AH, Kluin-Nelemans HC. 2010. Fertility preservation after chemotherapy for Hodgkin lymphoma. *Hematological Oncology*. 28, 168- 179.

- Van Hummelen P, Lowe XR, Wyrobek AJ. 1996. Simultaneous detection of structural and numerical chromosome abnormalities in sperm of healthy men by multicolor fluorescence in situ hybridization. *Human Genetics*. 98, 608-615.
- van Leeuwen FE, Somers R, Taal BG, van Heerde P, Coster B, Dozeman T, Huisman SJ, Hart AA. 1989. Increased risk of lung cancer, non- Hodgkin's lymphoma, and leukemia following Hodgkin's disease. *Journal of Clinical Oncology*. 7, 1046-1058.
- Vozdova M, Oracova E, Kasikova K, Prinosilova P, Rybar R, Horinova V, Gaillyova R, Rubes J. 2013. Balanced chromosomal translocations in men: relationships among semen parameters, chromatin integrity, sperm meiotic segregation and aneuploidy. *Journal of Assisted Reproduction Genetics*. 30, 391-405.
- Witt KL, Bishop JB. 1996. Mutagenicity of cancer drugs in mammalian germ cells. *Mutation research*. 355, 209-234.
- World Health Organization. 2010. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 5th ed. 260.
- Wyrobek AJ, Alhborn T, Balhorn R, Stanker L, Pinkel D. 1990. Fluorescence *in situ* hybridization to Y chromosomes in decondensed human Sperm nuclei. *Molecular Reproduction and Development*. 27, 200-208.
- Yeoh KW, Mikhaeel NG. 2011. Role of Radiotherapy in Modern Treatment of Hodgkin's Lymphoma. *Advances in Hematology*. 2011, 1-6.

## ANEXO 1. Carta de Consentimiento Informado



# Instituto Nacional de Pediatría

**“Búsqueda de daño en la estructura de la cromatina en espermatozoides de sobrevivientes a linfoma de Hodgkin que fueron tratados con ABVD”**

## CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Se le invita a Ud. a participar en este estudio. Por favor lea cuidadosamente esta carta y pregunte al médico del estudio cualquier duda al respecto.

### **¿Para qué es este estudio?**

En este estudio buscaremos daño en la estructura del material hereditario que contienen los espermatozoides de pacientes con linfoma de Hodgkin que fueron tratados con quimioterapia MOPP (mostaza nitrogenada, vincristina, procarbazona y prednisona) y/o ABVD (Adriamicina, Bleomicina, Vinblastina, Dacarbazina). Esto permitirá conocer sobre los efectos que tiene la exposición a medicamentos para tratar el cáncer en sus espermatozoides. Su aceptación se considera voluntaria y no modificará el tratamiento que Ud. recibe. La decisión de participar implica que usted tenga un conocimiento completo de los riesgos y beneficios, los cuales se detallan en esta carta.

### **¿Puedo negarme a participar en este estudio o abandonarlo?**

Ud. Es libre de participar o no en este estudio; así como de continuar o retirarse del mismo en el momento que así lo desee y esto no afectará de ninguna manera su relación con el hospital o el grupo médico que lo atiende.

### **Procedimientos a realizarse**

Se le solicitará muestra de esperma, la cual obtendrá el propio paciente por medio de masturbación. Se le proporcionará un envase de boca ancha nuevo y esterilizado para la colección de la muestra y se le indicará el lugar en dónde se realizará la obtención.

A las muestras se les revisará la cantidad de espermatozoides, cuántos hay vivos, su forma y movimiento. Posteriormente la muestra se procesará con las metodologías llamadas: SCSA (del inglés Sperm Chromatin Structure Assay) que tiene como objetivo evaluar la susceptibilidad de la cromatina espermática a la desnaturalización in situ y la técnica AM8 que muestra el daño cromosómico estructural mediante FISH en interfase.

### **Quienes pueden participar**

Solo pueden participar aquellos varones mayores de 18 años que hayan terminado con su tratamiento de quimio/radioterapia por lo menos un año atrás y que dicho tratamiento haya sido con esquemas ABVD y MOPP.

### **No podrán participar**

Pacientes con Linfoma de Hodgkin que hayan recibido un esquema anticáncer diferente al mencionado anteriormente o que aún estén bajo tratamiento.

### **¿Quién pagará por estos estudios?**

Este estudio no representará ningún costo adicional para el paciente ni su familia. Los costos para la realización de este estudio serán obtenidos por fondos del gobierno federal y de organismos que apoyan la investigación científica como el CONACYT. No se le pagará a usted ninguna cantidad por su participación.

### **Efectos indeseables y riesgos**

Este estudio no generará ningún efecto no deseable para el participante. La muestra se utilizará exclusivamente para propósitos de investigación; la muestra de espermatozoides no se usará para fecundar ningún óvulo humano, ni para ningún otro propósito.

### **Beneficios para las personas participantes en el estudio**

El médico tratante dará a conocer a los pacientes los resultados de la evaluación de cantidad, viabilidad, forma y movimiento de sus espermatozoides, para saber su estatus en cuanto a fertilidad, lo cual es un dato valioso, sobre todo para aquellos que aún no han tenido hijos.

### **¿A quién debo llamar en caso de tener preguntas?**

Cualquier duda adicional puede ser aclarada por las M. en C. Bertha Molina y Silvia Sánchez investigadoras responsables del proyecto en el Laboratorio de Citogenética del Instituto Nacional de Pediatría, Tel. 10840900 ext. 1436.

En caso de dudas sobre los derechos del participante, puede comunicarse con la Dra. Matilde Ruiz García, Presidente del Comité de Ética del Instituto Nacional de Pediatría al teléfono 10840900 Ext. 1581.

### **¿Qué se va a hacer con las muestras biológicas?**

A todas las muestras se les dará un código, de tal forma que solamente su médico tratante y el investigador responsable conocerán su identidad.

La muestra de espermatozoides que no se utilice, se almacenará en un congelador con temperaturas muy bajas sin conservar la vida de sus espermatozoides, para tenerla en caso de que se tuviera que repetir el estudio.

### **Información y datos personales**

Los resultados y los datos obtenidos de los cuestionarios serán confidenciales y el conocimiento que se genere, sólo se podrá reportar en publicaciones científicas y presentaciones en congresos. No se incluirá ninguna información que permita la identificación de los participantes.

#### **Al firmar a continuación, acepto que:**

- He leído este formato de consentimiento.
- He tenido la oportunidad de formular preguntas y éstas han sido contestadas a mi entera satisfacción.
- Acepto participar en el estudio
- Entiendo mi participación es voluntaria.
- Doy permiso para que se use y comparta la información referente como se describe en este formato
- Puedo elegir no participar en el estudio

Nombre del participante \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Nombre y firma de la persona que conduce la revisión del consentimiento

\_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Nombre y firma de Testigo \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Relación que tiene con el voluntario \_\_\_\_\_

De ser posible anote su dirección \_\_\_\_\_

Nombre y firma de Testigo \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

De ser posible anote su dirección \_\_\_\_\_

Relación que tiene con el voluntario \_\_\_\_\_

#### **Recibí copia de este consentimiento**

Nombre y firma \_\_\_\_\_

Fecha \_\_\_\_\_

## ANEXO 2. Cuestionario de Tamizaje

Nombre del Paciente \_\_\_\_\_

Fecha \_\_\_\_\_

1. Fecha de Nacimiento \_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_  
día/mes/año

2. ¿Ha tenido Fiebre de más de 38°C en los últimos 6 meses?

Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

3. Que enfermedades ha tenido en los últimos 3 meses \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

4. ¿Tiene vasectomía? Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

5. Ha padecido:

a) ¿Testículos no descendidos? Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

b) ¿Varicocele (venas varicosas en escroto)? Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

c) ¿Otra enfermedad urinaria o genital? Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

Especifique \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

d) ¿Alguna enfermedad endócrina u hormonal? Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

Especifique \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

e) Cáncer Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

Especifique:

Tipo \_\_\_\_\_

Quimioterapia \_\_\_\_\_

Radioterapia \_\_\_\_\_

6. ¿Se ha tomado radiografías, o practicado algún examen que involucre radiación en los 3 últimos meses? Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

7. ¿Se ha practicado un examen de semen antes? Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

Especifique la razón\_\_\_\_\_

8. ¿Tiene algún problema de fertilidad? Si\_\_\_\_\_ No\_\_\_\_\_

Si es afirmativo, especifique\_\_\_\_\_

#### DE ACUERDO AL CUESTIONARIO DE TAMIZAJE:

##### Pregunta

1. Menor de 18 años, no se incluye
2. Si es positiva, esperar tres meses para tomar muestras
3. Si ha tenido enfermedades virales y/o de transmisión sexual en los últimos tres meses, se excluye
4. Afirmativo, se excluye
5. Afirmativo, se excluye. (excepción de los pacientes con LH, pero un LH con cáncer secundario se excluye también)
6. Afirmativo, esperar para tomar muestras
7. y 8. Si se sospecha alguna enfermedad de origen cromosómico, se excluye

### ANEXO 3. Cuestionario Principal

Por favor contesta las siguientes preguntas.

1. Fecha \_\_\_\_\_
2. Fecha de nacimiento \_\_\_\_\_
3. Peso del paciente \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ kgs.
4. Talla del paciente \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ mts.

#### 5. Estado Civil

- Soltero
- Divorciado
- Viudo
- Separado
- Casado
- unión libre

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

- No Con cuáles agentes has tenido contacto \_\_\_\_\_
- Si \_\_\_\_\_

7. ¿Fumas regularmente?

- no
- si

Anota el número promedio de cigarros por día, fumados durante los últimos 5 años

\_\_\_\_\_

8. ¿Tomas bebidas alcohólicas regularmente?

- no
- si

Qué cantidad promedio por semana en los últimos 5 años \_\_\_\_\_

1 vaso de vino = 110 ml.

1 vaso de cerveza = 330 ml.

1 vaso de licor = 35 ml.

9. ¿Tomas Drogas regularmente?

- no
- si

Qué tipo de drogas y con qué frecuencia \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

10. ¿Tomas bebidas que contienen cafeína (café, refresco de cola, té negro)?

- no
- si

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

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

|                           | No                       | Si                       |
|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Diabetes                  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Trastornos de la tiroides | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Hepatitis                 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Convulsiones/epilepsia    | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

12. ¿Has tomado algún medicamento en los últimos tres meses?

| Menciona qué medicamentos | Porqué razón | Cuántos días |
|---------------------------|--------------|--------------|
| 1. _____                  | _____        | _____        |
| 2. _____                  | _____        | _____        |
| 3. _____                  | _____        | _____        |

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

- no
- si

¿Qué tipo de examen? \_\_\_\_\_

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

- no
- si

¿Cuál (anótalo)?

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

Testículos sin descender al nacimiento. si  no

Varicocele. si  no

Fimosis. si  no

Infección de vías urinarias. si  no

Enfermedades de transmisión sexual. si  no

Paperas. si  no

Cuando presentaste paperas ¿tuviste inflamación dolorosa de los testículos? si  no

¿Secreción anormal por el pene? si  no

¿Sensación de ardor al orinar? si  no

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

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

- no
- si, en los últimos 12 meses.

si, antes de los últimos 12 meses.

¿Cuándo? 20\_\_\_\_\_.

17. ¿Durante los últimos tres meses, cuántas veces en promedio has eyaculado?  
\_\_\_\_\_ veces por mes.

18. ¿Has presentado fiebre de 38°C o mayor durante los últimos 3 meses?

no

si

¿Hace cuánto tiempo presentaste fiebre? \_\_\_\_\_ días

19. Durante los últimos tres meses cuántas horas a la semana en promedio utilizaste moto o bicicleta \_\_\_\_\_ horas/semana.

20. Durante los últimos tres meses cuántas horas al día en promedio manejaste un vehículo de motor \_\_\_\_\_ horas/día.

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

boxer.

Pants

Ninguna

Otra especificar).

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

no

si

¿Cuántas veces al mes?

\_\_\_\_\_ Veces al mes.

¿Cuánto has durado en promedio?

\_\_\_\_\_ Minutos.

**ANEXO 4. Para ser llenado por el médico**

**Favor de llenar los siguientes datos de acuerdo al expediente del paciente.**

**Institución:**

**Expediente #:**

**Fecha de Nacimiento:**

**Edad al Diagnóstico:**

**Limfoma de Hodgkin estadio:**

**Tipo Celular:**

**Fecha de Inicio de Quimioterapia:**

**Tipo de Quimioterapia (incluir los ciclos y las dosis aplicadas de cada mezcla):**

(De ser necesario incluir hojas extra)

**Fecha de Inicio de Radioterapia:**

**Dosis Aplicada y Zona de Aplicación:**

**Fecha de término de quimioterapia:**

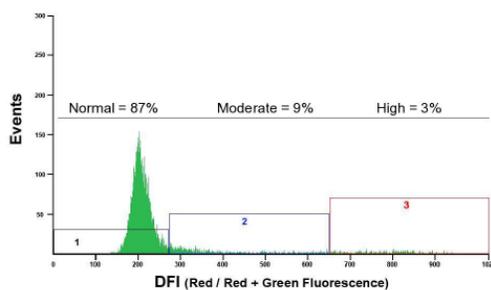
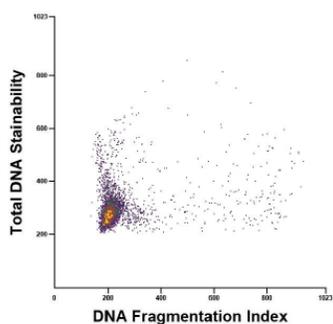
**Observaciones:**

**Médico Tratante (Nombre y Firma):**

## ANEXO 5. Análisis por individuo del estudio de integridad de la cromatina (Gráficas de puntos e Histogramas del ensayo SCSA)

### INDIVIDUOS SANOS

NL 25



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 26134   | 11.94   | 8.59       | 3.34   | 12.49 | 239.21   | 98.93  |
| 26135   | 13.52   | 9.93       | 3.59   | 12.07 | 241.49   | 103.8  |
| mean    | 12.7    | 9.3        | 3.5    | 12.3  | 240.4    | 101.4  |
| std dev | 1.1     | 0.9        | 0.2    | 0.3   | 1.6      | 3.4    |

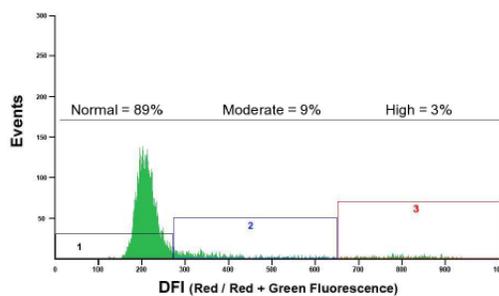
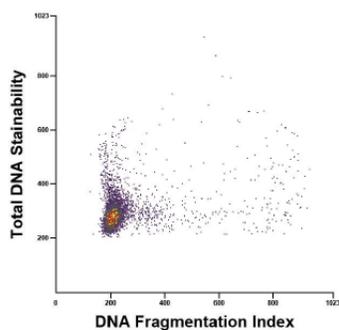
#### SCSA® Results

% DFI = 13%

% HDS = 12%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Excellent to Good Sperm DNA Integrity**

NL 26



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 26130   | 13.25   | 9.99       | 3.27   | 12.26 | 244.64   | 99.41  |
| 26131   | 9.60    | 7.43       | 2.17   | 13.28 | 228.69   | 88.43  |
| mean    | 11.4    | 8.7        | 2.7    | 12.8  | 236.7    | 93.9   |
| std dev | 2.6     | 1.8        | 0.8    | 0.7   | 11.3     | 7.8    |

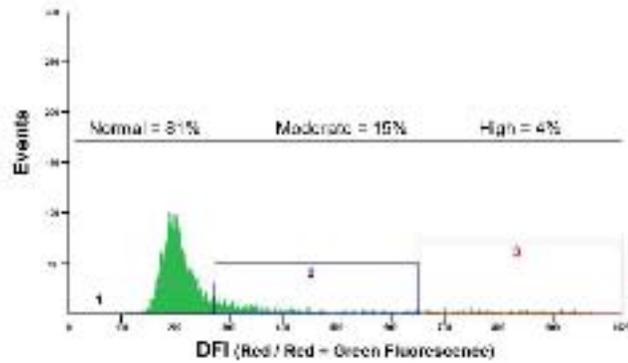
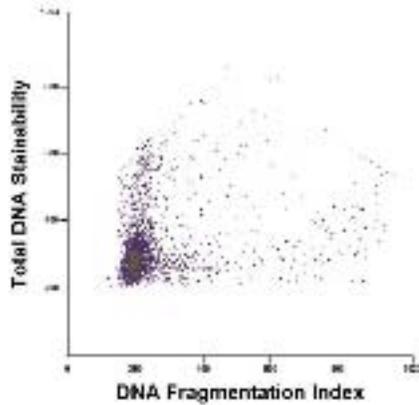
#### SCSA® Results

% DFI = 11%

% HDS = 13%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Excellent to Good Sperm DNA Integrity**

NL 27



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 26128   | 18.96   | 14.54      | 4.02   | 21.13 | 251.91   | 113.98 |
| 26129   | 19.04   | 15.00      | 4.04   | 20.19 | 251.32   | 109.06 |
| mean    | 18.8    | 14.8       | 4.0    | 20.7  | 251.6    | 111.6  |
| std dev | 0.3     | 0.3        | 0.0    | 0.7   | 0.4      | 3.4    |

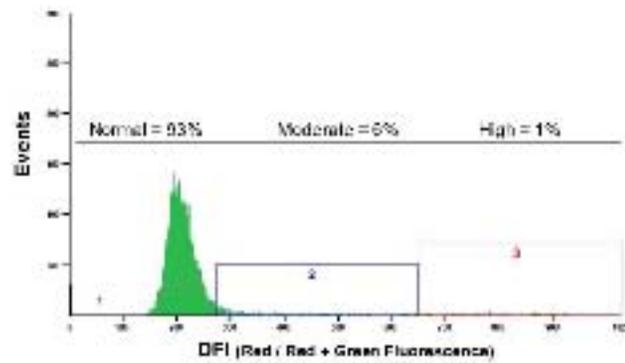
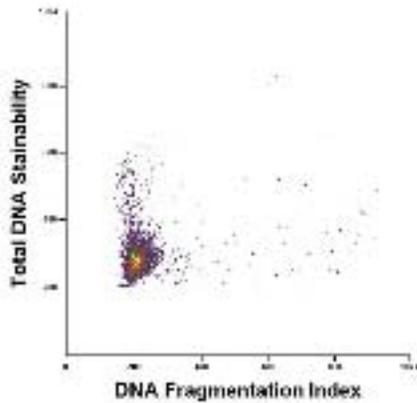
SCSA® Results

% DFI = 19%

% HDS = 21%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Good to Fair Sperm DNA Integrity**

NL 29



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 28126   | 5.83    | 4.83       | 1.21   | 12.85 | 221.04   | 89.82  |
| 28127   | 6.10    | 6.75       | 1.35   | 12.14 | 224.01   | 74.96  |
| mean    | 7.0     | 5.7        | 1.3    | 12.4  | 222.9    | 71.7   |
| std dev | 1.6     | 1.5        | 0.1    | 0.4   | 2.7      | 4.4    |

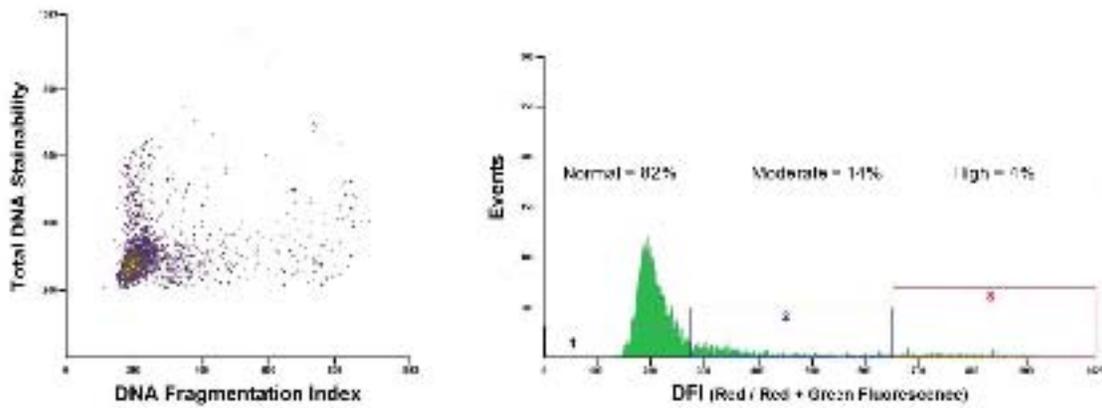
SCSA® Results

% DFI = 7%

% HDS = 12%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Excellent to Good Sperm DNA Integrity**

NL 33



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 26132   | 19.01   | 14.79      | 3.72   | 13.21 | 248.04   | 99.41  |
| 26133   | 17.19   | 13.92      | 3.87   | 15.80 | 359.04   | 101.07 |
| mean    | 17.9    | 14.1       | 3.8    | 13.0  | 250.5    | 100.2  |
| std dev | 0.9     | 1.0        | 0.1    | 0.3   | 2.1      | 1.2    |

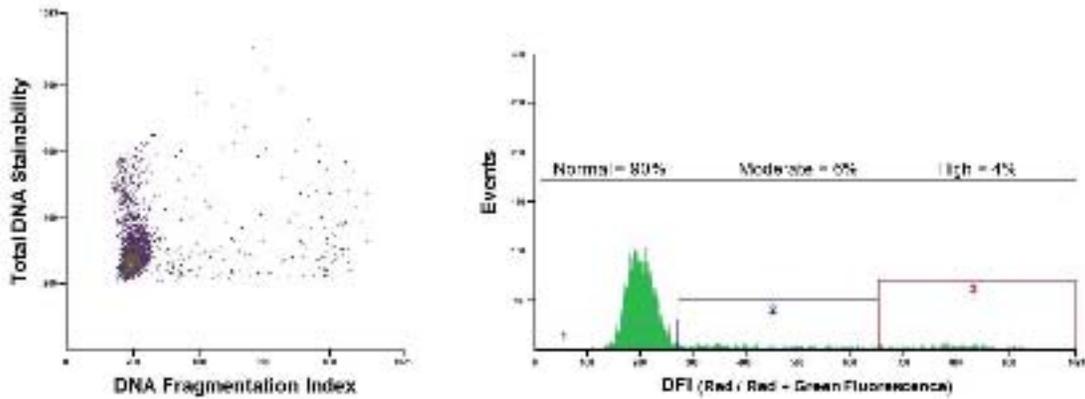
SCSA® Results

% DFI = 18%

% HDS = 13%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Good to Fair Sperm DNA Integrity**

NL 37



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 25957   | 10.18   | 5.60       | 4.23   | 21.72 | 237.27   | 109.95 |
| 25958   | 10.27   | 6.54       | 3.73   | 22.70 | 235.13   | 107.87 |
| mean    | 10.2    | 6.2        | 4.0    | 22.2  | 236.2    | 108.9  |
| std dev | 0.1     | 0.4        | 0.4    | 0.7   | 1.5      | 1.5    |

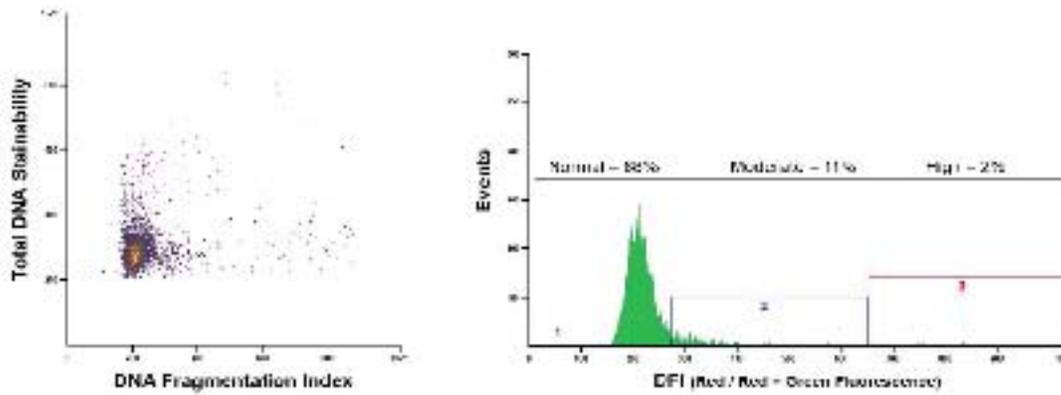
SCSA® Results

% DFI = 10%

% HDS = 22%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Excellent to Good Sperm DNA Integrity**

NL 38



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 23961   | 10.46   | 8.79       | 1.57   | 12.27 | 232.28   | 75.64  |
| 23962   | 14.57   | 12.54      | 1.73   | 11.40 | 240.56   | 82.78  |
| mean    | 12.4    | 10.7       | 1.7    | 11.9  | 238.0    | 79.3   |
| std dev | 2.8     | 2.7        | 0.0    | 0.8   | 8.0      | 4.9    |

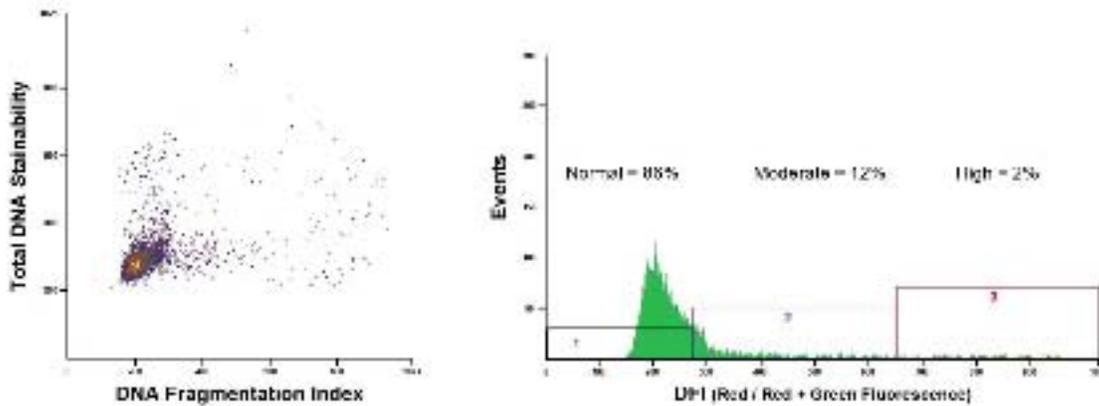
SCSA® Results

% DFI = 12%

% HDS = 12%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Excellent to Good Sperm DNA Integrity**

NL 40



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 23953   | 18.91   | 16.54      | 2.97   | 7.78  | 348.4    | 92.54  |
| 23954   | 9.22    | 6.55       | 1.67   | 8.95  | 225.17   | 77.61  |
| mean    | 13.6    | 11.5       | 2.0    | 8.1   | 287.3    | 85.0   |
| std dev | 7.8     | 7.1        | 0.5    | 0.4   | 15.7     | 10.8   |

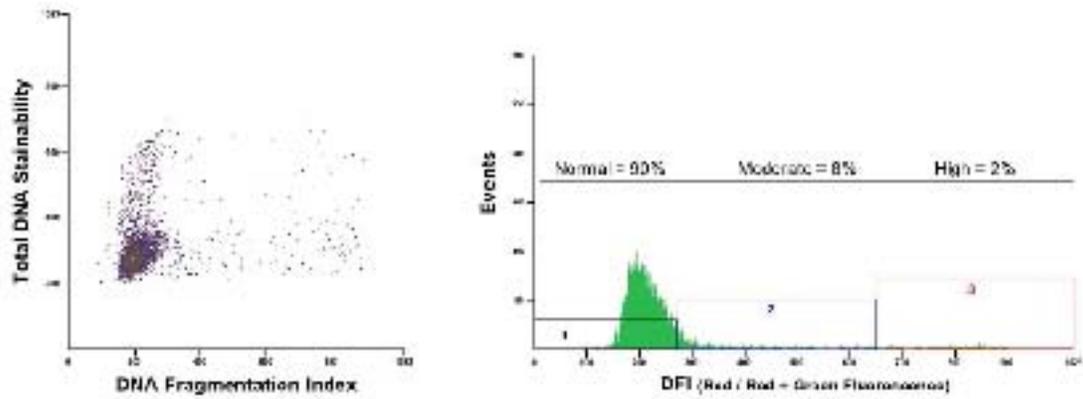
SCSA® Results

% DFI = 14%

% HDS = 8%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Excellent to Good Sperm DNA Integrity**

NL 41



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 25958   | 11.50   | 5.95       | 2.55   | 15.71 | 256.48   | 96.27  |
| 25954   | 8.88    | 5.90       | 1.98   | 17.87 | 239.3    | 77.55  |
| mean    | 10.3    | 7.9        | 2.4    | 16.7  | 232.9    | 86.9   |
| std dev | 2.1     | 1.4        | 0.6    | 1.4   | 5.0      | 13.2   |

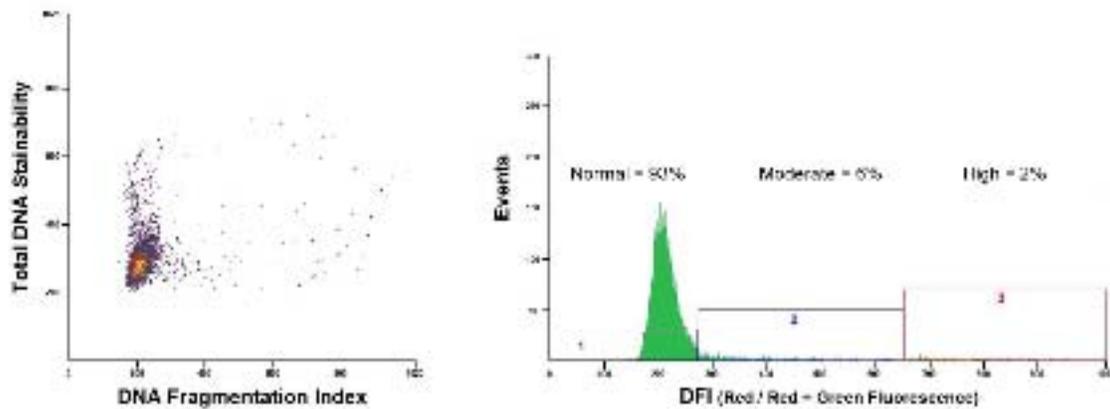
SCSA® Results

% DFI = 10%

% HDS = 17%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Excellent to Good Sperm DNA Integrity**

NL 42



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 25956   | 6.08    | 4.73       | 1.35   | 12.99 | 224.55   | 71.42  |
| 25956   | 8.45    | 6.39       | 2.05   | 11.19 | 230.95   | 88     |
| mean    | 7.3     | 5.6        | 1.7    | 12.1  | 227.8    | 79.7   |
| std dev | 1.7     | 1.2        | 0.5    | 1.3   | 4.5      | 11.7   |

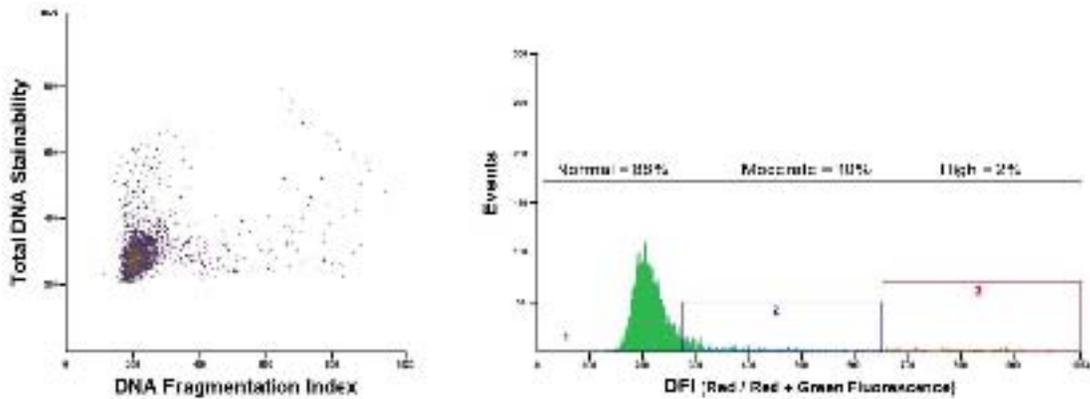
SCSA® Results

% DFI = 7%

% HDS = 12%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Excellent to Good Sperm DNA Integrity**

NL 43



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 29967   | 11.92   | 9.90       | 2.02   | 9.77  | 235.69   | 85.58  |
| 29968   | 11.08   | 9.56       | 1.52   | 11.75 | 232.9    | 82.28  |
| mean    | 11.5    | 9.7        | 1.8    | 10.8  | 234.3    | 84.4   |
| std dev | 0.6     | 0.2        | 0.4    | 1.4   | 2.0      | 3.0    |

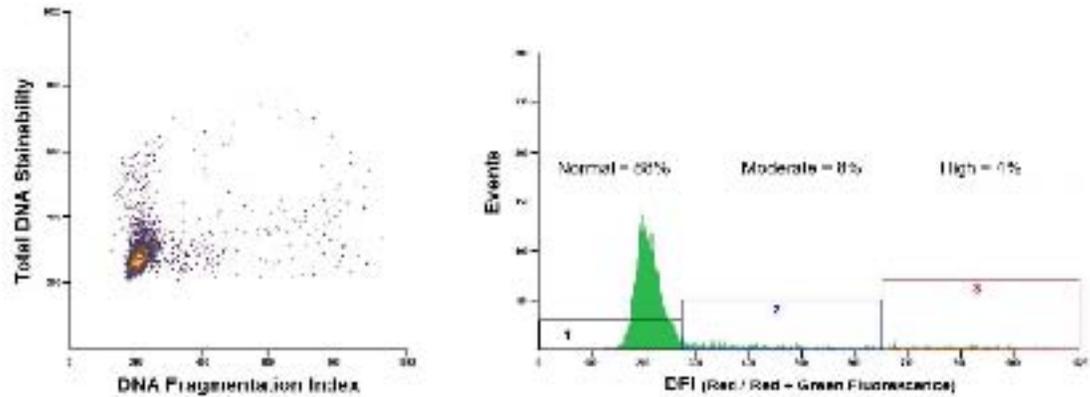
SCSA® Results

% DFI = 12%

% HDS = 11%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Excellent to Good Sperm DNA Integrity**

NL 44



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 29965   | 11.64   | 8.12       | 3.02   | 12.96 | 243.47   | 103.4  |
| 29966   | 12.40   | 8.05       | 1.54   | 13.58 | 249.21   | 111.24 |
| mean    | 12.0    | 8.1        | 2.3    | 13.1  | 242.4    | 107.3  |
| std dev | 0.5     | 0.0        | 0.3    | 0.3   | 0.9      | 5.5    |

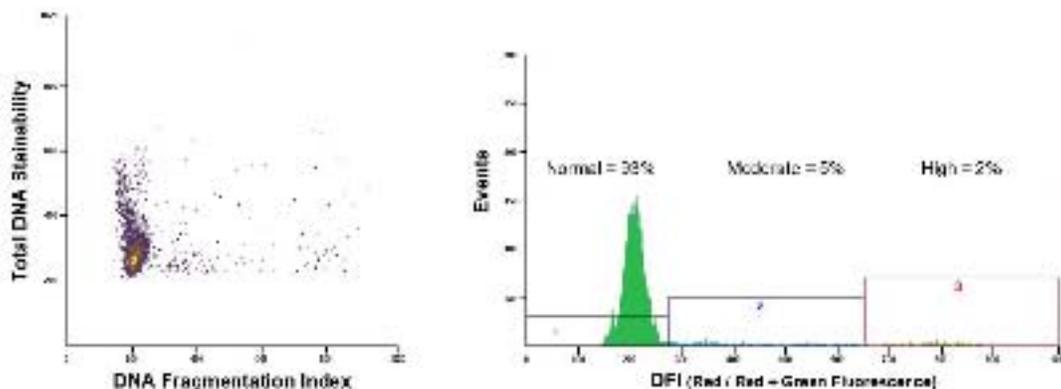
SCSA® Results

% DFI = 12%

% HDS = 13%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Excellent to Good Sperm DNA Integrity**

NL 45



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 25959   | 7.28    | 4.99       | 2.29   | 21.40 | 227.49   | 88.19  |
| 25960   | 6.59    | 4.53       | 2.04   | 20.4  | 223.02   | 84.9   |
| mean    | 6.9     | 4.6        | 2.2    | 20.8  | 225.3    | 86.5   |
| std dev | 0.5     | 0.0        | 0.2    | 0.3   | 3.2      | 2.3    |

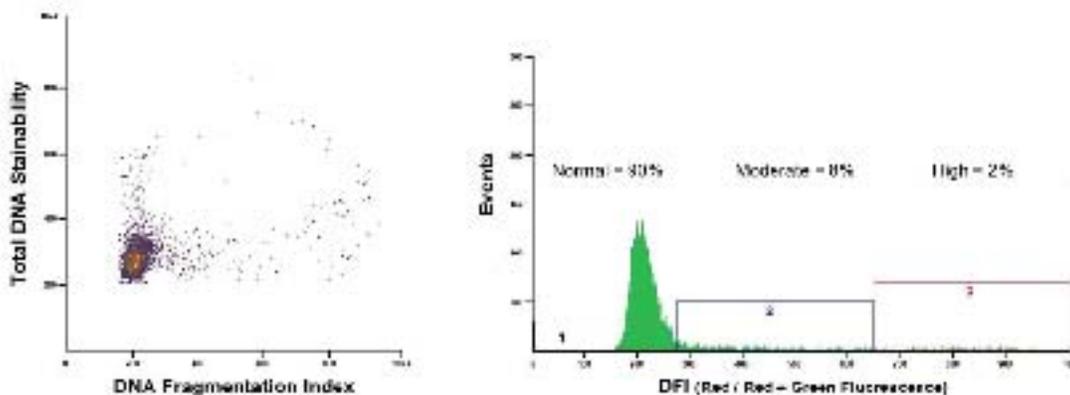
SCSA® Results

% DFI = 7%

% HDS = 21%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Excellent to Good Sperm DNA Integrity**

NL 48



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 25968   | 10.05   | 7.42       | 2.23   | 7.00  | 236.28   | 90.47  |
| 25970   | 9.44    | 7.37       | 1.86   | 9.57  | 231.99   | 84.02  |
| mean    | 9.7     | 7.7        | 2.0    | 8.3   | 234.1    | 87.2   |
| std dev | 0.4     | 0.2        | 0.3    | 1.8   | 3.0      | 4.6    |

SCSA® Results

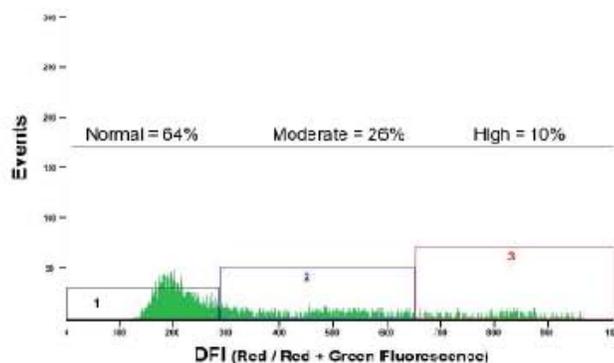
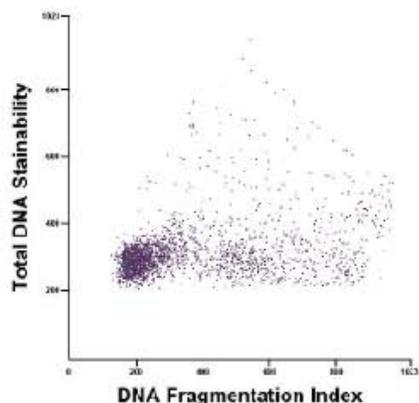
% DFI = 10%

% HDS = 8%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Excellent to Good Sperm DNA Integrity**

**PACIENTES ANTES DEL TRATAMIENTO (GRUPO II).**

**131**



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 33836   | 42.98   | 30.29      | 12.68  | 4.00  | 355.72   | 141.39 |
| 33837   | 28.83   | 21.71      | 7.12   | 8.11  | 288.79   | 134.89 |
| mean    | 35.9    | 26.0       | 9.9    | 6.1   | 322.8    | 136.1  |
| std dev | 10.0    | 6.1        | 3.9    | 2.9   | 46.6     | 4.5    |

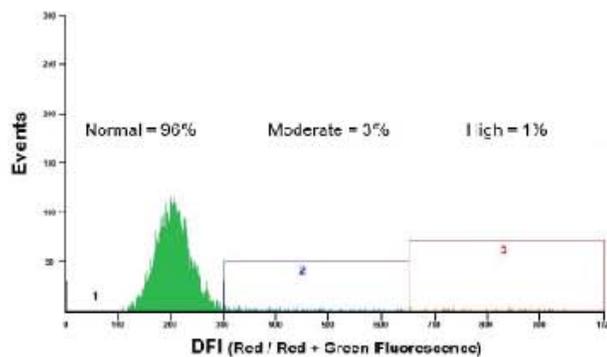
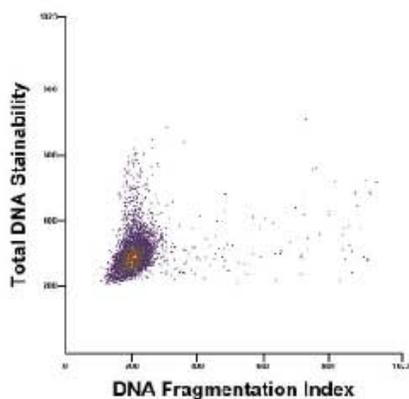
**SCSA® Results**

% DFI = 36%

% HDS = 6%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Fair to Poor Sperm DNA Integrity**

**135**



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 37407   | 3.19    | 2.23       | 0.96   | 12.14 | 213.33   | 66.49  |
| 37408   | 4.15    | 3.41       | 0.75   | 10.34 | 223.52   | 66.84  |
| mean    | 3.7     | 2.8        | 0.9    | 11.2  | 218.4    | 66.7   |
| std dev | 0.7     | 0.8        | 0.1    | 1.3   | 7.2      | 0.2    |

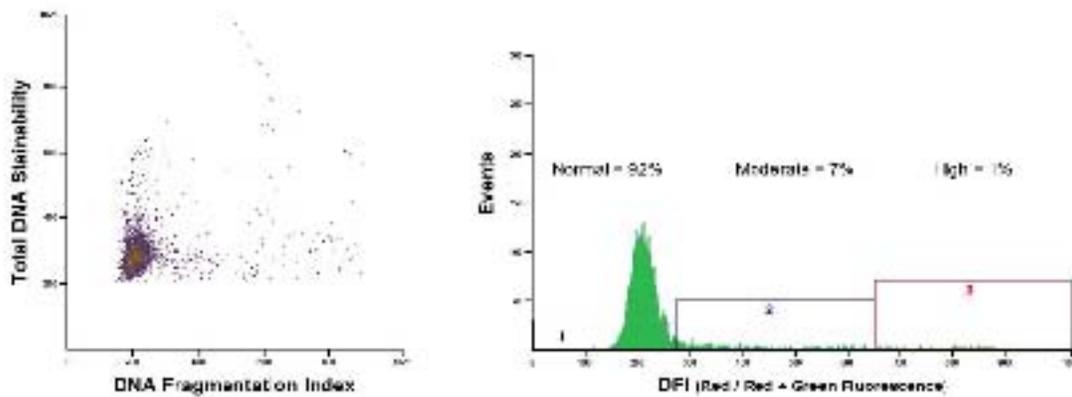
**SCSA® Results**

% DFI = 4%

% HDS = 11%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Excellent to Good Sperm DNA Integrity**

160



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 26444   | 9.28    | 7.75       | 1.53   | 11.69 | 231.81   | 80.62  |
| 35445   | 7.02    | 5.79       | 1.23   | 11.78 | 225.54   | 78.83  |
| mean    | 8.2     | 6.8        | 1.4    | 11.7  | 228.7    | 79.7   |
| std dev | 1.6     | 1.4        | 0.2    | 0.1   | 4.4      | 1.3    |

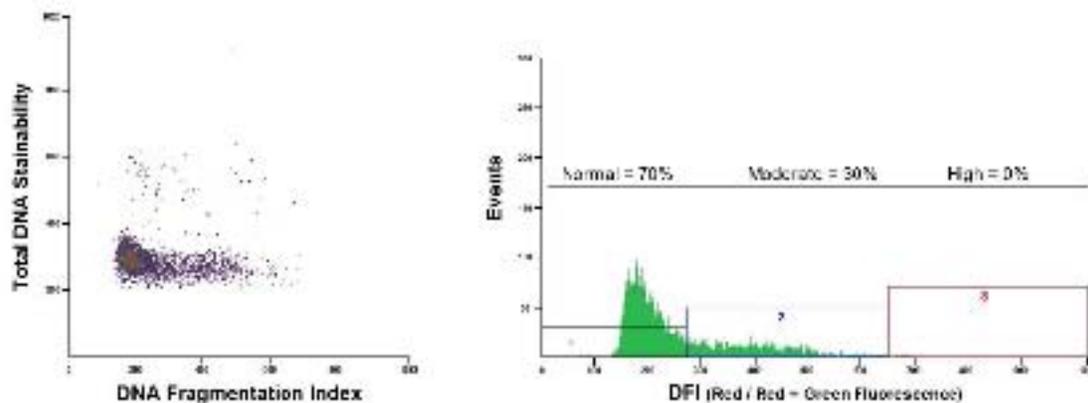
SCSA<sup>®</sup> Results

% DFI = 8%

% HDS = 12%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Excellent to Good Sperm DNA Integrity**

164



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 26287   | 28.57   | 28.27      | 0.30   | 9.85  | 251.24   | 81.48  |
| 26286   | 31.81   | 31.29      | 0.52   | 4.87  | 284.24   | 83.88  |
| mean    | 30.2    | 29.8       | 0.4    | 7.3   | 257.7    | 82.3   |
| std dev | 2.3     | 2.1        | 0.2    | 3.8   | 9.2      | 1.1    |

SCSA<sup>®</sup> Results

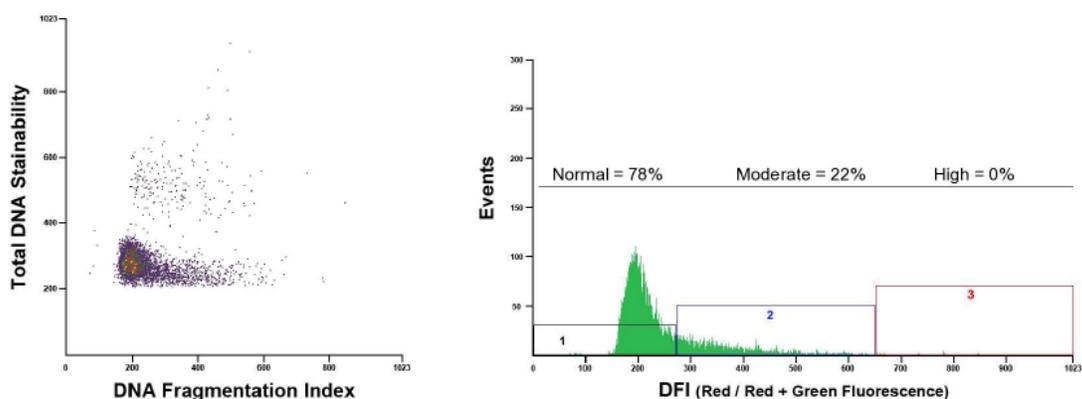
% DFI = 30%

% HDS = 7%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Fair to Poor Sperm DNA Integrity**

## PACIENTES POSTTRATAMIENTO QUIMIOTERAPIA ABVD (GRUPO III).

### ABVD 49



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 26783   | 22.46   | 22.27      | 0.19   | 6.85  | 239.66   | 56.07  |
| 26784   | 22.11   | 21.77      | 0.34   | 6.22  | 241.26   | 59.59  |
| mean    | 22.3    | 22.0       | 0.3    | 6.5   | 240.5    | 57.8   |
| std dev | 0.2     | 0.4        | 0.1    | 0.4   | 1.1      | 2.5    |

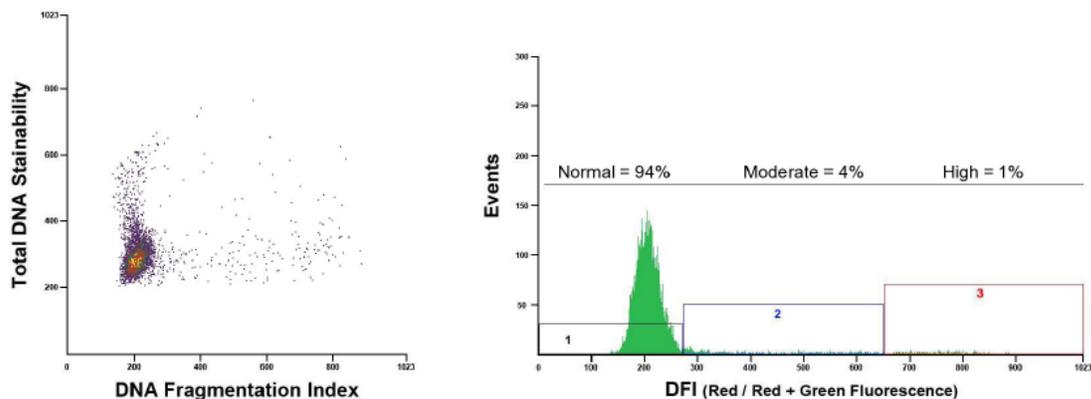
#### SCSA® Results

% DFI = 22%

% HDS = 7%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Good to Fair Sperm DNA Integrity**

### ABVD 51



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 26448   | 6.56    | 4.65       | 1.91   | 12.81 | 224.94   | 83.05  |
| 26449   | 4.47    | 3.83       | 0.64   | 12.62 | 219.36   | 55.94  |
| mean    | 5.5     | 4.2        | 1.3    | 12.7  | 222.2    | 69.5   |
| std dev | 1.5     | 0.6        | 0.9    | 0.1   | 3.9      | 19.2   |

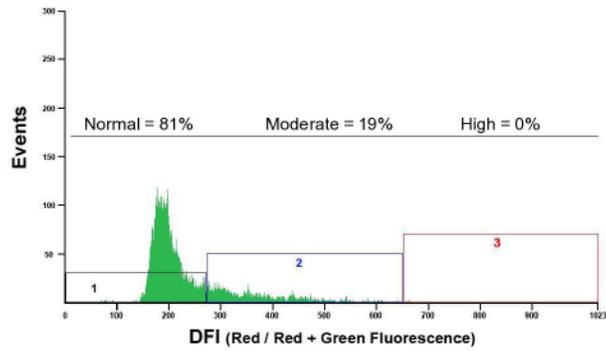
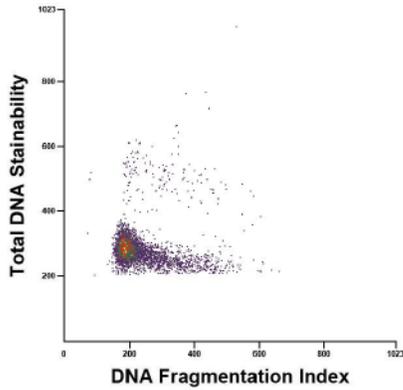
#### SCSA® Results

% DFI = 6%

% HDS = 13%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Excellent to Good Sperm DNA Integrity**

## ABVD 53



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 26289   | 20.26   | 20.23      | 0.03   | 7.14  | 229.1    | 50.2   |
| 26290   | 18.52   | 18.49      | 0.03   | 8.75  | 221.29   | 47.47  |
| mean    | 19.4    | 19.4       | 0.0    | 7.9   | 225.2    | 48.8   |
| std dev | 1.2     | 1.2        | 0.0    | 1.1   | 5.5      | 1.9    |

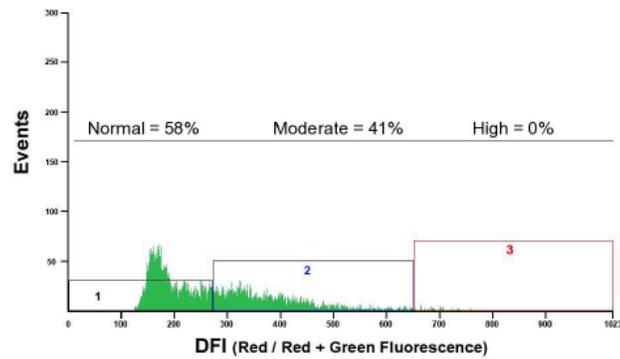
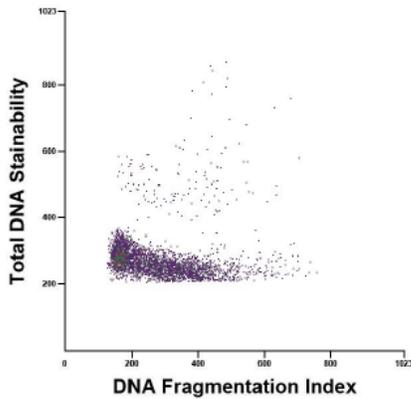
### SCSA® Results

% DFI = 19%

% HDS = 8%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Good to Fair Sperm DNA Integrity**

## ABVD 54



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 26240   | 42.77   | 42.17      | 0.60   | 6.71  | 270.27   | 65.84  |
| 26241   | 40.60   | 40.35      | 0.25   | 17.79 | 262.83   | 62.58  |
| mean    | 41.7    | 41.3       | 0.4    | 12.3  | 266.6    | 64.2   |
| std dev | 1.5     | 1.3        | 0.2    | 7.8   | 5.3      | 2.3    |

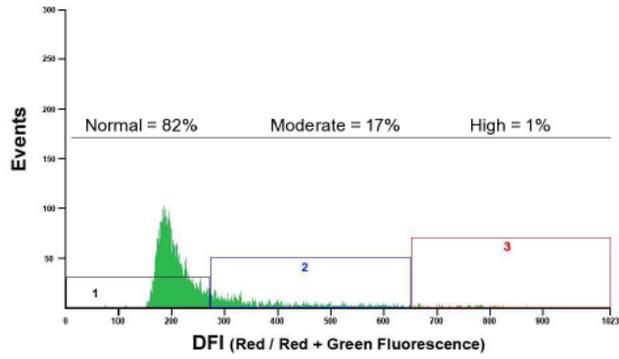
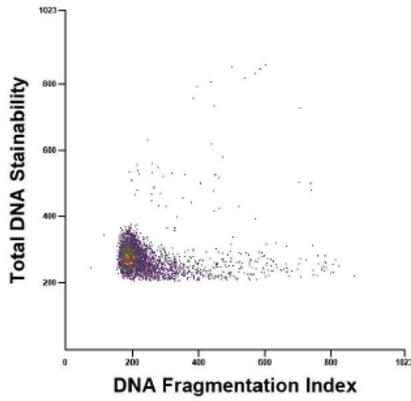
### SCSA® Results

% DFI = 42%

% HDS = 12%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Fair to Poor Sperm DNA Integrity**

**ABVD 56**



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 26785   | 18.84   | 17.52      | 1.32   | 4.97  | 238.67   | 82.21  |
| 26786   | 18.00   | 17.08      | 0.92   | 8.10  | 231.45   | 72.89  |
| mean    | 18.4    | 17.3       | 1.1    | 6.5   | 235.1    | 77.6   |
| std dev | 0.6     | 0.3        | 0.3    | 2.2   | 5.1      | 6.6    |

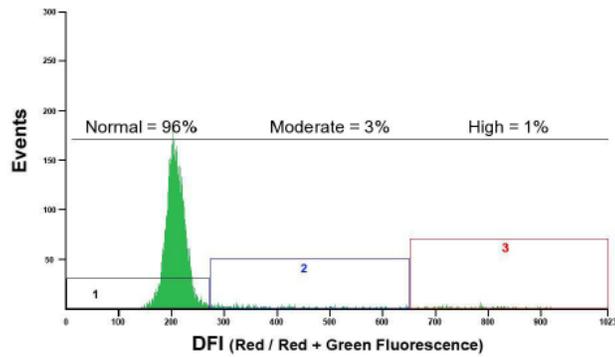
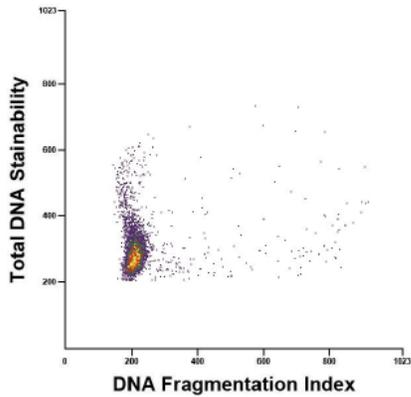
**SCSA® Results**

% DFI = 18%

% HDS = 7%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Good to Fair Sperm DNA Integrity**

**ABVD 62**



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 26442   | 4.67    | 3.26       | 1.41   | 14.50 | 220.37   | 72.8   |
| 26443   | 3.99    | 2.88       | 1.11   | 16.40 | 219.55   | 63.55  |
| mean    | 4.3     | 3.1        | 1.3    | 15.5  | 220.0    | 68.2   |
| std dev | 0.5     | 0.3        | 0.2    | 1.3   | 0.6      | 6.5    |

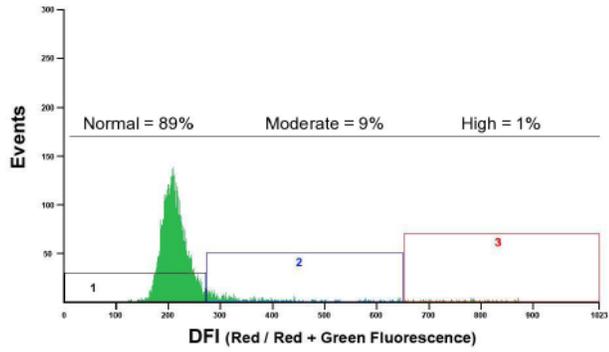
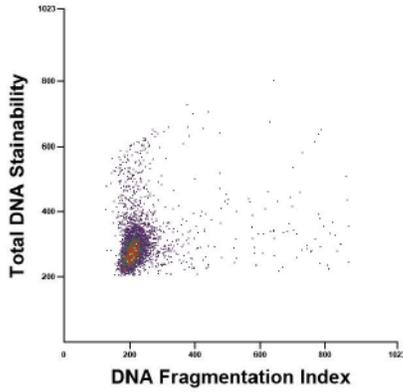
**SCSA® Results**

% DFI = 4%

% HDS = 16%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Excellent to Good Sperm DNA Integrity**

**ABVD 67**



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 26446   | 7.95    | 6.83       | 1.12   | 12.90 | 225.63   | 67.36  |
| 26447   | 13.27   | 11.70      | 1.57   | 11.90 | 240.82   | 77.8   |
| mean    | 10.6    | 9.3        | 1.3    | 12.4  | 233.2    | 72.6   |
| std dev | 3.8     | 3.4        | 0.3    | 0.7   | 10.7     | 7.4    |

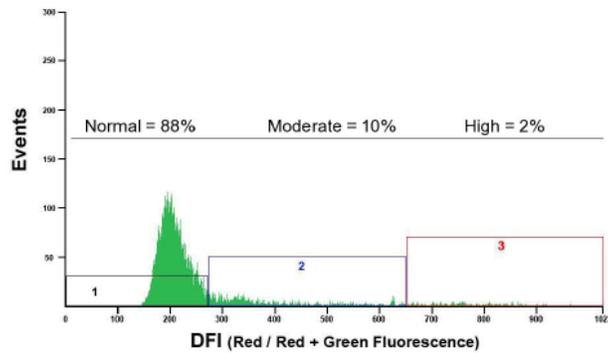
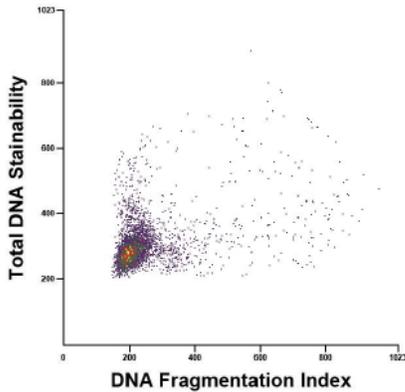
**SCSA® Results**

% DFI = 11%

% HDS = 12%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Excellent to Good Sperm DNA Integrity**

**ABVD 77**



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 26436   | 14.31   | 11.81      | 2.50   | 10.70 | 239.37   | 92.32  |
| 26437   | 9.64    | 8.59       | 1.05   | 11.36 | 231.31   | 67.79  |
| mean    | 12.0    | 10.2       | 1.8    | 11.0  | 235.3    | 80.1   |
| std dev | 3.3     | 2.3        | 1.0    | 0.5   | 5.7      | 17.3   |

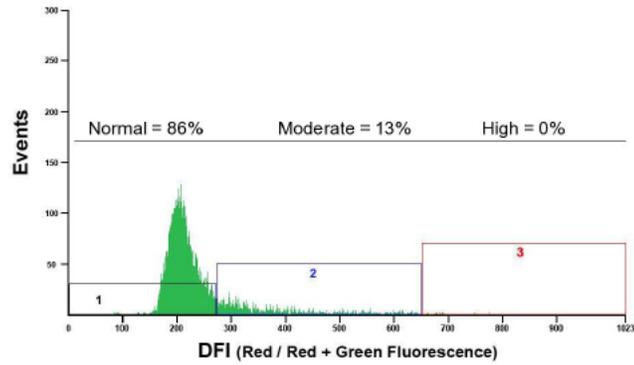
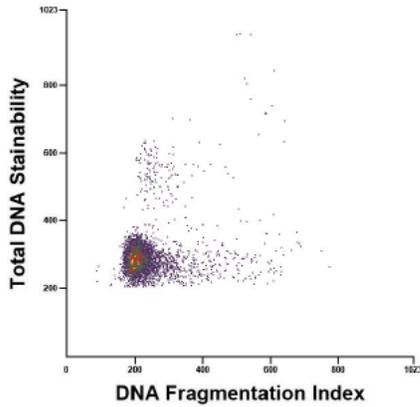
**SCSA® Results**

% DFI = 12%

% HDS = 11%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Excellent to Good Sperm DNA Integrity**

## ABVD 88



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 26246   | 14.00   | 13.81      | 0.20   | 7.90  | 231.52   | 56.81  |
| 26247   | 13.63   | 13.10      | 0.53   | 8.93  | 228.1    | 62.98  |
| mean    | 13.8    | 13.5       | 0.4    | 8.4   | 229.8    | 59.9   |
| std dev | 0.3     | 0.5        | 0.2    | 0.7   | 2.4      | 4.4    |

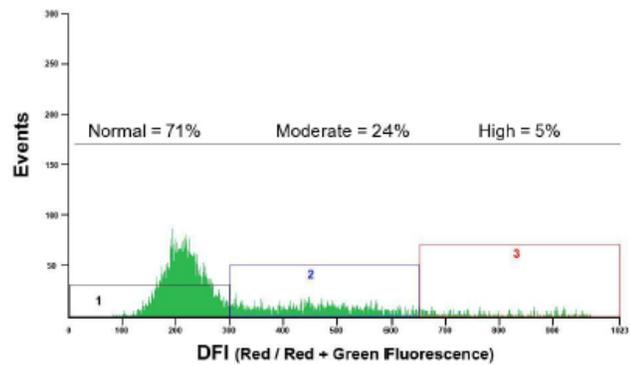
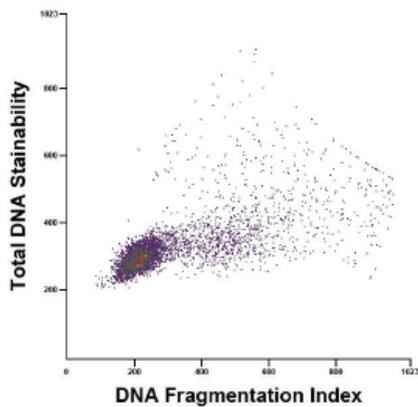
### SCSA® Results

% DFI = 14%

% HDS = 8%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Excellent to Good Sperm DNA Integrity**

## ABVD 90



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 37405   | 29.51   | 23.77      | 5.75   | 2.97  | 303.67   | 115.98 |
| 37406   | 28.39   | 23.43      | 4.96   | 3.60  | 291.99   | 114.64 |
| mean    | 29.0    | 23.6       | 5.4    | 3.3   | 297.8    | 115.3  |
| std dev | 0.8     | 0.2        | 0.6    | 0.4   | 8.3      | 0.9    |

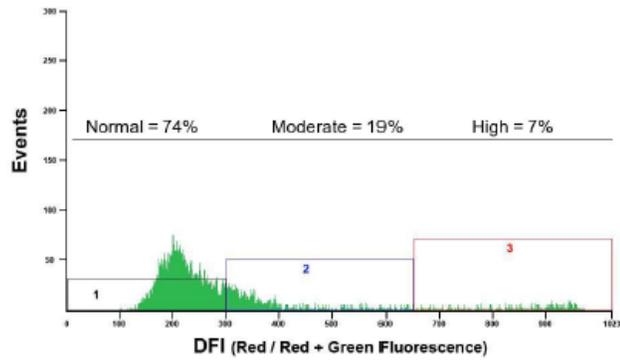
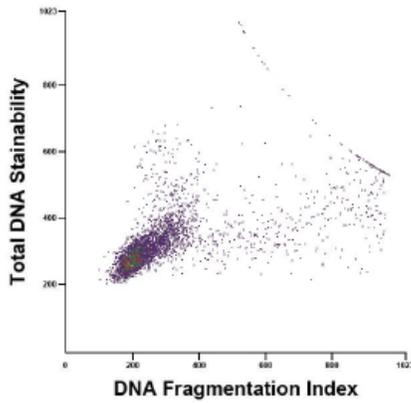
### SCSA® Results

% DFI = 29%

% HDS = 3%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Fair to Poor Sperm DNA Integrity**

## ABVD 91



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 37393   | 26.65   | 19.94      | 6.70   | 7.51  | 291.82   | 130.21 |
| 37394   | 25.19   | 18.72      | 6.47   | 8.83  | 288.56   | 129.89 |
| mean    | 25.9    | 19.3       | 6.6    | 8.2   | 290.2    | 130.1  |
| std dev | 1.0     | 0.9        | 0.2    | 0.9   | 2.3      | 0.2    |

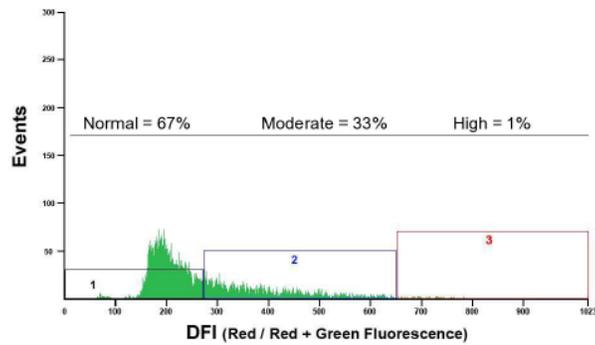
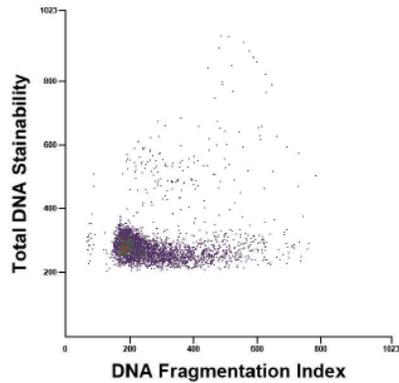
### SCSA® Results

% DFI = 26%

% HDS = 8%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Fair to Poor Sperm DNA Integrity**

## ABVD 95



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 26238   | 34.32   | 33.50      | 0.82   | 6.60  | 266.46   | 75.8   |
| 26239   | 32.03   | 31.57      | 0.46   | 7.95  | 259.85   | 70.97  |
| mean    | 33.2    | 32.5       | 0.6    | 7.3   | 263.2    | 73.4   |
| std dev | 1.6     | 1.4        | 0.3    | 1.0   | 4.7      | 3.4    |

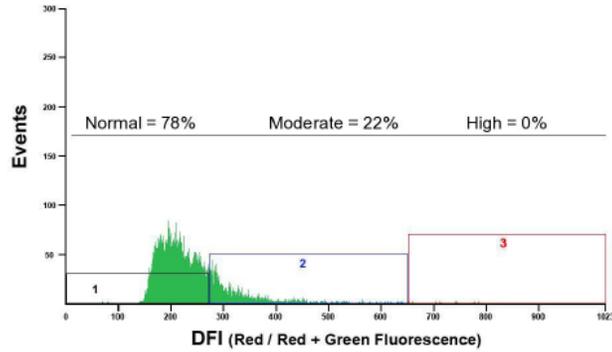
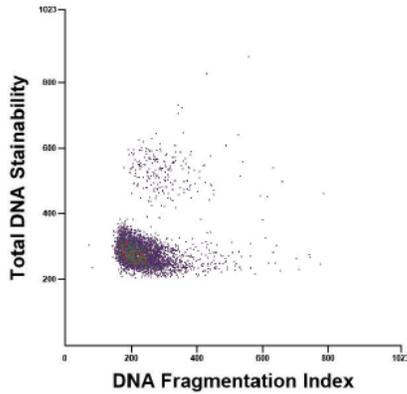
### SCSA® Results

% DFI = 33%

% HDS = 7%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Fair to Poor Sperm DNA Integrity**

## ABVD 98



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 26248   | 21.18   | 20.96      | 0.22   | 9.81  | 234.93   | 49.01  |
| 26249   | 22.90   | 22.76      | 0.15   | 10.83 | 237.76   | 48.09  |
| mean    | 22.0    | 21.9       | 0.2    | 10.3  | 236.3    | 48.6   |
| std dev | 1.2     | 1.3        | 0.0    | 0.7   | 2.0      | 0.7    |

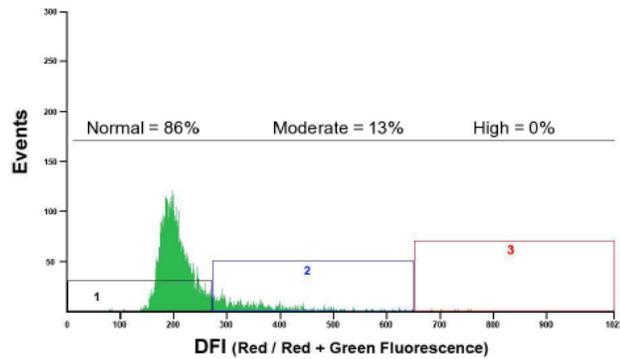
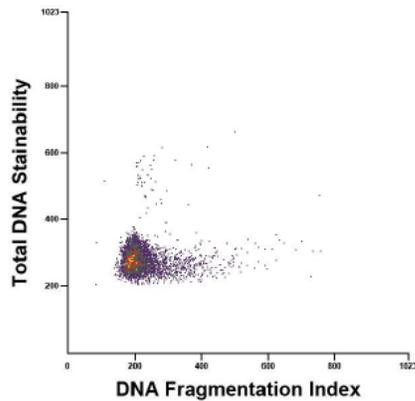
### SCSA® Results

% DFI = 22%

% HDS = 10%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Good to Fair Sperm DNA Integrity**

## ABVD 112



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 26236   | 12.79   | 12.62      | 0.17   | 4.20  | 221.25   | 46.92  |
| 26237   | 14.42   | 14.23      | 0.19   | 4.77  | 223.68   | 46.96  |
| mean    | 13.6    | 13.4       | 0.2    | 4.5   | 222.5    | 46.9   |
| std dev | 1.2     | 1.1        | 0.0    | 0.4   | 1.7      | 0.0    |

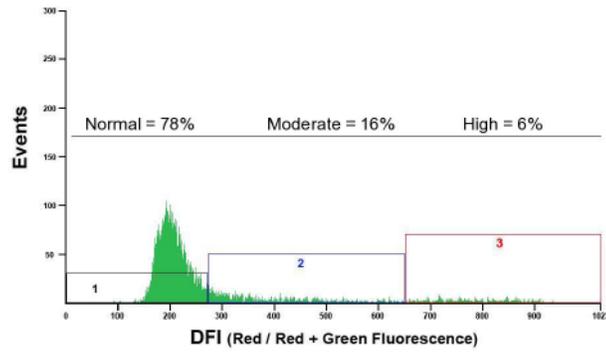
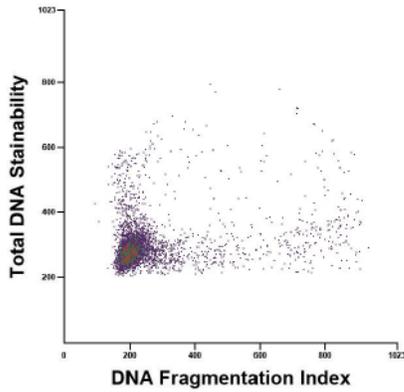
### SCSA® Results

% DFI = 14%

% HDS = 5%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Excellent to Good Sperm DNA Integrity**

## ABVD 120



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 26434   | 19.64   | 14.11      | 5.53   | 11.11 | 259.62   | 117.56 |
| 26435   | 24.30   | 18.03      | 6.26   | 11.86 | 273.81   | 118.61 |
| mean    | 22.0    | 16.1       | 5.9    | 11.5  | 266.7    | 118.1  |
| std dev | 3.3     | 2.8        | 0.5    | 0.5   | 10.0     | 0.7    |

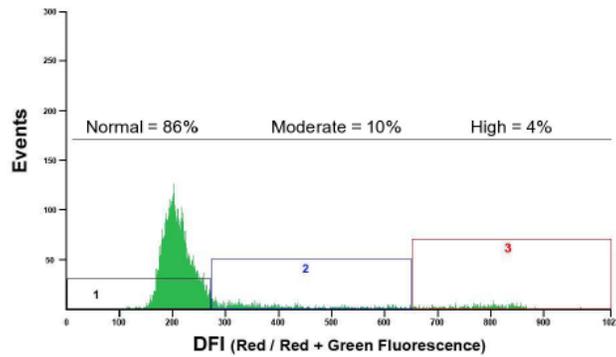
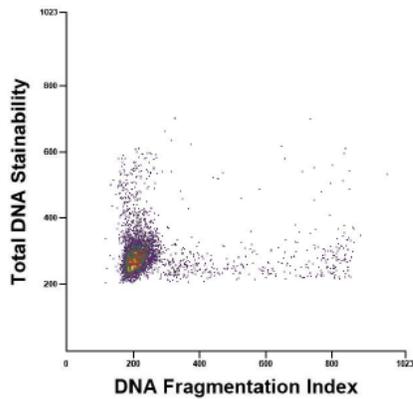
### SCSA® Results

% DFI = 22%

% HDS = 12%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Good to Fair Sperm DNA Integrity**

## ABVD 128



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 26432   | 12.84   | 8.59       | 4.25   | 10.87 | 246.95   | 104.28 |
| 26433   | 15.04   | 11.00      | 4.03   | 10.75 | 254.72   | 106.15 |
| mean    | 13.9    | 9.8        | 4.1    | 10.8  | 250.8    | 105.2  |
| std dev | 1.6     | 1.7        | 0.2    | 0.1   | 5.5      | 1.3    |

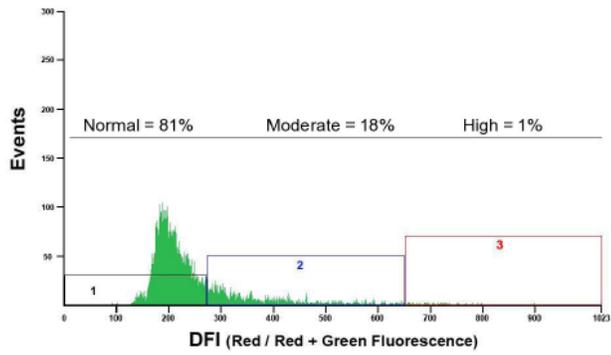
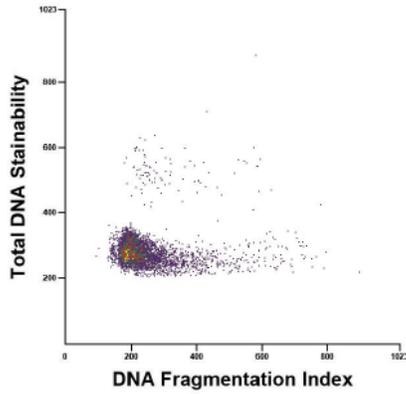
### SCSA® Results

% DFI = 14%

% HDS = 11%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Excellent to Good Sperm DNA Integrity**

**ABVD 142**



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 26781   | 20.77   | 19.96      | 0.81   | 4.67  | 240.06   | 70.19  |
| 26782   | 17.29   | 16.59      | 0.70   | 4.57  | 233.58   | 68.7   |
| mean    | 19.0    | 18.3       | 0.8    | 4.6   | 236.8    | 69.4   |
| std dev | 2.5     | 2.4        | 0.1    | 0.1   | 4.6      | 1.1    |

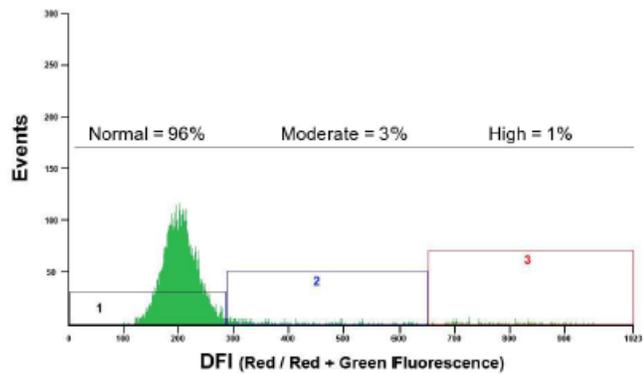
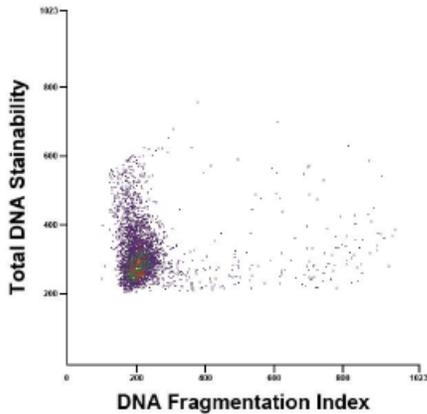
**SCSA® Results**

% DFI = 19%

% HDS = 5%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Good to Fair Sperm DNA Integrity**

**AVBD 148**



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 33838   | 5.94    | 3.94       | 2.00   | 23.30 | 220.52   | 87.27  |
| 33839   | 2.93    | 2.16       | 0.77   | 23.41 | 214.81   | 55.94  |
| mean    | 4.4     | 3.1        | 1.4    | 23.4  | 217.7    | 71.6   |
| std dev | 2.1     | 1.3        | 0.9    | 0.1   | 4.0      | 22.2   |

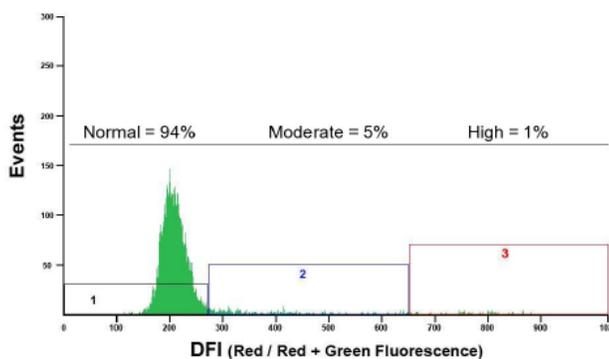
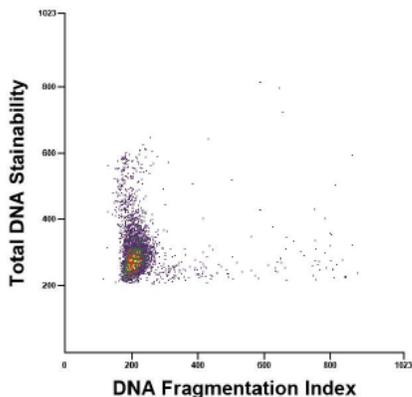
**SCSA® Results**

% DFI = 4%

% HDS = 23%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Excellent to Good Sperm DNA Integrity**

## ABVD 176



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 26430   | 5.39    | 4.31       | 1.08   | 16.62 | 219.38   | 63.42  |
| 26431   | 6.22    | 4.81       | 1.42   | 16.14 | 224.94   | 68.97  |
| mean    | 5.8     | 4.6        | 1.3    | 16.4  | 222.2    | 66.2   |
| std dev | 0.6     | 0.4        | 0.2    | 0.3   | 3.9      | 3.9    |

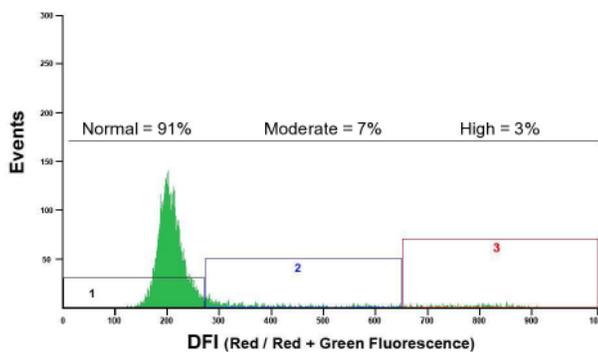
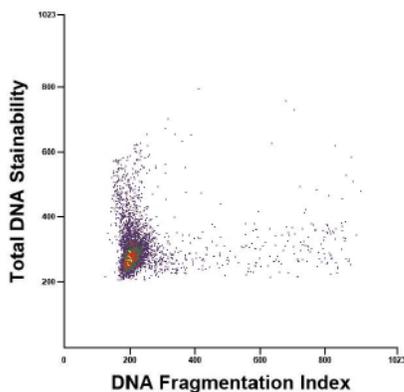
### SCSA® Results

% DFI = 6%

% HDS = 16%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Excellent to Good Sperm DNA Integrity**

## ABVD 178



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 26440   | 9.74    | 6.96       | 2.78   | 16.65 | 232.94   | 94.21  |
| 26441   | 8.97    | 6.30       | 2.67   | 16.00 | 231.26   | 93.43  |
| mean    | 9.4     | 6.6        | 2.7    | 16.3  | 232.1    | 93.8   |
| std dev | 0.5     | 0.5        | 0.1    | 0.5   | 1.2      | 0.6    |

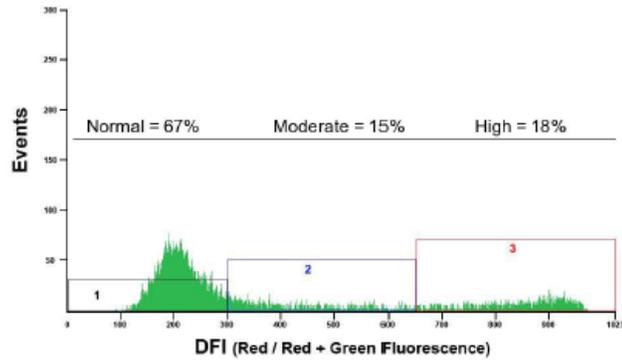
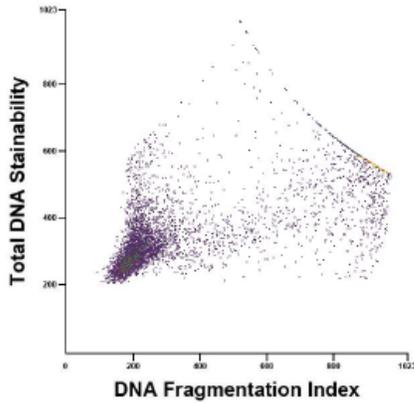
### SCSA® Results

% DFI = 9%

% HDS = 16%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Excellent to Good Sperm DNA Integrity**

## ABVD 183



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 37401   | 32.31   | 14.62      | 17.69  | 16.50 | 353.23   | 131.39 |
| 37402   | 34.39   | 16.01      | 18.38  | 15.23 | 364.74   | 131.1  |
| mean    | 33.4    | 15.3       | 18.0   | 15.9  | 359.0    | 131.2  |
| std dev | 1.5     | 1.0        | 0.5    | 0.9   | 8.1      | 0.2    |

### SCSA® Results

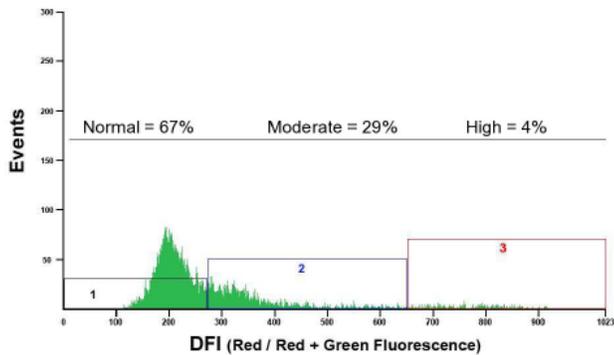
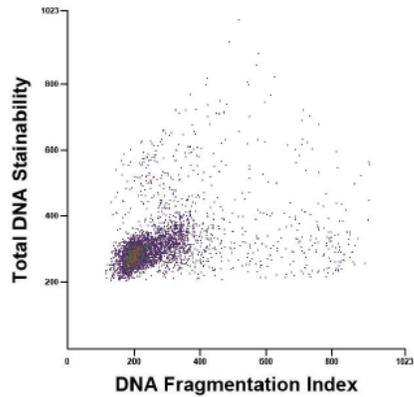
% DFI = 33%

% HDS = 16%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Fair to Poor Sperm DNA Integrity**

## PACIENTES POSTTRATAMIENTO QUE INCLUYO MOPP

### MOPP 3



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 26142   | 32.02   | 28.20      | 3.81   | 7.27  | 267.89   | 98.8   |
| 26143   | 34.28   | 30.05      | 4.22   | 7.41  | 276.75   | 105.31 |
| mean    | 33.2    | 29.1       | 4.0    | 7.3   | 272.3    | 102.1  |
| std dev | 1.6     | 1.3        | 0.3    | 0.1   | 6.3      | 4.6    |

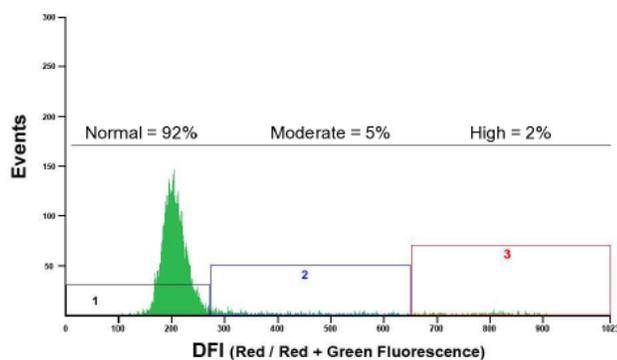
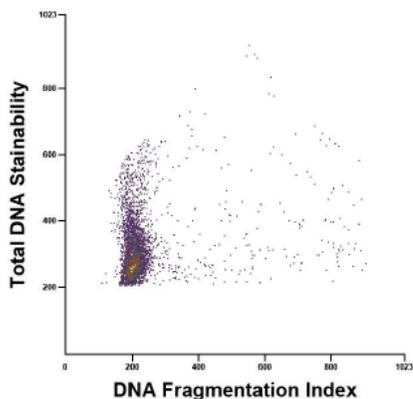
### SCSA® Results

% DFI = 33%

% HDS = 7%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Fair to Poor Sperm DNA Integrity**

## MOPP 6



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 26146   | 7.46    | 5.38       | 2.08   | 26.42 | 226.21   | 87.84  |
| 26147   | 8.33    | 5.49       | 2.84   | 26.46 | 235.09   | 93.69  |
| mean    | 7.9     | 5.4        | 2.5    | 26.4  | 230.7    | 90.8   |
| std dev | 0.6     | 0.1        | 0.5    | 0.0   | 6.3      | 4.1    |

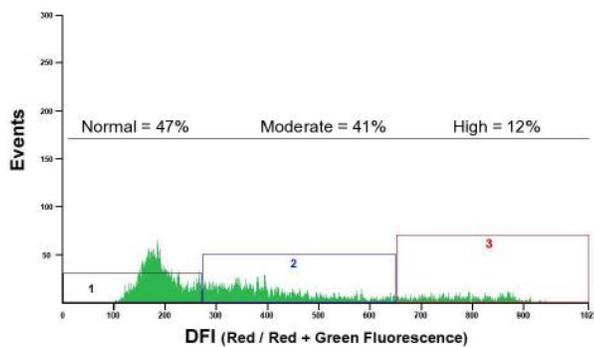
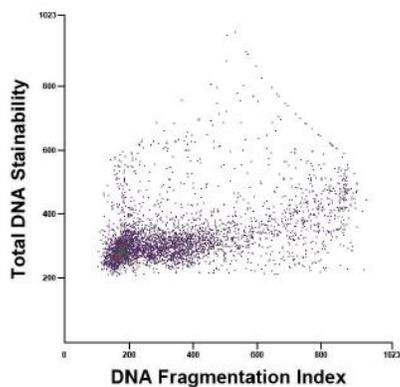
### SCSA® Results

% DFI = 8%

% HDS = 26%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Excellent to Good Sperm DNA Integrity**

## MOPP 7



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 26144   | 51.33   | 39.19      | 12.14  | 9.59  | 342.43   | 120.23 |
| 26145   | 54.68   | 41.85      | 12.84  | 9.89  | 358.61   | 119.72 |
| mean    | 53.0    | 40.5       | 12.5   | 9.7   | 350.5    | 120.0  |
| std dev | 2.4     | 1.9        | 0.5    | 0.2   | 11.4     | 0.4    |

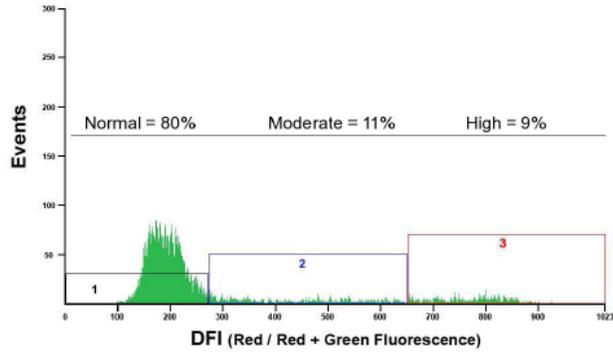
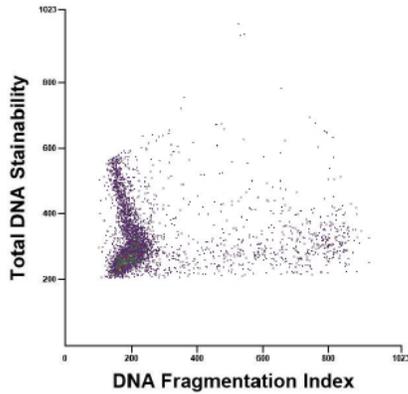
### SCSA® Results

% DFI = 53%

% HDS = 10%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Very Poor Sperm DNA integrity**

## MOOP 14



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 26136   | 18.99   | 10.18      | 8.81   | 27.01 | 265.07   | 126.08 |
| 26137   | 20.54   | 11.48      | 9.06   | 25.97 | 274.51   | 129.42 |
| mean    | 19.8    | 10.8       | 8.9    | 26.5  | 269.8    | 127.8  |
| std dev | 1.1     | 0.9        | 0.2    | 0.7   | 6.7      | 2.4    |

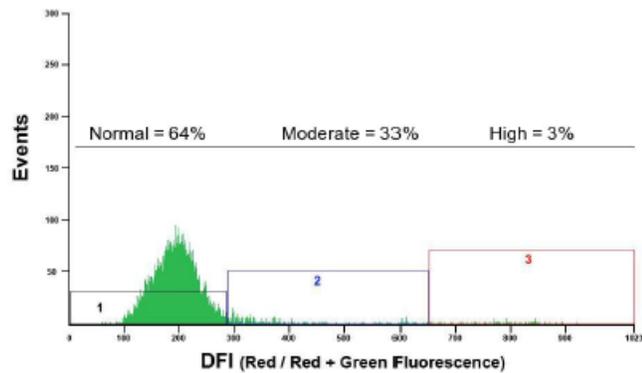
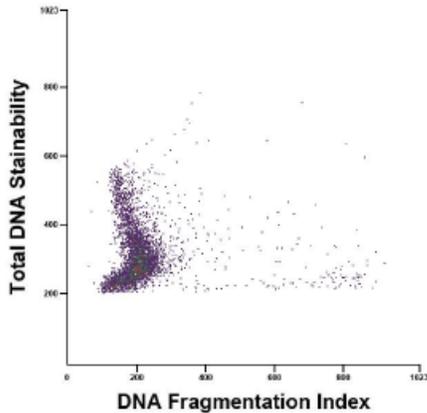
### SCSA® Results

% DFI = 20%

% HDS = 27%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Good to Fair Sperm DNA Integrity**

## MOPP 16



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 33828   | 6.46    | 4.56       | 1.90   | 28.77 | 210.83   | 88.15  |
| 33829   | 66.34   | 61.83      | 4.51   | 15.97 | 339.67   | 107.44 |
| mean    | 36.4    | 33.2       | 3.2    | 22.4  | 275.3    | 97.8   |
| std dev | 42.3    | 40.5       | 1.8    | 9.1   | 91.1     | 13.6   |

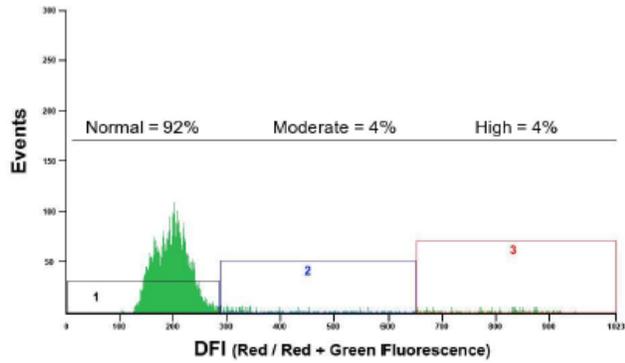
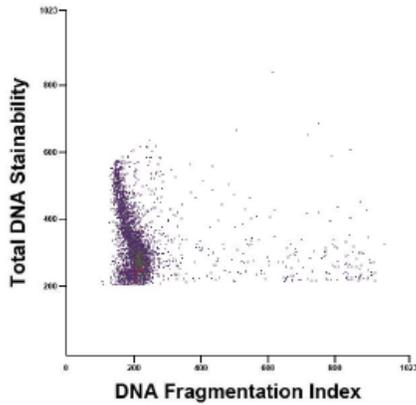
### SCSA® Results

% DFI = 36%

% HDS = 22%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Fair to Poor Sperm DNA Integrity**

## MOPP 19



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 33826   | 7.22    | 4.05       | 3.17   | 34.43 | 223.28   | 104.43 |
| 33827   | 8.74    | 4.09       | 4.65   | 38.58 | 232.27   | 116.12 |
| mean    | 8.0     | 4.1        | 3.9    | 36.5  | 227.8    | 110.3  |
| std dev | 1.1     | 0.0        | 1.0    | 2.9   | 6.4      | 8.3    |

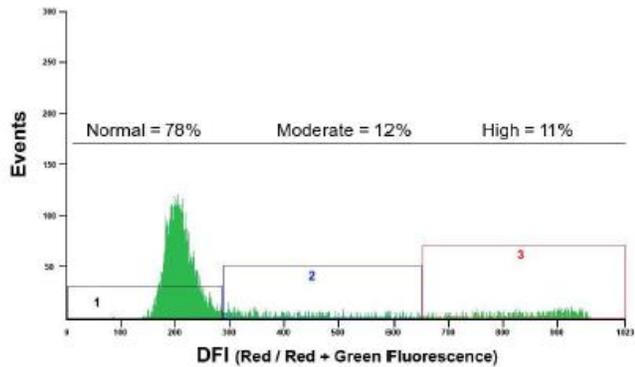
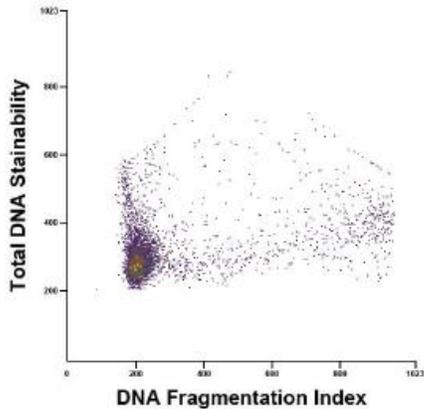
### SCSA® Results

% DFI = 8%

% HDS = 37%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Excellent to Good Sperm DNA Integrity**

## MOPP 29



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 33834   | 19.13   | 9.26       | 9.86   | 14.89 | 289.19   | 134.24 |
| 33835   | 25.34   | 13.94      | 11.41  | 12.57 | 311.01   | 132.82 |
| mean    | 22.2    | 11.6       | 10.6   | 13.7  | 300.1    | 133.5  |
| std dev | 4.4     | 3.3        | 1.1    | 1.6   | 15.4     | 1.0    |

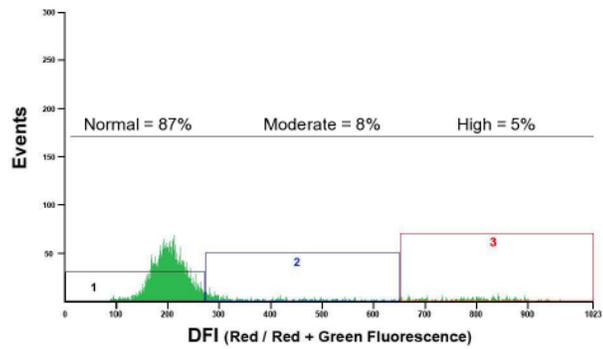
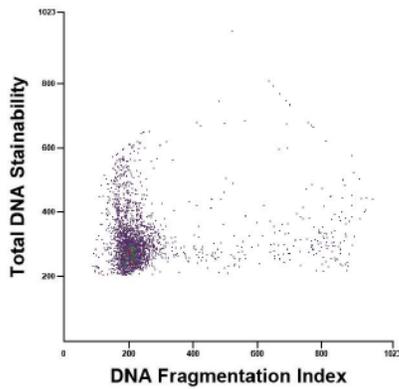
### SCSA® Results

% DFI = 22%

% HDS = 14%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Good to Fair Sperm DNA Integrity**

## MOPP 59



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 26148   | 13.98   | 8.21       | 5.77   | 21.23 | 249.36   | 124.43 |
| 26149   | 12.33   | 7.51       | 4.82   | 22.74 | 240.52   | 124.2  |
| mean    | 13.2    | 7.9        | 5.3    | 22.0  | 244.9    | 124.3  |
| std dev | 1.2     | 0.5        | 0.7    | 1.1   | 6.3      | 0.2    |

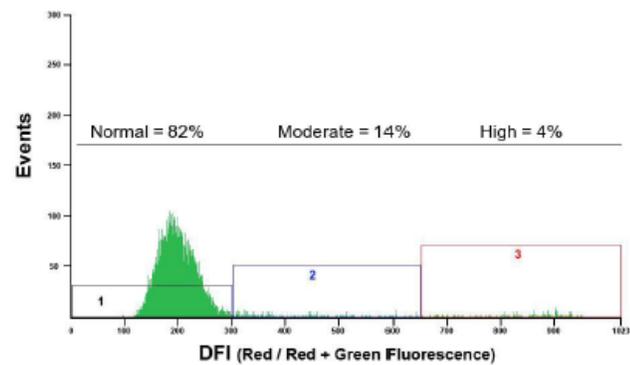
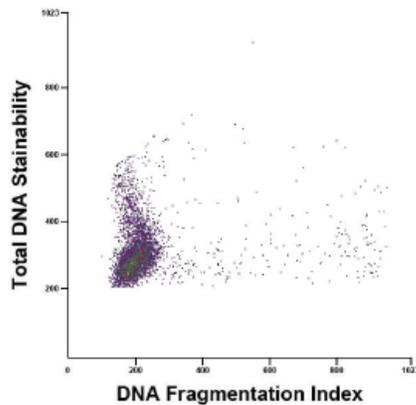
### SCSA® Results

% DFI = 13%

% HDS = 22%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Excellent to Good Sperm DNA Integrity**

## MOPP 81



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 33814   | 6.03    | 3.29       | 2.73   | 20.34 | 221.2    | 101.65 |
| 33815   | 29.73   | 24.70      | 5.03   | 10.07 | 286.96   | 112.69 |
| mean    | 17.9    | 14.0       | 3.9    | 15.2  | 254.1    | 107.2  |
| std dev | 16.8    | 15.1       | 1.6    | 7.3   | 46.5     | 7.8    |

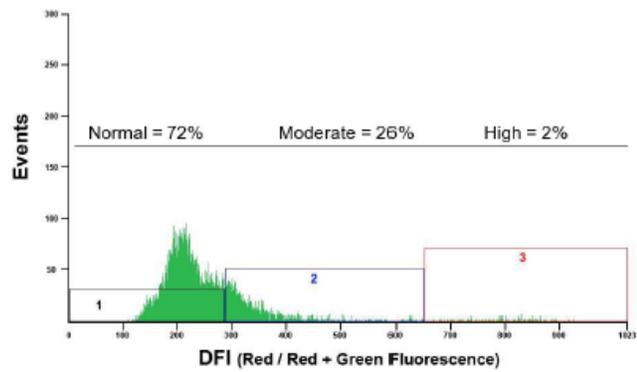
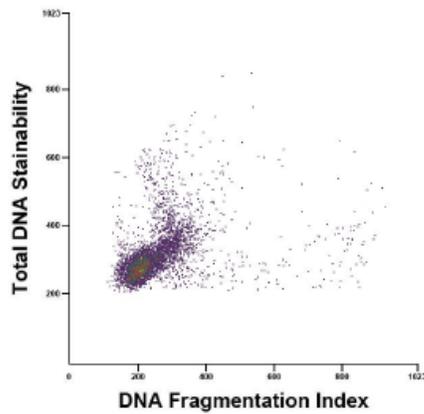
### SCSA® Results

% DFI = 18%

% HDS = 15%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Good to Fair Sperm DNA Integrity**

## MOPP 105



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 33830   | 23.59   | 21.93      | 1.66   | 10.52 | 251.39   | 77.24  |
| 33831   | 32.72   | 29.65      | 3.07   | 6.43  | 277.27   | 97.06  |
| mean    | 28.2    | 25.8       | 2.4    | 8.5   | 264.3    | 87.2   |
| std dev | 6.5     | 5.5        | 1.0    | 2.9   | 18.3     | 14.0   |

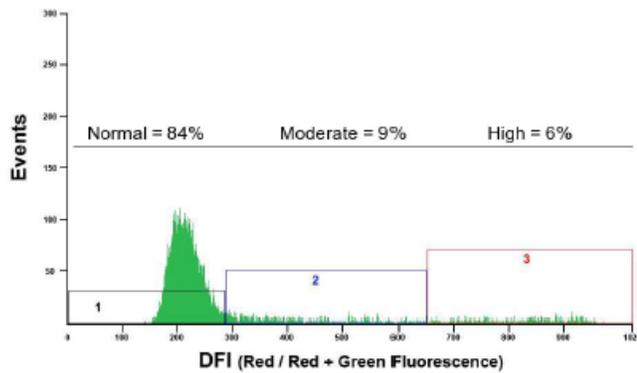
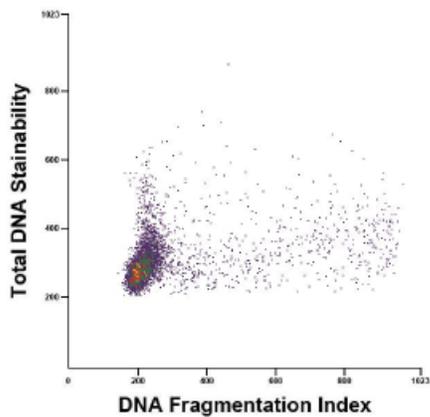
### SCSA® Results

% DFI = 28%

% HDS = 9%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Fair to Poor Sperm DNA Integrity**

## MOPP 106



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 33822   | 16.38   | 9.88       | 6.50   | 10.55 | 273.51   | 125.58 |
| 33823   | 15.16   | 8.88       | 6.28   | 11.99 | 268.12   | 124.86 |
| mean    | 15.8    | 9.4        | 6.4    | 11.3  | 270.8    | 125.2  |
| std dev | 0.9     | 0.7        | 0.2    | 1.0   | 3.8      | 0.5    |

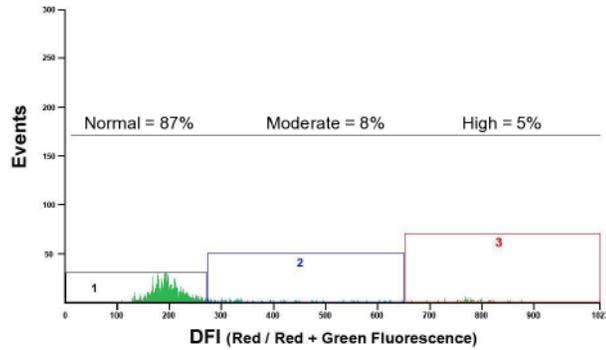
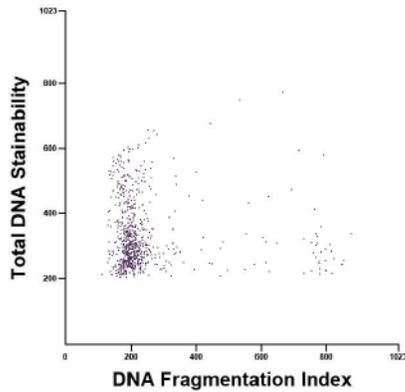
### SCSA® Results

% DFI = 16%

% HDS = 11%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Good to Fair Sperm DNA Integrity**

## MOPP 158



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 26140   | 12.55   | 8.09       | 4.46   | 32.08 | 236.26   | 119.6  |
| 26141   | 13.36   | 8.26       | 5.10   | 28.10 | 235.78   | 137.83 |
| mean    | 13.0    | 8.2        | 4.8    | 30.1  | 236.0    | 128.7  |
| std dev | 0.6     | 0.1        | 0.5    | 2.8   | 0.3      | 12.9   |

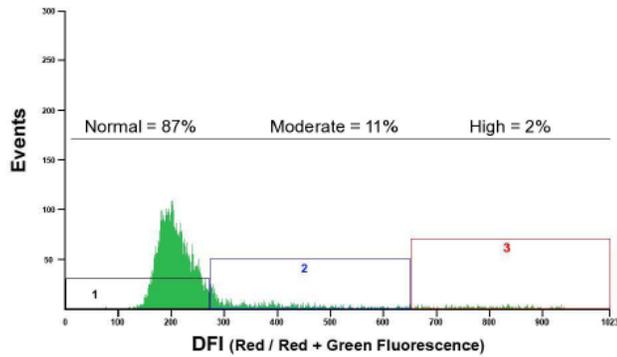
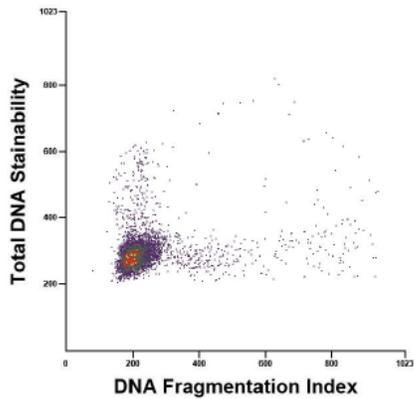
### SCSA® Results

% DFI = 13%

% HDS = 30%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Excellent to Good Sperm DNA Integrity**

## MOPP 169



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 26150   | 13.15   | 10.68      | 2.46   | 7.74  | 236.73   | 94.07  |
| 26151   | 13.21   | 10.99      | 2.22   | 7.82  | 235.32   | 86.14  |
| mean    | 13.2    | 10.8       | 2.3    | 7.8   | 236.0    | 90.1   |
| std dev | 0.0     | 0.2        | 0.2    | 0.1   | 1.0      | 5.6    |

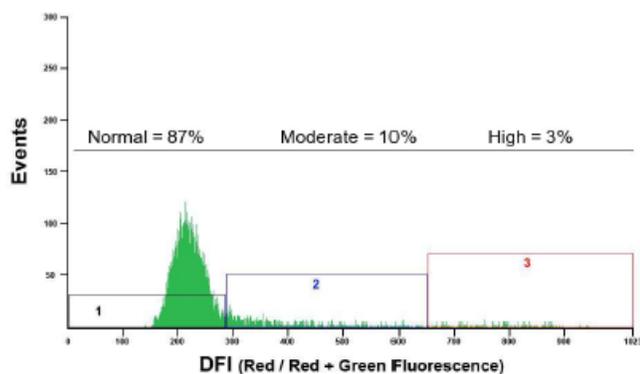
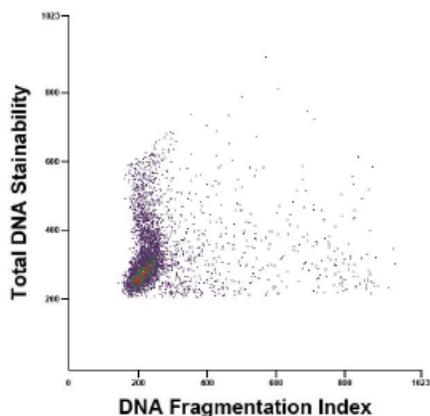
### SCSA® Results

% DFI = 13%

% HDS = 8%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Excellent to Good Sperm DNA Integrity**

## MOPP 170



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 33824   | 14.21   | 11.16      | 3.04   | 22.70 | 254.33   | 94.01  |
| 33825   | 11.89   | 9.35       | 2.55   | 22.79 | 241.46   | 92.08  |
| mean    | 13.1    | 10.3       | 2.8    | 22.7  | 247.9    | 93.0   |
| std dev | 1.6     | 1.3        | 0.3    | 0.1   | 9.1      | 1.4    |

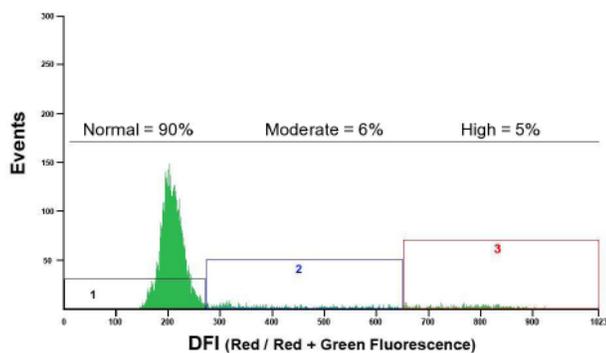
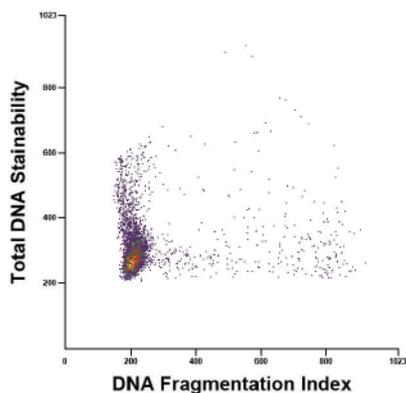
### SCSA® Results

% DFI = 13%

% HDS = 23%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Excellent to Good Sperm DNA Integrity**

## MOPP 171



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 26138   | 9.47    | 5.50       | 3.97   | 20.32 | 240.31   | 105.73 |
| 26139   | 11.52   | 6.44       | 5.08   | 19.52 | 254.57   | 114.14 |
| mean    | 10.5    | 6.0        | 4.5    | 19.9  | 247.4    | 109.9  |
| std dev | 1.4     | 0.7        | 0.8    | 0.6   | 10.1     | 5.9    |

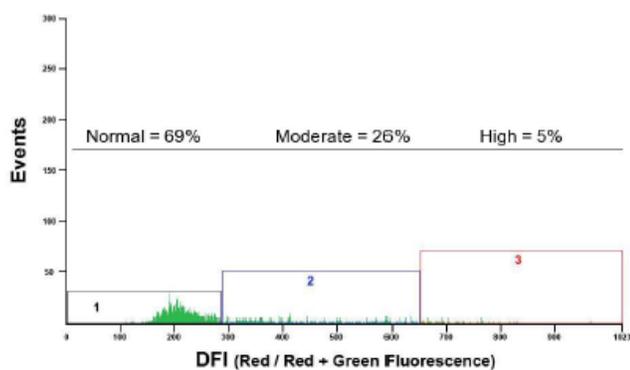
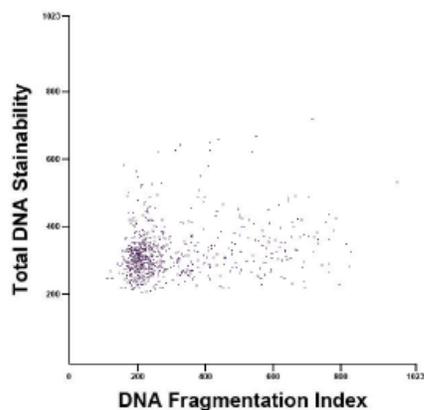
### SCSA® Results

% DFI = 11%

% HDS = 20%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Excellent to Good Sperm DNA Integrity**

## MOPP 172



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 33844   | 31.04   | 25.98      | 5.06   | 15.59 | 297.98   | 130.74 |
| 33845   | 31.04   | 25.98      | 5.06   | 15.59 | 297.98   | 130.74 |
| mean    | 31.0    | 26.0       | 5.1    | 15.6  | 298.0    | 130.7  |
| std dev | 0.0     | 0.0        | 0.0    | 0.0   | 0.0      | 0.0    |

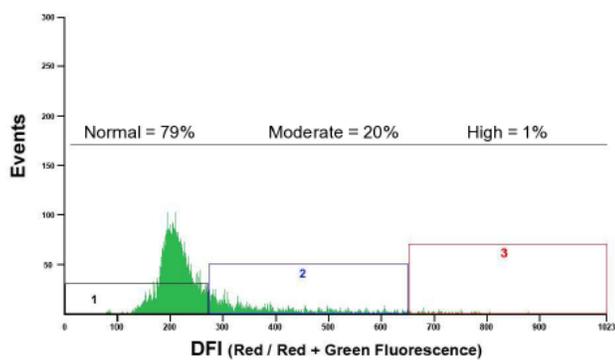
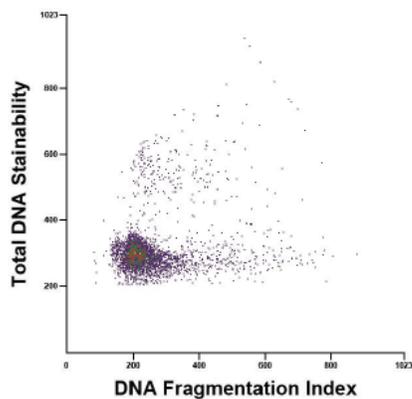
### SCSA® Results

% DFI = 31%

% HDS = 16%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Fair to Poor Sperm DNA Integrity**

## MOPP 174



| File    | % Total | % Moderate | % High | % HDS | Mean DFI | SD DFI |
|---------|---------|------------|--------|-------|----------|--------|
| 26244   | 21.64   | 20.64      | 1.00   | 10.63 | 247.84   | 75.34  |
| 26245   | 19.73   | 19.12      | 0.61   | 14.02 | 241.05   | 71     |
| mean    | 20.7    | 19.9       | 0.8    | 12.3  | 244.4    | 73.2   |
| std dev | 1.4     | 1.1        | 0.3    | 2.4   | 4.8      | 3.1    |

### SCSA® Results

% DFI = 21%

% HDS = 12%

Estimate of Overall Sperm DNA Integrity = **Good to Fair Sperm DNA Integrity**

