

Programa de preservación de la fertilidad en pacientes oncológicos

Fertility preservation program in cancer patients

M^a Esther Rendal Vázquez¹, Mariana García García², M^a José López Piñón², Marcos Carballal Rodríguez², Catarina Barbero Cancelo², Rosario Olvido Fernández Mallo¹, Inma Míguez Torre¹, Teresa Bermúdez González¹, Sonia Pértega Díaz³, Jacinto Sánchez Ibáñez¹

¹Unidad de Criobiología-Banco de Tejidos. CHUAC. A Coruña

²Unidad de Fecundación in vitro. CHUAC. A Coruña

³Unidad de Estadística. CHUAC. A Coruña

RESUMEN

La infertilidad, es un problema que a día de hoy afecta a una gran cantidad de parejas. Una de las posibles causas es la disminución a nivel mundial de la calidad seminal debido a factores como pueden ser la alimentación, el consumo de alcohol y tabaco, altos niveles de estrés o factores ambientales. Además, el aumento de la incidencia de enfermedades tumorales en pacientes menores de 35 años, pone de manifiesto la necesidad de preservar la fertilidad de estos pacientes mediante técnicas de criopreservación. Es importante, que ésta se realice antes de que reciban ningún tipo de tratamiento (quimioterapia y radioterapia). En este trabajo, se llevará a cabo un estudio comparativo entre las muestras de varones que acuden al Hospital Materno Infantil por problemas de fertilidad y aquellos pacientes oncológicos que antes de iniciar el tratamiento realizan una criopreservación de la muestra seminal analizando las posibles variaciones de estas últimas muestras, mediante un test de post-congelación para comprobar la viabilidad de las muestras criopreservadas. Los parámetros que se van a analizar son: edad del paciente, volumen de la muestra, concentración espermática, porcentaje de espermatozoides móviles e inmóviles, móviles progresivos y espermatozoides tipo "a".

(Rev. Iberoam. Fert Rep Hum, 2015; 32; 35-44 © Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana)

Palabras clave: *Infertilidad, Criopreservación, Spem Class Analyzer (SCA)*

Aceptado: 4/6/15

Correspondencia: M^a Esther Rendal Vázquez

Hospital Teresa Herrera. Unidad de Criobiología-Banco de Tejidos. CHUAC.

Carretera del Pasaje s/n .15007 A Coruña

SOLICITUD REIMPRESIÓN: Email: editorialmedica@editorialmedica.com

SUMMARY

The infertility, is a problem affecting a large number of couples today. One of the possible causes is decreasing around the world of the seminal ability due to factors such as food, alcohol and tobacco consumption, high levels of stress or environmental factors. In addition, the increase in the incidence of tumour diseases in patients younger than 35 years, highlights the need to preserve the fertility of these patients through cryopreservation techniques. It is important that this be done before they receive any kind of treatment (chemotherapy and radiotherapy). In this work, we will take place a comparative study between the samples of male couples who come to the mother and child Hospital for fertility problems and cancer patients before treatment carried out a Cryopreservation of spermatozoa by analysing possible variations of these latest samples, using a test of post-congelacion to check the viability of samples criopreserved. The parameters will be analyzed are: the patient's age, volume of sample, sperm concentration, percentage of progressive mobile and stationary, mobile sperm and sperm type "a".

(Rev. Iberoam. Fert Rep Hum, 2015; 32; 35-44 © Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana)

Key words: *Infertility, cryopreservation, Sperm Class Analyzer (SCA)*

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, se estima que aproximadamente entre el 17 y el 25 % de las parejas en edad reproductiva presenta problemas de infertilidad (Ledger, 2009). En aproximadamente la mitad de las parejas se puede apreciar que la causa de este problema de infertilidad está asociado a un factor masculino, bien de forma aislada o en combinación con un factor femenino (Rowe y Comhaire, 2000). Por otra parte, en los últimos años se ha detectado a nivel mundial una disminución en la calidad seminal (Merzenich et al., 2010; Jorgensen et al., 2012). Distintos factores podrían explicar esta disminución, como son los problemas nutricionales (Wong et al., 2000), los altos niveles de estrés emocional, el consumo de tabaco, alcohol y drogas ilegales (Pasqualotto et al., 2004) o los factores medioambientales (Sharpe e Irvine, 2004).

Para el análisis de las muestras de semen se realiza un examen macroscópico donde, entre otros parámetros se debe analizar la viscosidad y la licuefacción, y un examen microscópico. El examen microscópico se realiza de forma automatizada a través del programa Sperm Class Analyzer 5.1.0.1 (SCA5). El sistema consiste en una cámara digital de color de alta sensibilidad y velocidad que adquiere imágenes mediante un microscopio con contraste de fases (para el análisis de movilidad). Una vez capturados los diferentes campos, el software clasifica los espermatozoides en progresivos (aquellos espermatozoides móviles que se mueven del sitio, que progresan), móviles e inmóviles, y calcula la concentración en un mililitro sobre todo el volumen de la muestra.

El objetivo primordial de la criopreservación de espermatozoides es mantener la viabilidad y funcionalidad de los mismos a bajas temperaturas (-196°C) durante largos perí-

odos de tiempo hasta su posible utilización en tratamientos de reproducción asistida. Entre las aplicaciones que tiene la congelación del semen destaca su empleo en varones que van a someterse a un tratamiento médico o quirúrgico, que puede alterar su capacidad reproductiva. Los avances obtenidos en el campo de la oncología han logrado aumentar la esperanza de vida e incluso la curación de una gran parte de los pacientes oncológicos (Sharma, 2011). Sin embargo, este éxito terapéutico conlleva la aplicación de tratamientos agresivos, especialmente quimioterapia y radioterapia, que presentan un marcado efecto gonadotóxico, y que como consecuencia entre un 15 a un 30 % de los varones sometidos a estos tratamientos quedan estériles (Williams, 2010). En este tipo de pacientes se procede a la congelación de la muestra seminal antes de iniciar el tratamiento oncológico, para su potencial uso posterior (Lee et al., 2006; Hourvitz et al., 2008).

El éxito del proceso de criopreservación está relacionado con múltiples factores: asociados a la técnica de la congelación (factores extrínsecos) y de aquellos factores asociados con las propiedades intrínsecas o características de la muestra de cada paciente. De todos estos factores, la calidad y la cantidad del semen son los principales parámetros que influyen en el éxito de la criopreservación de semen (Harrison y Sheppard, 1980; Freour et al., 2009). Éstos determinan de igual modo el tipo de técnica de criopreservación utilizada para cada muestra. En este estudio las muestras que tras análisis en el SCA muestran una concentración espermática alta y un buen recuento de espermatozoides móviles y progresivos se congelan de forma programada (en rampa) o, en el caso de muestras que no cumplen estos criterios se utiliza el método conocido como perlas congeladas en hielo seco (nieve carbónica).

No existen parámetros objetivos claros que definan cuándo utilizar un método u otro, sino que dependerá del volumen del semen, del número de espermatozoides por mililitro, del porcentaje de espermatozoides móviles y progresivos. Al final, el objetivo es que cada unidad criopreservada tras la descongelación tenga una cantidad, en número y movilidad, suficiente para poder ser utilizado en técnicas de reproducción asistida.

Las enfermedades más frecuentes en varones que acuden a un banco de semen para la criopreservación espermática son hematológicas: leucemias (linfoma de Hodgkin, linfoma no-Hodgkin) y cáncer testicular (Sabanegh et al., 2008). La mayoría de los pacientes que han comenzado la quimioterapia desarrollan azoospermia 2 o 3 meses después de la misma (Trottmann et al., 2007). Por este motivo, la congelación de semen durante el tratamiento quimioterápico para poder solucionar la urgencia del problema no se suele recomendar. Además diversos estudios, han demostrado que la quimioterapia y radioterapia pueden provocar aneuploidías a corto y largo plazo. (Nuñez et al., 2007; Puscheck et al., 2004).

En este trabajo se realizó un análisis comparativo de las características de muestras seminales de pacientes en estudio por problemas de la fertilidad de la pareja (PFP), que llegan al hospital después de llevar un año intentando concebir sin éxito, y las muestras de pacientes oncológicos, antes de que estos se sometan a ningún tratamiento oncológico. En el caso de éstas se realiza de manera rutinaria un test postdescongelación para determinar su viabilidad o no para un futuro uso mediante técnicas de Reproducción Humana Asistida.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio se lleva a cabo realizando una comparativa entre dos grupos de pacientes. El primero de ellos, consta de 120 muestras de pacientes en estudio por problemas de la fertilidad. El segundo grupo está formado por 48 pacientes oncológicos, que una vez informados de que padecen un tumor, y antes de someterse a los correspondientes tratamientos de quimioterapia y/o radioterapia deciden criopreservar muestras de semen para poder ser utilizadas en técnicas de reproducción asistida en caso de que después de someterse a los tratamientos sean infértiles, ya sea de manera provisional o permanente.

En todas estas muestras se analizan los mismos parámetros. Se realiza un análisis macroscópico y se mide el volumen de la muestra. Se realiza una evaluación microscópica y se mide la concentración espermática, el número de espermatozoides móviles e inmóviles, espermatozoides móviles progresivos y porcentaje de espermatozoides tipo "a" (rápidos).

Esta evaluación microscópica se realiza de forma automática a través del programa Sperm Class Analyzer 5.1.01 mediante el módulo de SCA movilidad y concentración.

En las muestras de pacientes en estudio PFP, las edades de los pacientes que acuden a la consulta están comprendidas entre los 18 y los 62 años, siendo la media de edad los $37,36 \pm 6,24$ años. En las muestras de pacientes oncológicos, las edades de estos pacientes están comprendidas entre los 15 y los 55 años, siendo la media de edad los $31,38 \pm 7,92$. A diferencia del grupo de PFP, en el grupo de pacientes oncológicos, la cuantificación del volumen determina el método de criopreservación utilizado (rampa o perlas). En la evaluación microscópica en el SCA en el caso de los pacientes PFP se capturan 3 campos a diferencia del caso de los pacientes oncológicos donde se capturan 5 campos.

En las muestras pertenecientes a los pacientes oncológicos se analizó los porcentajes que correspondían a las diferentes enfermedades que padecían estos pacientes, y el método que se utilizó para criopreservar estas muestras.

Criopreservación de las muestras de pacientes oncológicos

Este proceso va a depender de las características de cada muestra.

En el caso de las muestras con una concentración espermática baja con recuento bajo de espermatozoides móviles y progresivos y que vayan a ser criopreservados en perlas se realizará previamente un pase por gradientes de densidad con el fin de dejar la muestra limpia de espermatozoides inmóviles, detritus y tóxicos. Para ello en primer lugar se preparan gradientes de 90 % y gradientes de 45 % en dos tubos de fondo cónico, por separado.

(Gradiente 90 %: 9 ml de solución madre gradientes (sperm grad, Vitrolife), 1 ml de medio G-IVF plus (Vitrolife); Gradiente 45 %: 4, 5 ml de solución madre sperm grad y 5,5 ml de de medio G-IVF plus). Se atemperan a 37°C durante 10-15 minutos antes de su utilización.

Se realizan gradientes normalmente de 0,5ml y para ello en un tubo fondo cónico se deposita 0,5 ml de gradiente de 90 %. Encima resbalando suavemente por la pared del tubo, 0,5 ml del gradiente de 45 %. Encima de los dos gradientes se deposita resbalando por la pared del tubo la totalidad del volumen del eyaculado. Se centrifuga a 1100 rpm durante 15 minutos. Se elimina el sobrenadante y se resuspende en 1ml de medio G-IVF plus y se centrifuga de nuevo a 1100 rpm durante 5 minutos. Se elimina el sobrenadante y el pellet se resuspende en 0,5 ml de medio de cultivo (Sequential Fert, Origio). Se realiza un análisis de la muestra post tratada en el SCA y previo a la criopreservación.

A continuación, independientemente del método de congelación, se añade el crioprotector (Sperm Cryo all round, Cryos) y se añade una parte de éste por cada 3 partes de semen. Es muy importante que el crioprotector se añada muy lentamente y gota a gota mientras se va mezclando la muestra. A continuación se incuba la muestra a temperatura ambiente durante 10 minutos en continua agitación.

En el caso de que el método de congelación sea en rampa se distribuye la muestra con el crioprotector (Sperm Cryo all round) en al menos 5 criotubos (tres se utilizarían para los futuros tratamientos de reproducción asistida, uno para realizar el test post-congelación y el último criotubo sería de reserva). Una vez preparados los criotubos, se ponen en el interior del congelador programable. El proceso que se lleva a cabo en el programa de congelación será el que se muestra a continuación. En ésta aparecen las diferentes temperaturas por las que pasan los criotubos y el tiempo que se mantienen en cada una de ellas. En el interior del congelador programable se coloca un criotubo testigo que contiene 3 ml de medio Sperm Wash (Irvine Scientific). Una vez finalizada la congelación se almacenan las muestras a -150°C .

SEGMENTOS	TEMPERATURA	DURACIÓN
1	10°C	10 minutos
2	-2°C	0 minutos
3	$-2,5^{\circ}\text{C}$	2,9 minutos
4	$-2,5^{\circ}\text{C}$	0,5 minutos
5	$-34,5^{\circ}\text{C}$	0,9 minutos
6	$-34,5^{\circ}\text{C}$	2,3 minutos
7	-50°C	1,9 minutos
8	-120°C	3,5 minutos

En el caso de que el método de congelación seleccionado sea en perlas, se hacen unos pequeños huecos en la nieve carbónica en polvo y utilizando una pipeta se deja caer una gota de suspensión de semen con el crioprotector (Sperm Cryo all round) (15 microlitros) en el interior de estos orificios. Después de unos minutos se coloca entre 2 o 3 perlas en cada uno de los criotubos, previamente enfriados en la nieve carbónica, para su almacenamiento. Una vez finalizada la congelación, las muestras se almacenan a -150°C .

Descongelación de las muestras

El proceso de descongelación varía según el método de congelación utilizado. Transcurrida una semana se realiza la descongelación para determinar si en la muestra criopreservada existen espermatozoides en cantidad y movilidad suficiente para realizar técnicas de reproducción asistida microinyección intracitoplasmática (ICSI).

En el caso de muestras congeladas en rampa, se descongela el criotubo directamente a 37°C en baño maría. Una vez descongelado se realiza nuevamente el conteo directamente en el SCA, del mismo modo que se explicó anteriormente para así observar los efectos causados por la congelación.

Si por el contrario se ha criopreservado en perlas, en primer lugar se deposita con una pipeta pasteur de punta fina en el criotubo con la muestra congelada, aproximadamente 1 ml de medio atemperado (Sperm Wash) a 37°C , se mezcla y se pasa el homogeneizado del criotubo a un tubo de fondo cónico. A continuación, se centrifuga este tubo durante 5 minutos a 1100 rpm. Una vez terminado el proceso de centrifugado, se elimina el sobrenadante con una pipeta fina y se resuspende el pellet con medio atemperado (Sperm Wash) a 37°C en aproximadamente 200 microlitros (en función del tamaño del pellet). A continuación, se realiza un análisis en SCA para observar los efectos causados por la congelación.

Para el tratamiento estadístico de los datos, se utiliza el software SPSS versión 19.0. En éste, se realizarán comparaciones entre los dos grupos, analizando la media, mediana, desviación típica y percentiles de los diferentes parámetros de estudios. Además, para comparar si los resultados son significativos o no significativos se realizará un test Anova.

RESULTADOS

En este estudio se analizaron 168 muestras: 120 correspondían a los pacientes en estudio por PFP y las otras 48 muestras correspondían a los pacientes oncológicos.

Se pudo observar que en más del 50 % de los pacientes que decidieron criopreservar muestras de semen, el diagnóstico era linfoma de Hodgkin y tumor testicular (no seminoma) como se puede observar en la Figura 1. Además, es importante comentar que, de los 48 pacientes que acudieron a la consulta no todas las muestras se pudieron llegar a congelar (Figura 2). Sólo se realizó congelación en 42 pacientes. De éstos, las muestras que fueron congeladas en rampa presentaban un buen volumen y/o un buen recuento espermático.

A continuación se realizó una comparación entre diferentes parámetros entre los dos grupos, pacientes oncológicos y PFP. Uno de los primeros parámetros que se analizó fue la media de las edades de los pacientes en ambos grupos. En esta tabla se pudo observar que las medias de las edades estaban comprendidas entre los 30 y los 40 (Tabla1). En el caso del grupo PFP, la media de edad era significativamente superior a los pacientes oncológicos (p -valor $< 0,001$). Esto, podía deberse a que actualmente la media de edad en la que las parejas deciden formar una familia ha aumentado por el ritmo de vida actual (trabajo, etc) y que además estos

FIGURA 1

Gráfico que muestra el diagnóstico de los pacientes que acuden a criopreservar muestras de semen

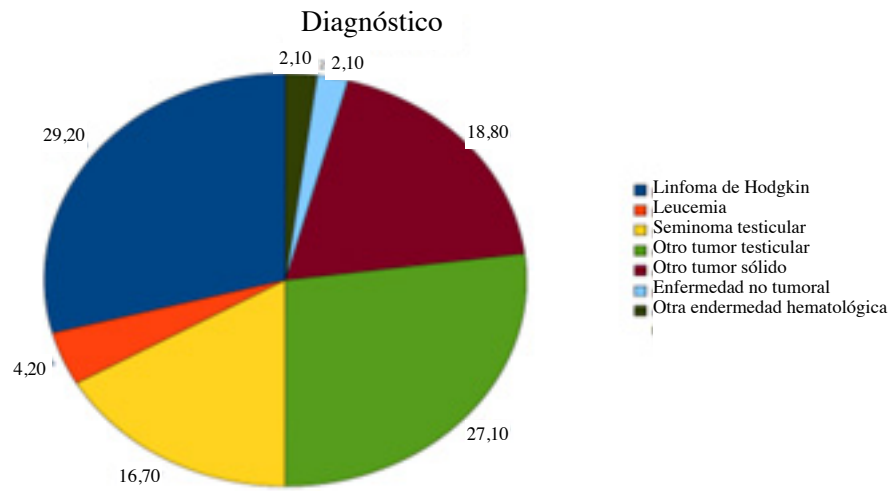


FIGURA 2

Gráfico que muestra los porcentajes de los diferentes métodos de congelación utilizados

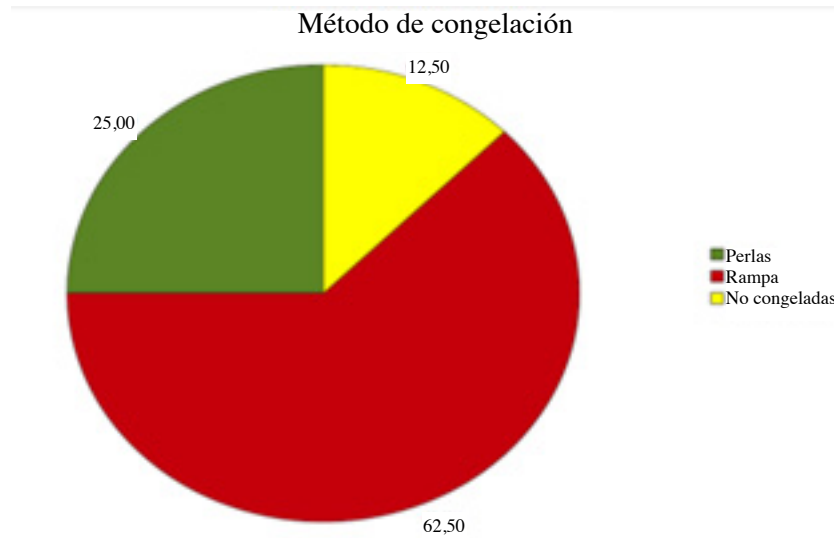


TABLA 1

Gráfico que muestra la comparación entre las muestras de semen en fresco entre pacientes oncológicos y no oncológicos.

	ONCOLÓGICOS		NO ONCOLÓGICOS		p
	Media (DT)	Mediana	Media (DT)	Mediana	
EDAD	31.4 (7.9)	33.0	37.4 (6.2)	37.0	<0,001
VOLUMEN	3.9 (1.9)	3.6	3.6 (1.7)	3.3	0.502
CONCENTRACIÓN ESPERMATOZOIDES	33.6 (37.1)	21.1	50.6 (44.4)	36.8	0.003
MÓVILES	43.2 (20.6)	40.0	43.8 (23.3)	42.8	0.932
INMÓVILES	52.8 (21.6)	56.8	56.2 (23.23)	57.2	0.360
PROGRESIVOS	28.3 (18.4)	27.3	20.8 (15.2)	17.0	0.020
RÁPIDOS	24.2 (18.8)	21.8	13.9 (13.2)	9.7	<0.001

pacientes ya llevaban un año intentando concebir sin éxito, por lo que esta edad se veía aumentada.

A continuación, se compararon los resultados obtenidos de cada uno de los parámetros que se analizaron a lo largo del estudio en ambos grupos. Si se observan estos resultados, se pudo ver que en algunos de los parámetros analizados las medias y medianas de ambos grupos eran muy similares y no significativas. Esto sucede con el volumen. También se pudieron observar valores similares en el total de espermatozoides móviles e inmóviles de las muestras e inferiores en ambos grupos al 50 %, lo que podría indicar también la dificultad que tienen los pacientes del grupo PFP a tener descendencia ya que el porcentaje de espermatozoides móviles es inferior al 50 % en este grupo. Por el contrario al analizar el número de espermatozoides progresivos en ambos grupos estos eran significativamente mayores en el grupo de paciente oncológicos comparados con el grupo PFP. No hay que olvidar que los PFP acuden a las consultas por problemas a la hora de concebir y por lo tanto es normal que estos parámetros sean inferiores a los de los pacientes oncológicos que no tienen porque padecer ningún problema de fertilidad. Por el contrario, cuando se calculó el p-valor de la concentración espermática se observó que esta era significativamente mayor en los pacientes del grupo PFP comparado con el grupo de pacientes oncológicos ($p=0,003$) quizás debido a que el propio proceso tumoral en los pacientes oncológicos provoca una disminución en la concentración de espermatozoides.

Referente a estos parámetros, es muy importante conocer si cumplen o no con los criterios de la OMS. Para ello se analizaron todos los parámetros de estudio comparando entre ambos grupos para observar, las posibles diferencias en cuanto a estos criterios. Se pudo observar (Tabla 2), que los datos del volumen si que cumplen con los criterios. Con

respecto a la concentración espermática, se observó que en ambos grupos más de la mitad de las muestras sí que cumplían con los valores propuestos por la OMS. Aun así, se observó que en el grupo de PFP este porcentaje era superior que en el de los pacientes oncológicos, como comentamos anteriormente en los pacientes oncológicos esta concentración quizás se ve disminuida por su propio proceso tumoral. Sin embargo, si nos fijamos en el porcentaje de espermatozoides móviles que cumplen con los criterios de la OMS, se observó que en ambos grupos solo lo cumplen aproximadamente un 50 % de las muestras analizadas. Por último, si nos fijamos en el porcentaje de los espermatozoides progresivos que cumplen con los criterios de la OMS, se observó que en ambos grupos y en un porcentaje superior al 50 % no se cumplen con estos criterios, siendo inferior incluso en el de pacientes del grupo PFP, lo que podría también explicar la dificultad que tienen estos pacientes a la hora de concebir.

Tras la decisión del método de congelación a realizar era importante observar las variaciones producidas en los parámetros analizados tras la técnica empleada para la congelación en perlas antes de la congelación (Tabla 3). Se pudo observar como había un descenso significativo en la concentración de espermatozoides antes de realizar el pasa por gradientes ($p=0,041$). Por el contrario se producía un aumento significativo en el porcentaje de espermatozoides móviles, progresivos y rápidos. Todo ello indica que el gradiente de densidad permite una selección de aquellos espermatozoides que tienen una buena movilidad.

A continuación se analizó la variación en los parámetros analizados tras la descongelación independientemente de que la congelación se realizase en rampa o en perlas. Se pudo observar como tras la descongelación se producía un descenso significativo de todos los parámetros analizados:

TABLA 2							
Comparación entre muestras de semen en fresco entre pacientes oncológicas y no oncológicas según los criterios de la OMS							
	ONCOLÓGICOS		NO ONCOLÓGICOS		p	OR	95% IC (OR)
	n	%	n	%			
VOLUMEN					0,759	1,5	0,4-5,6
>1.5ML	44	93,6%	109	90,8%			
<1.5ML	3	6,4%	11	9,2%			
CONCENTRACIÓN ESPERMATOZOIDES					0,001	0,3	0,1-0,6
>14,9 MILL/ML	27	57,4%	98	81,7%			
<14,9 MILL/ML	20	42,6%	22	18,3%			
MÓVILES					0,936	1,0	0,5-2,0
>40%	25	53,2%	63	52,5%			
<40%	22	46,8%	57	47,5%			
PROGRESIVOS					0,088	1,8	0,9-3,8
>31,9%	18	38,3%	30	25,0%			
<31,9%	28	61,7%	90	75,0%			

TABLA 3							
Variación en los parámetros analizados tras la técnica utilizada para la congelación en perlas antes de la congelación.							
	BASAL		FINAL		DESCENSO PORCENTUAL		p
	Media (DT)	Mediana	Media (DT)	Mediana	Media (DT)	Mediana	
CONCENTRACIÓN ESPERMATOZOIDES	7.7 (15.4)	2.5	1.9 (2.4)	1.1	28.01 (67.2)	53.8	0.041
	BASAL		FINAL		AUMENTO PORCENTUAL		p
	Media (DT)	Mediana	Media (DT)	Mediana	Media (DT)	Mediana	
% MÓVILES	35.3 (14.3)	34.3	58.4 (25.8)	57.6	62.7(47.2)	62.3	0.004
PROGRESIVOS	16.3 (12.5)	13.9	47.4 (28.3)	46.2	236.8 (218.6)	183.3	0.003
RÁPIDOS	9.7 (8.4)	7.7	42.8 (26.2)	38.5	456.5 (533.4)	300.2	0.003

concentración de espermatozoides, % móviles, progresivos y rápidos (Tabla 4).

Por último se analizó las diferencias entre los valores analizados entre las muestras congeladas en perlas y en rampa (Tabla 5). Se pudo observar como inicialmente antes de descongelar las muestras que se procesan en rampa presentaban valores significativamente más altos en cuanto a concentración de espermatozoides, espermatozoides progresivos y rápidos. El valor de espermatozoides móviles, también era superior en el grupo de pacientes criopreservados en rampa. Esto coincidía con lo comentado anteriormente que los se-

menes de “buena calidad” deberían ser criopreservados utilizando este método. Por lo que no sorprende la gran diferencia que se observó en la concentración espermática, ya que este parámetro es uno de los que determina si una muestra de semen es de buena o mala calidad. Tras la descongelación las muestras procesadas en rampa mostraron significativamente mayor concentración de espermatozoides, porcentaje de progresivos y rápidos sin diferencias significativas en cuanto al porcentaje de móviles. Después del proceso de criopreservación de las muestras es importante realizar un proceso de descongelación con el fin de poder

TABLA 4							
Comparación entre los valores analizados antes y después de la congelación independientemente de que esta se realice en perlas o en rampa							
	BASAL		FINAL		DESCENSO PORCENTUAL		p
	Media (DT)	Mediana	Media (DT)	Mediana	Media (DT)	Mediana	
CONCENTRACIÓN ESPERMATOZOIDES	36,1 (38,6)	24,2	25,8 (30,4)	18,40	30,2 (24,4)	26,1	<0,001
% MÓVILES	53,4 (19,7)	51,1	16,8 (11,3)	14,80	67,6 (17,4)	66,3	<0,001
PROGRESIVOS	39,2 (20,5)	33,5	7,8 (7,6)	5,50	78,6 (18,9)	81,6	<0,001
RÁPIDOS	35,8 (19,9)	29,8	5,8 (6,8)	3,57	84,6 (16,1)	87,2	<0,001

TABLA 5					
Comparación entre los valores analizados antes y después de la congelación entre muestras congeladas dependiendo del tipo de congelación, en perlas o en rampa					
	PERLAS		RAMPA		p
	Media (DT)	Mediana	Media (DT)	Mediana	
VALORES BASALES					
Espermatozoides/ml	7.7 (15.4)	2.5	48.6 (38.03)	34.4	<0.001
Móviles	35.3 (14.3)	34.3	51.6 (17.2)	48.6	0.005
Progresivos	16.3 (12.5)	13.7	36.2 (16.4)	30.9	<0.001
Rápidos	9.7 (8.4)	7.7	33.3 (16.8)	24.8	<0.001
VALORES TRAS DESCONGELACIÓN					
Espermatozoides/ml	0.7 (0.4)	0.7	35.0 (30.8)	22.6	<0.001
Móviles	14.1 (15.1)	11.1	17.9 (9.7)	15.1	0.237
Progresivos	5.1 (9.8)	0.0	8.8 (6.6)	6.7	0.009
Rápidos	4.1 (8.6)	0.0	6.4 (6.1)	4.2	0.005
DESCENSOS RELATIVOS					
Descenso en concentración	41.3 (25.4)	46.7	26.1 (23.1)	23.4	0.080
Móviles	75.8 (22.3)	75.3	64.7 (14.6)	62.5	0.131
Progresivos	87.3 (25.0)	100	75.3 (15.5)	72.9	0.004
Rápidos		100	80.8 (6.3)	84.1	<0.001

comprobar cómo es el estado de las muestras que se están guardando para posibles tratamientos de fertilidad posteriores. En la Tabla 5 se pudo observar como había un mayor descenso en concentración en las muestras procesadas en rampa pero una menor pérdida del porcentaje de espermatozoides móviles, progresivos y rápidos.

DISCUSIÓN

La infertilidad, afecta actualmente a un gran número de parejas en todo el mundo. Por lo que el estudio de los posibles

factores que pueden afectar a la calidad seminal es de gran importancia. Por ello, uno de los objetivos de este trabajo, consistió en comparar los parámetros de ambos grupos de pacientes estudiados (PFP y pacientes oncológicos) con los nuevos valores de referencia establecidos por la OMS en 2010 para ver si estaban dentro de estos rangos. Al analizar estos datos, se pudo entender los posibles problemas de fertilidad del grupo de PFP ya que aunque el volumen y la concentración espermática se encontraban dentro de los valores, el porcentaje de espermatozoides móviles progresivos y de espermatozoides tipo "a" en la gran mayoría de las mues-

tras, era inferior a los valores establecidos por la OMS lo que podía influir en una fecundación exitosa y un posterior embarazo. Referente al grupo de pacientes oncológicos, se podía llegar a pensar que la calidad seminal de estas muestras podía verse alteradas incluso antes de que estos empezaran el tratamiento de quimioterapia y/o radioterapia (Pacey y Eiser, 2011).

Una vez analizado si las muestras cumplían o no con los criterios propuestos por la OMS, se comparó si existían diferencias entre los dos grupos de pacientes en función de los parámetros de estudio. Se pudo observar que en el caso de la edad era superior en el grupo de PFP. Esto podía ser, a que debido al ritmo de vida actual (trabajo, etc) la media de edad en la que las parejas deciden formar una familia ha aumentado. Además, estos pacientes acudían a la consulta porqué llevaban un año intentando concebir sin éxito, lo que provoca que esta edad se vea aún más aumentada. En relación al porcentaje de espermatozoides progresivos y de espermatozoides tipo "a", se pudo observar que en ambos casos las medias eran superiores en el grupo de pacientes oncológicos. El grupo de PFP no es un grupo control, sino que son pacientes con problemas de fertilidad que, como ya se vio, no cumplen con los criterios de la OMS en su gran mayoría, en estos parámetros.

Finalmente, en el grupo de pacientes oncológicos hay que comentar que con el paso de los años, los avances terapéuticos han mejorado la supervivencia de pacientes con cáncer, por lo que, la preservación de la fertilidad de estos pacientes es de gran importancia para ofrecerles la posibilidad de utilizar las muestras de semen, previamente criopreservadas, en tratamientos posteriores de reproducción asistida. En diferentes estudios, se sugiere que la capacidad de tener hijos biológicos es de gran importancia para muchas parejas (Lee et al., 2006). En este estudio se pudo observar, que los pacientes que acuden a los bancos de semen para criopreservar muestras padecen en un mayor porcentaje linfoma de Hodgkin (29 %) y tumor testicular no seminoma (27 %). Esto coincide con otros estudios (Lee et al., 2006; Hotaling et al, 2013). De las 48 muestras iniciales de los pacientes oncológicos, 6 no se pudieron congelar debido a la ausencia de espermatozoides o a un volumen insuficiente de la muestra. La gran mayoría fueron criopreservadas mediante el método de rampa. Analizando los parámetros de estudio en función del método de congelación, se pudo observar como las muestras criopreservadas en rampa presentaban una concentración espermática mucho más elevada que las criopreservadas en perlas. Esto se debía a que el semen de "buena calidad" (buena concentración espermática y volumen suficiente) se criopreservó en rampa y el de peor calidad en perlas.

La criopreservación espermática es una técnica que ha permitido la conservación, durante un tiempo indefinido, de células hasta el momento en que van a ser utilizadas en los procedimientos de reproducción asistida. A pesar de que este procedimiento amplió las alternativas de tratamiento de la infertilidad, aún hay una pérdida importante debida al daño celular que ocasiona la congelación (Degl'Innocenti et al, 2013). En este estudio, se pudo observar como al realizar el test post-descongelación de las muestras criopreservadas se producía un alto porcentaje de pérdidas en función del parámetro analizado y del método de congelación. Así, se pudo observar que en muestras congeladas en perlas, la pérdida de la concentración espermática era mayor que el de las muestras congeladas en rampa, por lo que cuando la calidad del semen antes de criopreservar las muestras era bueno, la pérdida de la concentración espermática era menor que cuando la muestra ya presentaba una peor calidad seminal. Sin embargo, analizando la pérdida que se producía en el número de espermatozoides móviles, se vio que utilizando cualquiera de los dos métodos de congelación se perdía al menos un 64,7 %. Con ello se pudo demostrar la importante pérdida que ocasiona el proceso de criopreservación. Aun así, con los avances producidos en las técnicas de reproducción asistida, la presencia de un único espermatozoide en la muestra criopreservada es suficiente para realizar ICSI.

Nuestra experiencia indica que la criopreservación de semen en pacientes oncológicos, unido a su posterior uso con ICSI, es un método válido para preservar la fertilidad. Aun así, el incremento de su demanda dependerá en gran medida de la implicación del personal clínico que atiende a estos pacientes, ya que como se comentó, si bien el 91 % de los oncólogos están de acuerdo en que la criopreservación debe ofrecerse a todos los varones oncológicos, solo el 10 % lo ofrece siempre, y el 27 % solo en ocasiones (Horning et al, 1988; Trottmann et al, 2007). También es importante comentar que, nuestra experiencia y la de la mayoría de autores indican que solo entre el 3-10 % de los pacientes oncológicos y con muestras de semen criopreservada utilizan posteriormente dicho material. Las causas de ésta escasa utilización son múltiples: recuperación de la función gonadal, no deseo de paternidad, falta de confianza en el material biológico congelado o en las técnicas de reproducción asistida y muerte del paciente (Mendoza et al., 2003). En este estudio podemos concluir que las muestras de PFP, presentan en algunos de los parámetros de estudio valores por debajo de los recomendados por la OMS, y por lo tanto esto podría ser una de las causas de los problemas de fertilidad que presentan. La preservación de la fertilidad de los pacientes oncológicos mediante la criopreservación de las

muestras de semen, supone una alternativa para estos pacientes en el caso de que no recuperen la fertilidad después de recibir los tratamientos necesarios para su recuperación. Aunque en el proceso de congelación-descongelación, se pierda una parte de la calidad seminal, con un único espermatozoide en la muestra sería suficiente para la realización de ICSI por lo que es muy importante el mantenimiento de estas muestras.

AGRADECIMIENTOS: Al personal del Laboratorio de área por la cesión de las muestras de semen para el estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- Pacey A.A, Eiser C.** Banking sperm is only the first of many decisions for men: What healthcare professionals and men need to know. *Human Fertility* 2011; 14(4):208-217.
- Freour T, Jean M, Mirallie S, Langlois M.L, Dubourdiou S, Barriere P.** Predictive value of CASA parameters in IUI with frozen donor sperm. *International Journal of Andrology* 2009; 32, 498-504.
- Harrison R.F, Sheppard B.L.** A comparative study in methods of cryoprotection for human semen. *Cryobiology* 1980; 17, 25-32.
- Horning S.J, Hoppe R.T, Hacock S.K, Rosenberg S.A.** Vinblastine, bleomycin and metrotrexate: An effective adjuvant in favourable Hodgkin's disease. *J Clin Oncol.* 1988; 6:1822-31.
- Hourvitz A, Goldschlag DE, Davis OK, Gosden LV, Palermo GD, Rosenwaks Z.** Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using cryopreserved sperm from men with malignant neoplasm yields high pregnancy rates. *Fertility and Sterility* 2008; 90, 557-563.
- Jorgensen N, Joensen UN, Jensen TK, Jensen MB, Almstrup K, Olesen IA, Juul A, Andersson AM, Carlsen E, Petersen JH, Toppari J, Skakkebaek NE.** Human semen quality in the new millennium: a prospective cross-sectional population-based study of 4867 men. *B.M.J.* 2012; open 2, 4 e000990.
- Ledger WL.** Demographics of infertility. *Reproductive BioMedicine Online* 2009; 18, S11-S14.
- Lee SJ, Schover LR, Partridge AH, Patrizio P, Wallace WH, Hagerty K, Beck LN, Brennan LV, Oktay K.** American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. *Journal of Clinical Oncology* 2006; 24, 2917-2931.
- Mendoza JL, Castilla JA, Martínez L, Magán R, García-Peña ML, Ortiz A, González E, Fontes J, Maldonado V, Mendoza N, Ortiz de Galisteo JR.** Crioconservación de semen en pacientes oncológicos: 17 años de experiencia. *Revista iberoamericana de fertilidad* 2003. Vol.20 n°3.
- Merzenich H, Zeeb H, Blettner M.** Decreasing sperm quality: a global problem? *B.M.C. Public Health* 2010; 10- 24.
- Núñez Calonge R, Cortés Gallego S, Gago García M, Caballero Peregrín P.** Criopreservación de semen en pacientes con cáncer: criterios determinados según la medicina basada en la evidencia. *Rev. Int. Androl.* 2007; 5(3).
- Pasqualotto F.F, Lucon A.M, Sobreiro B.P, Pasqualotto E.B, Arap S.** Effects of medical therapy, alcohol, smoking, and endocrine disruptors on male infertility. *Revista do Hospital das Clínicas* 2004; 59, 375-382.
- Puscheck E, Philip P.A, Jeyendran R.S.** Male fertility preservation and cancer treatment. *Cancer Treatment Reviews* 2004; 30: 173-180.
- Rowe P.J, Comhaire F.H.** WHO manual for the standardized investigation, diagnosis and management of the infertile male. Cambridge University Press 2000.
- Sabanegh E.S, Ragheb A. M.** Male fertility after cancer. *Urology* 2009; 73 (2): 225-231.
- Sharma V.** Sperm storage for cancer patients in the UK: a review of current practice. *Human Reproduction* 2011; 26, 2935-2943.
- Sharpe R.M, Irvine DS.** How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health? *B.M.J.* 2004; 328, 447-451.
- Trottmann M, Becker A.J, Stadler T, Stadler T, Straub J, Soljanik I, Schlenker B, Stief C.G.** Semen quality in men with malignant diseases before and after therapy and the role of cryopreservation. *European Urology* 2007; 52: 355-367.
- Williams D.H.** Sperm banking and the cancer patient. *Therapeutic Advances in Urology* 2010; 2, 19-34.
- Wong W.Y, Thomas C.M.G, Merkus J.M.W.M, Zielhuis G.A, Steegers-Theunissen R.P.M.** Male factor subfertility: possible causes and the impact of nutritional factors. *Fertility and Sterility* 2000; 73, 435-442.
- DegliInnocenti S, Filimberti E, Magini A, Krausz C, Lombardi G, Grazia Fino M, Rastrelli G, Maggi M, Baldi E.** Semen cryopreservation for men banking for oligospermia, cancers, and other pathologies: prediction of post-thaw outcome using basal semen quality. *Fertility and Sterility* 2013; 100 (6): 1555-1563.
- Hotaling J.M, Lopushnyan N.A, Davenport M, Christensen H, Pagel E.R, Muller C.H, Walsh T.J.** Raw and test-thaw semen parameters after cryopreservation among men with newly diagnosed cancer. *Fertility and Sterility* 2013; 99(2): 464-469.
- Trottmann M, Becker A.J, Stadler T, Straub J, Soljanik I, Schlenker B, Stief C.G.** Semen quality in men with malignant diseases before and after therapy and the role of cryopreservation. *European Urology* 2007; 52: 355-357.