



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

“Comparación de las muestras espermáticas, pruebas de capacitación y de descongelación entre población general, donadores de semen y pacientes oncológicos post púberes que acuden a Preservación de Fertilidad Masculina en un Centro de Fertilidad”

TESIS

para obtener el título de

Sub-especialista en

Biología de la Reproducción Humana

PRESENTA

Dr. Jesús Erick Ramírez Monterrubio

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Julio César Rosales de León



Monterrey, Nuevo León.

24 de Febrero de 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A mi padre, ejemplo perfecto de conjugar el ser médico para el cuerpo, hombro para el consuelo y psicólogo para el alma.

A mi madre, combinación perfecta de cariño, dedicación y calidez humana.

A mis hermanos, Luis Eduardo y Salomón Iram, los mejores cómplices y los mejores amigos.

Índice

1. Datos de identificación	5
2. Síntesis	6
3. Marco teórico	7
4. Justificación.....	14
5. Pregunta de investigación	15
6. Hipótesis	15
6.1 Hipótesis de investigación	15
7. Objetivos.....	16
7.1 Objetivo principal	16
7.2 Objetivos secundarios.....	16
8. Metodología.....	17
8.1 Diseño del Estudio.....	17
8.2 Material y Métodos.....	17
8.3 Criterios de Selección	22
8.4 Análisis Estadístico	23
9. Resultados	25
10. Discusión.....	29
11. Conclusiones.....	31
12. Bibliografía.....	32

Índice de Gráficos

Gráfico 1. Parámetros de Referencia para las características del semen humano según la OMS	09
Gráfico 2. Agentes quimioterapéuticos utilizados comúnmente y su riesgo de infertilidad	11
Gráfico 3. Protocolo para la criopreservación de muestra espermática en pacientes prepúberes y postpúberes.....	12
Gráfico 4. Comparación de los valores de Referencia para análisis del semen humano OMS 1999 y 2010	20

Índice de tablas

Tabla 1. Comparación entre candidatos a donantes y pacientes oncológicos. Espermatobioscopía directa inicial.	25
Tabla 2. Comparación entre donantes y pacientes oncológicos. Espermatobioscopía directa + prueba de capacitación + Descongelación	26
Tabla 3. Análisis: Concentración espermática. Pacientes oncológicos	27
Tabla 4. Análisis: Motilidad total. Pacientes oncológicos.	28

1. Datos de identificación

- **Título:**
 - Comparación de las muestras espermáticas, pruebas de capacitación y de descongelación entre un grupo de aspirantes a donadores de semen y pacientes oncológicos post púberes que acuden a preservación de Fertilidad Masculina en un Centro de Fertilidad.

- **Autor**
 - Dr. Jesús Erick Ramírez Monterrubio

- **Asesor de tesis**
 - Dr. Julio César Rosales de León
 - Lic. Karla Alejandra Cantú Saldaña

- **Titular de subespecialidad en Biología de la Reproducción Humana**
 - Dr. Pedro Galacha Vega

- **Jefe de Enseñanza e investigación de subespecialidad en Biología de la Reproducción Humana**
 - Dr. Julio Cesar Rosales de León

- **Institución académica**
 - Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.

- **Institución sede**
 - Instituto para el Estudio de la Concepción Humana; Monterrey, Nuevo León, México

2. INTRODUCCIÓN

La preservación de la fertilidad por razón oncológica debe estar al alcance de todos. Los daños del proceso neoplásico a la fertilidad masculina siguen siendo tema de debate, sin embargo, lo que es un consenso general es que todo paciente diagnosticado con cáncer debe ser informado de la posibilidad de preservar fertilidad antes de iniciar su terapia antineoplásica.

Está bien establecido en la literatura médica que el cáncer puede diagnosticarse a cualquier edad en un paciente ⁽¹⁾. Lo anterior nos hace pensar que muchos de estos pacientes quizá no han cumplido sus deseos de fertilidad. Más aun, el tratamiento que se instala para combatir el cáncer suele tener efectos nocivos también sobre la capacidad reproductiva del varón, siendo algunos de ellos capaces de abolirla por completo.

A partir de lo esto, las Sociedades de Medicina Oncológica, Pediátrica, Urológica y Reproductiva se han enfocado en promover técnicas, medicamentos y protocolos que sean capaces de disminuir o proteger el sistema reproductivo del daño del que pueden ser objeto estos pacientes. Las opciones médicas existen y por años se ha trabajado en ellas para refinar los tratamientos antineoplásicos pero también para compensar los efectos colaterales indeseados con opciones de preservación aplicadas oportunamente ⁽²⁻³⁾.

En el caso de los varones que han recibido el diagnóstico de cáncer y deben entrar a protocolos quirúrgicos o terapéuticos para combatir el cáncer queda claro que la prioridad es preservar la vida; sin embargo, si somos capaces también de preservar la función reproductiva, ¿Por qué no hacerlo? ¿Por qué no empaparnos del conocimiento que se ha generado en este tópico para ofrecer siempre opciones de preservación de fertilidad actualizadas y sustentadas?

Las aristas del problema se dirigen entonces hacia un equilibrio delicado entre preservar la vida y también la fertilidad, en la medida de lo posible. Nos corresponde a nosotros, especialistas en Medicina de la Reproducción, conocer todas las opciones que podamos ofrecer a estos varones.

El objetivo principal de este estudio abordará estos protocolos y procedimientos, y pretende comparar si se realizan con el máximo de probabilidades de éxito, contrastando las muestras que recibimos de pacientes con diagnóstico de cáncer contra la población general y posteriormente conocer qué tanto se afectan dichas muestras obtenidas de pacientes oncológicos a través de nuestros protocolos de conservación.

3. MARCO TEÓRICO

Recibir el diagnóstico de cáncer ya no es una condena de muerte y ésta es una verdad indiscutible.

La Criopreservación espermática es, sin lugar a duda, el método más importante para la conservación del potencial reproductivo de pacientes que entrarán a alguna terapia gonadotóxica, no sólo refiriéndonos a neoplasias malignas.⁽⁴⁾ Desde su introducción al mundo de la medicina al inicio de la década de los 60's, pese a que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha intentado una estandarización global, siguen ejecutándose diversos protocolos para llevarla a cabo.⁽⁵⁾

El proceso de estudio y almacenamiento del semen humano en el caso de la criopreservación consta de diversos pasos que incluyen la recepción de la muestra en un tiempo determinado para su análisis tanto macroscópico como microscópico, lavado de la misma para retiro e identificación de células ajenas, métodos de capacitación para la discriminación de los espermatozoides más aptos y la congelación de muestras en nitrógeno líquido a temperaturas menores a los -190°C .⁽⁶⁾

Es sabido que el proceso mencionado previamente daña la integridad del espermatozoide impactando preferencialmente en la concentración espermática, la motilidad espermática y la morfología normal.⁽⁷⁾

Por su misma Histología y Fisiología, el espermatozoide es una célula que puede tolerar la criopreservación más fácilmente que otros tipos celulares, especialmente por su bajo contenido hídrico (menor al 50% del volumen de la célula); sin embargo, la formación de cristales intracelulares o extracelulares en el proceso de congelación sigue siendo el principal daño. El segundo daño más importante ocurre por la liberación de especies Reactivas de Oxígeno que y el daño al ADN⁽⁸⁾

A pesar de que múltiples patologías pueden llevar a la necesidad de criopreservar espermatozoides, los casos más estudiados son los pacientes oncológicos.⁽⁹⁾

Pero ¿Qué es la preservación de la Fertilidad? ¿En qué consiste? Definimos Preservación de la Fertilidad como la aplicación de métodos médicos, quirúrgicos o de laboratorio para preservar el potencial reproductivo de obtener descendencia genética en

adultos o niños, sean varones o mujeres, que se encuentran en riesgo de esterilidad antes del fin de su vida reproductiva estimada. ⁽¹⁰⁾

Uno de estos métodos para este propósito es la criopreservación: Los procedimientos necesarios para hacer posible la estabilización de células a temperaturas criogénicas y es una rama de la criobiología, encargada del estudio de la vida a temperaturas bajas. Los avances en esta rama han hecho posible la creación de tecnologías que permiten la conservación y desarrollo celular de una diversidad de células incluyendo los gametos masculino y femenino e incluso organismos mucho más complejos como los embriones de estadíos iniciales. ⁽¹¹⁾

En la historia más reciente, ha sido utilizado por personajes famosos en un afán de mantener la esperanza de conseguir descendencia reproductiva. Quizá, el ejemplo más conocido, fue el ciclista profesional Lance Armstrong, Estadounidense multi-galardonado cuyo ejemplo es el más adecuado para el propósito de esta tesis, ya que su lucha contra el cáncer testicular y sus esfuerzos para preservar su fertilidad fueron conocidos alrededor de todo el mundo.

A manera de un repaso breve, hemos de recordar que el testículo es una glándula endócrina y exócrina par situada en la pelvis masculina, al exterior del cuerpo. Participa en un eje hormonal perfectamente orquestado por el hipotálamo y la hipófisis a través de las Hormonas Liberadora de Gonadotropinas (GnRH), Luteinizante (LH) y FoliculoEstimulante (FSH) para mantener producción hormonal principalmente de Testosterona y de Espermatozoides para la función reproductiva. Como todo sistema coordinado, puede ser afectada por diversos mecanismos como aumento local de la temperatura, desbalances hormonales, estados de desnutrición o catabolismo acelerado, disminución de los sustratos para la fabricación de hormonas, distorsión de la circulación sanguínea, destrucción directa por citosina o crecimiento tumoral. ⁽¹²⁻¹³⁾

Como ya se revisó, la producción de un espermatozoide funcional es un proceso verdaderamente complejo. Y así de complejo es el procesamiento que una muestra espermática lleva para poder ser analizada o criopreservada. De hecho, los valores que se consideran normales o anormales han ido cambiando a través de las décadas a la luz de nuevos estudios que se publican. Como mero dato histórico se comparan a continuación, haciendo énfasis en que se usarán en nuestro trabajo los datos actualizados por la OMS en el año 2010.

Table 1. Cutoff reference values for semen characteristics as published in consecutive WHO manuals

Semen Characteristics	WHO 1980	WHO 1987	WHO 1992	WHO 1999	WHO 2010*
Volume (mL)	ND	≥2	≥2	≥2	1.5
Sperm count (10 ⁶ /mL)	20-200	≥20	≥20	≥20	15
Total sperm count (10 ⁶)	ND	≥40	≥40	≥40	39
Total motility (% motile)	≥60	≥50	≥50	≥50	40
Progressive motility [†] (%)	≥2 [†]	≥25	≥25 (grade a)	≥25% (grade a)	32 (grade a + b)
Vitality (% alive)	ND	≥50	≥75	≥75	58
Morphology (% normal forms)	80.5	≥50	≥30 [§]	14 [¶]	4
Leukocyte count (10 ⁶ /mL)	<4.7	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0

WHO = World Health Organization; ND = not defined.

* Lower reference limit obtained from lower fifth centile value.

[†] Grade a, rapid progressive motility (>25 μm/s); grade b, slow/sluggish progressive motility (5-25 μm/s); normal, 50% motility (grade a + b) or 25% progressive motility (grade a) within 60 min of ejaculation.

[‡] Forward progression (scale 0-3).

[§] Arbitrary value.

[¶] Value not defined, but strict criterion suggested.

^{||} Strict (Tygerberg) criterion.

Esteves, S. C., Zini, A., Aziz, N., Alvarez, J. G., Sabanegh, E. S., & Agarwal, A. (2012). Critical Appraisal of World Health Organization's New Reference Values for Human Semen Characteristics and Effect on Diagnosis and Treatment of Subfertile Men. *Urology*, 79(1), 16–22.

Con los avances en medicina oncológica se ha logrado proporcionar esperanza de vida a muchos pacientes con enfermedad neoplásica que antes estaban condenados a morir. Sin embargo, es bien sabido que tanto el cáncer como las terapias para eliminarlo pueden ser perjudiciales para la fertilidad masculina. Conforme los tratamientos antineoplásicos son más efectivos, el foco de interés ahora cambia ligeramente y se dirige hacia proporcionar no sólo vida, sino futura calidad de vida de los supervivientes. ⁽¹⁵⁾

Trágicamente, se ha reportado que el 37% de las muestras han sido desechadas por muerte del paciente durante la enfermedad neoplásica. ⁽¹⁶⁾ Para aquellos que han sobrevivido, el impacto de perder salud reproductiva o endocrinológica para un varón es equiparable al impacto de un estrés postraumático, según muestran diversos estudios. ⁽¹⁷⁾ Afortunadamente, la tecnología para la criopreservación también ha avanzado a pasos agigantados y actualmente la tasa de éxito para conservación de muestra espermática en paciente post púber y que se obtiene del eyaculado es aproximadamente del 90%. ⁽¹⁸⁾ Sumado a lo anterior, sabiendo que la muestra espermática puede permanecer almacenada por décadas, el reporte de un nacido vivo derivado de muestras criopreservados ostenta el récord de 28 años de almacenamiento posterior que el padre fue diagnosticado con cáncer. ⁽¹⁹⁾

A pesar de los reportes alentadores de éxito en las técnicas de reproducción asistida cuando se utilizan muestras criopreservadas por razón oncológica, solamente 6-18% de los pacientes deciden utilizar sus muestras. Los reportes recientes arrojan resultados satisfactorios al utilizar dichas muestras. Un estudio reportó una tasa de aproximadamente 36% de Nacido

Vivo al utilizar dichas muestras para Inyección IntraCitoplasmática de Espermatozoides (por sus siglas en inglés, ICSI). Una revisión sistemática también reportó una tasa de nacido vivo de 8% y de 25% cuando dichas muestras se utilizaron para procedimientos de Inseminación Intrauterina o Alta complejidad, respectivamente.⁽²⁰⁾

En otros estudios las tasas de embarazo clínico y tasas de nacido vivo han sido muy variable cuando se utiliza ICSI derivado de pacientes con muestras criopreservadas por cáncer de diferentes estirpes.⁽²¹⁾

Muchas veces, a pesar de los intentos para difundir las posibilidades de preservar fertilidad masculina, no se logra llegar a los oídos de todos los pacientes u oncólogos y cuando acuden a revisión médica con el especialista en medicina reproductiva el problema de infertilidad consecuencia del cáncer o de las terapias antineoplásicas ya está instalado y no es salvable. El punto no es que los oncólogos se rehúsen a referir a sus pacientes a un especialista en reproducción, sino que las opciones ocasionalmente son desconocidas o incluso limitadas, ya que padecer cáncer es también “ir en contra del tiempo”.⁽²²⁾

La estadística no puede ignorarse, los reportes indican que en los Estados Unidos de América 9.2% de los pacientes diagnosticados con cáncer son menores de 45 años, incluyendo 1.1% menores de 20 años.⁽²³⁾

Una encuesta de 904 masculinos de un estudio multi-institucional en 2002 encontró que 51% a 70% de los sobrevivientes jóvenes a cáncer deseaban descendencia en el futuro, incluyendo 77% de ellos que aún no tenían hijos. Tristemente, sólo 24% de ellos había preservado semen congelado (incluyendo 37% que no habían tenido descendencia). La razón más común por la cual no se había congelado esperma fue falta de conocimiento o información.⁽²⁴⁾

Se ha referido que 91% de los oncólogos concuerdan en que la preservación espermática debe ofrecerse a todos los varones antes del tratamiento antineoplásico. ¡A todos! Desgraciadamente, 48% de los oncólogos de la encuesta nunca mencionaron el tema a sus pacientes, aun cuando eran candidatos adecuados para la preservación. La razón más común para esto fue la falta de tiempo durante la consulta, falta de instalaciones para referencia y los costos.⁽²⁵⁾

La espermatogonia es especialmente sensible a quimioterapia y radioterapia. El efecto, que es dosis-dependiente, puede ser temporal o permanente.⁽²⁶⁾ Para muchas de estas terapias el efecto puede ser leve, alterando los ejes hormonales reproductivos. Sin embargo, los

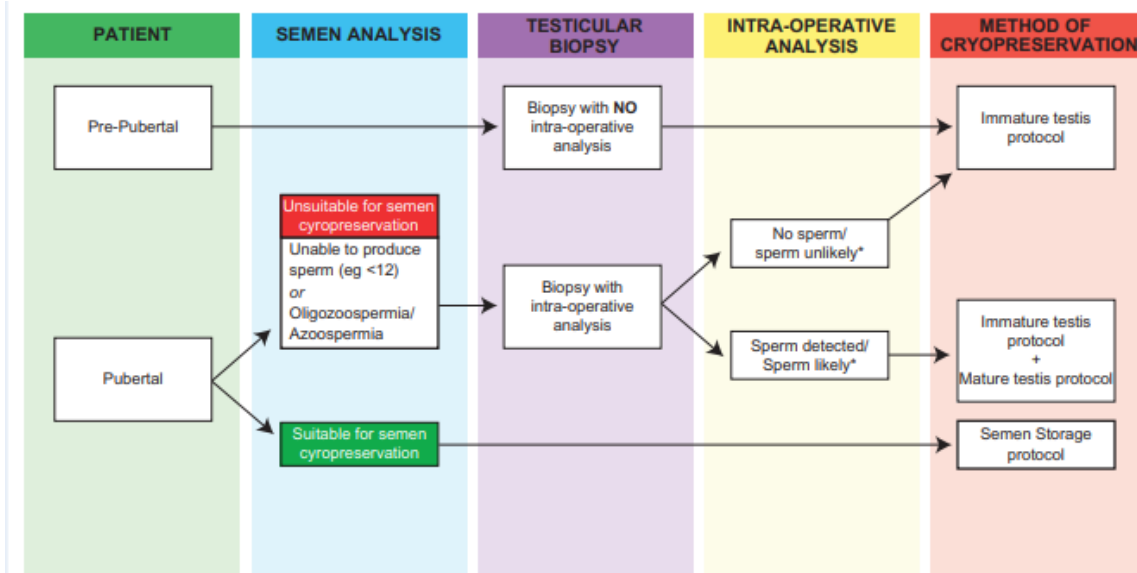
tratamientos quirúrgicos suelen ser más radicales, afectando parcial o totalmente la fertilidad del paciente. (27)

Table 2 Commonly used chemotherapeutic agents and fertility risk

Drug class	Common agents	Mechanism of action	Risk for prolonged or permanent infertility	Risk of azoospermia (> 2 years)
Alkylating agents	Busulfan Chlorambucil Chlormethine Cyclophosphamide Dacarbazine Ifosfamide Melphalan Procarbazine Temozolomide	Cytotoxic: Alkylation of DNA molecules, inducing double-strand DNA breakage and apoptosis	High	> 25%
Platinum agents	Carboplatin Cisplatin Nedaplatin Oxaliplatin	Cytotoxic: Crosslink DNA, inhibiting DNA synthesis and repair, inducing apoptosis	High	20–47%
Anthracyclines	Daunorubicin Doxorubicin Epirubicin Mitoxantrone Idarubicin Valrubicin	Cytostatic: DNA intercalation, Topoisomerase inhibition, and Histone deregulation inhibiting cell cycle progression	Intermediate	Only in combination with Alkylating or Platinum agents
Antimetabolites	5-Fluorouracil 6-Mercaptopurine Capecitabine Cytarabine Floxuridine Gemcitabine Hydroxycarbamide Methotrexate Pemetrexed	Cytostatic: Masquerade as purine or pyrimidine incorporating into DNA and halting DNA synthesis, induces cell cycle arrest	Low/temporary	–
Nucleoside analogs	Abacavir Didanosine Entecavir Lamivudine Stavudine Tenofovir Zidovudine	Cytostatic: Inhibit DNA replication by incorporation into DNA and halting DNA polymerase, inducing cell cycle arrest	Low/temporary	–
Vinka alkaloids	Vinblastine Vinorelbine Vincristine Vindesine	Cytotoxic: Inhibition of microtubule formation, inducing cell cycle arrest and apoptosis	Low/temporary	–
Antitumor Antibiotic	Bleomycin	Cytotoxic: Induction of DNA strand breaks	Low/temporary	–

La eyarquía, o primera eyaculación en la vida de un varón, marca un punto de corte para decidir los tratamientos de preservación de Fertilidad. En varones prepúberes puede efectuarse con reubicación quirúrgica de los testículos (en caso de que el tratamiento antineoplásico sea radiación) o con Criopreservación de Tejido Testicular Inmaduro. (28)

La criopreservación espermática es el único método establecido para preservación de la fertilidad en varones postpúberes, ya sean adolescentes o adultos. En caso de problemas eyaculatorios se les asiste con electroeyaculación o estimulación peneana vibratoria. Para varones prepúberes el algoritmo es algo más complicado e incluye extracción testicular de espermatozoides (TESE), conservación de tejido testicular inmaduro con posterior autotransplante o conservación de espermatogonias. (29)



Picton HM, Wyns C, Anderson RA, Goossens E, Jahnukainen K, Kliesch S, Mitchell RT, Pennings G, Rives N, Tournaye H et al. A European perspective on testicular tissue cryopreservation for fertility preservation in prepubertal and adolescent boys†. *Hum Reprod* 2015;30: 2463–2475.

Nos enfocaremos en los varones post púberes para cumplir los objetivos de esta tesis. La reanudación de la espermatogénesis posterior a ciertos tipos de terapia antineoplásica es impredecible, de forma que los estudios en sobrevivientes de cáncer han mostrado impacto con variaciones desde la azoospermia en un 24% de los pacientes hasta la procreación espontánea en otros pacientes sin requerir tratamientos de fertilidad. ⁽³¹⁾

El cáncer afecta la fertilidad de acuerdo a diversos mecanismos. Los tumores pueden promover respuestas autoinmunes que en un efecto cruzado produzcan actividad antiespermática disminuyendo la motilidad espermática, o liberando al torrente circulatorio citosinas y factores endócrinos que provoquen afectación de las células de Leydig o de las células germinales espermáticas. Incluso, la misma fiebre producida por distintos tipos de neoplasias hematológicas dañan severamente los parámetros seminales. Por si fuera poco, el estado hipermetabólico inducido por las neoplasias lleva al paciente a una deficiencia de vitaminas, microelementos, aminoácidos y sustratos necesarios para las enzimas de las vías metabólicas que influyen la espermatogénesis. Los tumores se encuentran además en un estadio de recambio celular acelerado, incluyendo generación y apoptosis rápida de nuevas células tumorales, liberando a la circulación y de manera local también desechos celulares tóxicos para las células de la línea espermática. ⁽³²⁻³³⁾

Los tumores testiculares son los que mayor afectación de los parámetros seminales presentan cuando se analizan las muestras ya sea en fresco o posterior al proceso de congelación y descongelación. ⁽³⁴⁾ De hecho, partiendo de la premisa anterior, se han hecho sugerencias acerca de la consejería de criopreservación de la fertilidad en caso de recibir diagnóstico de cáncer testicular (y también de leucemias) para favorecer el resguardo de más número de viales. ⁽³⁵⁾ Cabe mencionar aquí que en la premura y la urgencia de iniciar las terapias antineoplásicas no siempre es posible cumplir con el paradigma de mantener una abstinencia sexual de 2-5 días para otorgar una muestra espermática, de forma que se han comparados resultados que cumplen abstinencias de 24-48 hrs contra 48-72 hrs y los parámetros posteriores a la prueba de descongelación no muestran diferencia estadística significativa. ⁽³⁶⁾

En el caso de los tumores testiculares afectan la fertilidad al alterar la espermatogénesis con la destrucción del tejido adyacente al tumor, secreción parácrina de Gonadotrofina Coriónica Humana y otros factores citotóxicos, elevación de la temperatura intraescrotal y derivaciones anormales de la circulación intratesticular. La creación de nuevos vasos sanguíneos a través de la angiogénesis del tumor, conocida como vasculogénesis de origen tumoral, se origina en las células cancerosas, las cuales a través de factores endoteliales, factores de crecimiento, factores proapoptóticos y citocinas promueven la creación de vasos sanguíneos nutricios que “desatienden” las necesidades metabólicas de las células sanas. ⁽³⁷⁾

Algunos de los estudios básicos solicitados para la preservación de semen por razón oncológica incluyen serología para VIH tipo 1 y 2, Anticuerpo anti-hepatitis C, antígeno de superficie de hepatitis B, anticuerpo antinuclear de hepatitis B (IgM e IgG), serología para sífilis, Gonorrea y chlamydia Tracomatis. Citomegalovirus y virus T-linfotrópico humano tipo 1 y 2 (HTLV) ⁽³⁸⁾

4. JUSTIFICACIÓN

El diagnóstico de cáncer ya no es una sentencia de muerte. Conforme los tratamientos antineoplásicos ayudan a más pacientes a sobrevivir al cáncer se plantea una situación posterior que debe aclararse con urgencia: ¿Qué ocurre con los deseos de fertilidad de los pacientes que recibieron terapias gonadotóxicas y que desean procrear al sobrevivir a una neoplasia?

A decir verdad, la opción de la preservación masculina post puberal no siempre se ofrece a los pacientes a quienes se les diagnostica cáncer; irónicamente, la obtención de la muestra espermática es muy sencilla y simplemente requiere acudir a un centro con instalaciones adecuadas para la criopreservación de dichas muestras.

Primordialmente, debemos entender en este trabajo que el daño espermático ya está instalado en muchos de los pacientes que acuden a preservación de la fertilidad por razón oncológica. Por ejemplo, Auger y colaboradores publicaron que sólo 50.9% de los pacientes con diagnóstico de cáncer testicular otorgaban una muestra que podría catalogarse como normozoospermia. ⁽³⁹⁾ Para McKenna y colaboradores la normozoospermia se presentó solamente en un 44% de sus pacientes con diagnóstico de cáncer testicular. En este último estudio se observó que el proceso mismo de criopreservación reducía la Cuenta Total Móvil (CTM) y la motilidad progresiva en un 37% y 32% respectivamente. También en este estudio, se comparó la proporción de pacientes que eran diagnosticados con oligozoospermia severa (concentración espermática menor a 5 millones / mililitro) antes y después del proceso de criopreservación y el resultado arrojó que 32% de las muestras lo eran previo a la criopreservación y 43% después, infiriendo que un porcentaje de dichas alteraciones van ligadas al proceso mismo de criopreservación. ⁽⁴⁰⁾

Ofrecer la posibilidad de generar descendencia a un paciente que ha enfrentado un evento tan traumático como el cáncer es mandatorio. Y ya habiendo acudido el paciente a preservar sus muestras, es muy justificable conocer el comportamiento que tienen estas muestras en el proceso de congelación y descongelación para tratar de garantizar el mínimo de muestras necesarias a un varón con el cual pueda obtener descendencia genética.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Hay diferencia entre parámetros seminales de muestras pre- y post- capacitación espermática y prueba de descongelación en pacientes que acuden a preservación oncológica comparada con la población general?

6. HIPÓTESIS

6.1 HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

Hay diferencia entre los parámetros seminales de las muestras pre- y post- capacitación espermática y prueba de descongelación en pacientes que acuden a preservación oncológica comparada con la población general.

6.2 HIPÓTESIS NULA

No hay diferencia entre los parámetros seminales de las muestras pre- y post- capacitación espermática y prueba de descongelación en pacientes que acuden a preservación oncológica comparada con la población general.

7. OBJETIVOS

7.1 OBJETIVO PRINCIPAL

- Comparar la respuesta a pruebas de descongelación que existe entre un paciente que acude a preservación espermática por razón oncológica contra la población general y donadores aceptados.

7.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Conocer los parámetros espermáticos iniciales de los pacientes que han acudido a preservación oncológica en Centro de Fertilidad IECH Monterrey
- Comparar la Cuenta Total Mótil en las pruebas de congelación y descongelación de estos pacientes contra grupo control (candidatos a donadores y donadores espermáticos aceptados).
- Analizar los parámetros espermáticos de pacientes que acuden a preservación de Fertilidad por razón oncológica en una prueba de capacitación espermática en comparativa con pacientes de la población general.
- Analizar la respuesta de las muestras de pacientes por preservación de Fertilidad Oncológica en cuanto a su Capacitación espermática.
- Revisar el porcentaje de disminución de concentración espermática y motilidad de los pacientes oncológicos sometidos a prueba de congelación y descongelación.
- Establecer comparación entre los subgrupos de pacientes oncológicos para conocer su respuesta a la prueba de descongelación divididos de acuerdo a su concentración espermática.
- Valorar si los protocolos de criopreservación en nuestro Centro de Fertilidad IECH reportan cifras similares a las publicadas en la literatura médica.
- Obtener recomendaciones para el protocolo de congelación de semen en pacientes oncológicos en el IECH.

8. METODOLOGÍA

8.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

- Cohorte Retrospectiva, comparativo y transversal.

8.2 MATERIAL Y MÉTODOS:

Se incluyeron pacientes post púberes masculinos que acudieron a preservación de fertilidad de 2000 a 2018.

Los pacientes acudieron voluntariamente a través de la publicidad y mercadotecnia de nuestro Centro de Fertilidad o referidos por algún médico oncólogo para preservar muestras seminales. Inicialmente se agendó una consulta médica que incluía el interrogatorio de antecedentes médicos, personales patológicos, no personales patológicos y el Padecimiento actual.

Durante la consulta se les indicó toma de muestra para serología para Antígeno de Superficie de Hepatitis B, Anticuerpos Anti-Hepatitis C y Elisa para Virus de Inmunodeficiencia Humana.

Se otorgó un recipiente estéril “Plastic World” y se solicitó al paciente acudir a un cuarto privado para depositar su muestra espermática. Dada la premura del inicio de los tratamientos antineoplásicos, en algunas ocasiones no se cumplía con el mínimo de días de abstinencia sexual requerido según los lineamientos de la OMS 2010. Al término de la recolección de la muestra espermática, el paciente la etiqueta con sus datos personales y es entregada al personal de Laboratorio de Andrología de nuestro Centro de Fertilidad de forma inmediata para que el análisis ocurra en un tiempo menor a 1 hora.

El análisis de dicha muestra espermática incluye la examinación macroscópica y microscópica (ya explicada previamente en otra sección de esta tesis). Se procede posteriormente a lavado simple de la muestra y, dependiendo de los datos recabados en el análisis microscópico si cumplen los criterios mínimos de la OMS 2010, se decide si la muestra va a congelación o pasa a separación por gradientes de densidad. Recordemos que de la alícuota conformada con el botón que contiene los

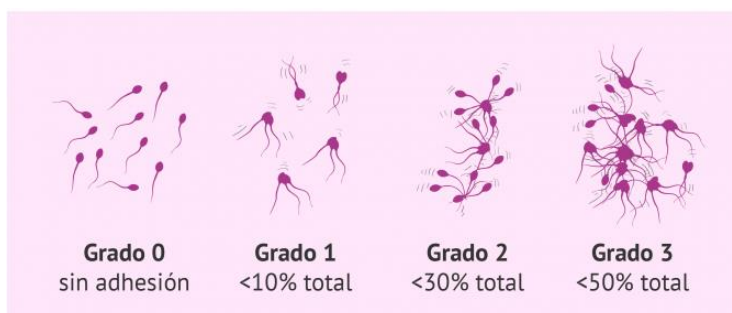
espermatozoides + MHTF %5 + el Criopreservador se toman 200 microlitros para efectuar al día siguiente la prueba de descongelación. La muestra permanece en un tanque de Nitrógeno líquido a temperatura de -190.1 a -200 °C, conserva su etiqueta con los datos personales del paciente y se incluye en un número de vial, canastilla, bastón y tanque específico.

Macroscópica.

- La licuefacción: El semen se encuentra al momento del eyaculado como una masa semisólida coagulada. Pocos minutos después la enzima fibrinolisina (producida en vesículas seminales) empieza a licuarla en un lapso de 15 minutos.
- Volumen: Se evalúa después de la licuefacción y se aspira con pipeta.
- Color del eyaculado: se valora a contra luz tomando como normal un color blanco crema.
- Viscosidad: se determina tomando la muestra a través de una jeringa de 18G.
- pH: Se valora posteriormente a la licuefacción colocando una gota de muestra sobre una tira indicadora de pH por 30 segundos antes de darle lectura. Un pH excesivamente ácido puede hablar de alteración de las vesículas seminales (ya sea inflamación, infección, agenesia, etc). En contraste, cuando el pH es excesivamente alcalino deben sospecharse alteraciones en la función de la próstata.

Microscópica (empleando un microscopio de contraste de fase para el examen de todas las revisiones del semen en fresco. Inicialmente en un objetivo de 10x para distinguir áreas de posible formación de moco, aglutinación o presencia de células distintas a espermatozoides. Del mismo modo ayuda a decidir el tipo de dilución que se utilizará en la cámara de Neubauer.

- Agregación: Implica agregación de espermatozoides inmóviles a moco o restos celulares.
- Aglutinación: Se refiere específicamente a la unión de espermatozoides móviles entre sí. El Reporte depende del grado de afectación presente en los cúmulos.



- Elementos celulares distintos a Espermatozoides: incluye células epiteliales del tracto urinario, leucocitos o células germinales inmaduras. (las últimas dos nombradas como células redondas). Se identifican con visión en objetivo 1000x.
- Motilidad: Se evalúa lo antes posible después de licuada la muestra. Se colocan 10 microlitros de semen en el portaobjetos y se cubre con cubreobjetos de 22x20mm y se observan bajo el objetivo de 40x. se evalúan al menos 5 campos. Y se reporta finalmente un promedio de los valores revisados. Los rangos son motilidad progresiva (espermatozoides con movimiento lineal y en círculos grandes, independientemente de su velocidad). Motilidad no progresiva (cualquier patrón de motilidad con ausencia de progresión). Inmóvil (sin movimientos)
- Vitalidad: Se determina en un lapso de 30 a 60 minutos de proporcionada la muestra. El rango se ubica en al menos 58% de los espermatozoides del eyaculado. Se toman 50 microlitros de muestra y se mezclan con 50 microlitros de eosina-negrosina en una placa de porcelana y se realizan al menos dos barridos distintos con 10 microlitros de la mezcla, al secar se observan con objetivo de 100x. Los espermatozoides con tinción blanca o rosada en la cabeza se consideran viables. Aquellos con color rojo o rosa intenso se consideran muertos. Otra forma de evaluar la viabilidad de la muestra es con la prueba de “shock hiposmótico”, en especial utilizado cuando se usarán en alguna técnica de reproducción asistida, como ICSI. Una solución hipoosmolar provoca ensanchamiento de algunas partes de los espermatozoides, especialmente enrollamientos de la cola, que sí son viables.
- Cuenta y Concentración espermática: para esta evaluación se utiliza la cámara de Neubauer en un lapso no mayor a 15 minutos. Se requiere contar al menos 200 espermatozoides en los cuadrantes de dicha cámara y calcular la dilución en al menos 2 observaciones para obtener el promedio de las mismas. Se requieren

muestras de al menos 15 millones/ml de espermatozoides.

- **Morfología:** entendemos por morfología normal una célula que contiene una cabeza ovalada en la que se distinguen perfectamente la zona acrosómica cubriendo 1/3 parte del polo cefálico con una longitud de 3-5 micras y 2-3 micras de anchura. La pieza intermedia es delgado y recto alineada con el eje longitudinal de la cabeza y mide 7-8 micras de longitud. La cola debe ser única, delgada y sin enrollarse con una longitud de 45-55 micras. Cualquier espermatozoide que no cumpla estos requisitos se considera anormal o amorfo.

Tabla. Valores de referencia (1999) y los nuevos (2010) del límite de referencia inferior (LRI) en espermiograma; entre paréntesis se muestra el intervalo de confianza del 95%

	1999, 4^{ta} edición³	2010, 5^{ta} edición⁴
	Valor de referencia	Límite inferior de referencia, LRL
Licuefacción	Total a los 60 min	Total a los 60 min
pH	7,2-7,8	≥7,2
volumen	2,0 mL	1,5 mL (1,4-1,7)
Concentración espermática	20 x 10 ⁶ /mL	15 x 10 ⁶ /mL (12-15)
Concentración total	40 x 10 ⁶	39 x 10 ⁶ (33-46)
Motilidad total (progresivos + no progresivos)	No detallada	40% (38-42)
Motilidad progresiva	50%	32% (31-34)
Viabilidad	75%	58% (55-63)
Formas normales	15%	4% (3-4)
Leucocitos	< 1 x 10 ⁶ /mL	< 1 x 10 ⁶ /mL

- **Lavado Simple de Muestra espermática:** es una de las técnicas más sencillas y económicas y está al alcance de la mayoría de los laboratorios, proporcionando buen número de espermatozoides recuperados. Inicialmente se centrifuga la muestra con medio de cultivo MHTF 5% HSA a 500rpm/10 minutos. Los espermatozoides quedan en el fondo del tubo, formando un botón, y el sobrenadante se elimina. Finalmente el pellet que contiene los espermatozoides se resuspende en 0.8ml de medio de cultivo MHTF 5% HSA (recordar que en muestras de preservación de fertilidad oncológica se usa la cantidad de 0.5ml, ya que otro 0.5 ml será de Criopreservador para formar una alícuota de 1ml). El vial ya constituido se incuba a 37°C
- **Separación por Gradientes de Densidad:** es de los procedimientos más usados para conseguir una muestra con buena motilidad y progresión. Utiliza la solución PureSperm (coloide de partículas de sílice recubiertas con polivinilpirrolidona –

PVP-). Inicia el procedimiento al recibir la muestra etiquetada propiamente y realizarse el análisis macroscópico y microscópico. Se separa la muestra en al menos dos partes iguales colocadas en la parte superior de “gradientes discontinuos de densidad” previamente separados. Se centrifuga a 1000 rpm/20 minutos y se obtiene el paquete, se lava con 2ml de MHTF 5% HSA y nuevamente a 500rpm/10 min. Se desecha el sobrenadante y se deja el botón para volver a resuspenderse con medio MHTF 5% HSA, generalmente 0.8ml (aunque el volumen final puede resuspenderse en una cantidad ligeramente diferente). Se incuba posteriormente a 37°C hasta el momento de la utilización.

- Criopreservación de Espermatozoides: Partiendo de la premisa de que los procesos vitales en las células requieren de cambios bioquímicos y movimientos de moléculas en medio acuoso, podríamos pensar que la congelación de dicho medio acuoso a temperaturas suficientemente bajas podría detener esos procesos y mantener la célula en un estado de animación suspendida para posteriormente ser descongelada sin daño y volver a reanimar sus procesos vitales. Esta es la base teórica de la Criopreservación Espermática. El proceso consiste en la evaluación inicial de la muestra y posterior dilución a razón 1:1 con el medio crioprotector (TEST yolk Buffer – Irvine Scientific), recordando que la mayoría de los viales que entrarán a este proceso ya están constituidos en una alícuota de 0.8ml, de forma que se retirarían escasos mililitros para constituir una alícuota total de 1ml. La muestra se mezcla cuidadosa y lentamente hasta homogeneizar. Los viales constituidos se colocan en contacto con vapor de Nitrógeno líquido y se deja varias horas. Para este momento el vial está identificado con nombre completo del paciente, color específico, número de tanque, número de canastilla, número de bastón y número de vial. Bajo estas condiciones, el vial puede permanecer criopreservado por años.

8.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN

Criterios de inclusión

1. Pacientes que acuden con deseo de preservación de fertilidad masculina por razón oncológica.
2. Pacientes que leyeron y aceptaron los términos del consentimiento informado y el aviso de privacidad.
3. Pacientes post púberes.

Criterios de exclusión

1. Pacientes incapaces de proporcionar una muestra espermática a través de masturbación.
2. Pacientes con disfunción eyaculatoria o necesidad de utilizar dispositivos de electroestimulación.
3. Expedientes o reportes incompletos.
4. Pacientes que ya han iniciado terapias gonadotóxicas.

Criterios de eliminación

1. Pacientes que deciden descongelar sus muestras por razones personales.
2. Pacientes en los cuales no fue posible realizar análisis o capacitaciones de las muestras.
3. Pacientes que trasladan sus muestras a otro Centro de Fertilidad.

8.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La captura de datos se realizó de manera manual, seleccionando las variables relacionadas con el perfil sociodemográfico y clínico de las pacientes; los datos fueron capturados en una base de datos desarrollada en Excel Microsoft Office 365 para posteriormente ser analizados en el programa IBM SPSS v25 y en R STUDIO 1.0.136 – 3.3.2.

Análisis inicial

Se determinaron valores de tendencia central, desviación estándar, análisis de normalidad e histogramas de frecuencia para variables cuantitativas. Se determinaron proporción de frecuencia, porcentaje en relación al total de entradas además de proporción de frecuencia para escalas al estudiar variables categóricas.

Análisis de población

Se evaluaron datos demográficos y antecedentes que prevalecieron en la muestra que pudieran ser de interés.

Análisis comparativo e inferencial

Se agruparon a los pacientes conforme a si pertenecían al grupo de donadores o candidatos a donadores espermáticos o al grupo de pacientes oncológicos, a partir de este punto de comparación se estudiaron las relaciones entre las variables paramétricas y no paramétricas. Para la comparación de medias de variables cuantitativas se realizaron pruebas t de Student ajustado a normalidad de dos colas, a tomar como significativo un valor de $p < 0.05$. Otros resultados fueron interpretados por el autor reportándose datos interesantes para el estudio. En caso de requerirse se realizó GLM para múltiples variables a comparar en función de la varianza.

Para los muestreos categóricos a comparar se empleó prueba de Fisher o la distribución χ^2 según la característica de la contingencia, para describir las diferencias entre los grupos de comparación, se tomó un valor significativo de $p < 0.05$.

Adicionalmente, se realizaron correlaciones de Pearson para evaluar la relación entre las variables cuantitativas.

9. RESULTADOS

En la primer tabla de resultados podemos observar datos quizá ya sospechados: sí existe una diferencia estadística significativa entre los pacientes candidatos a donantes cuando se comparan con los pacientes oncológicos en cuanto a Edad, Días de abstinencia, Cuenta /Concentración (Millones/ml), Cuenta total (Millones), Motilidad Total, Cuenta Total Mótil y Morfología. Debe remarcarse que en este caso, el Grupo de Candidatos a donantes representa la población general, una población que acude a realizar un estudio espermático a nuestro Centro de Fertilidad y cuyos parámetros pueden salir normales o disminuidos. Pareciera que en la población de pacientes oncológicos, el proceso neoplásico ha dañado los procesos ya descritos previamente y ha llevado en detrimento las muestras proporcionadas por los pacientes.

TABLA #1	Candidatos a Donantes	Pacientes Oncológicos	p
	N: 568	N: 68	
Edad	24.21 ±4.12	28.4 ±6.66	<0.001
Días de abstinencia	2.63 ±0.96	2.12 ±0.65	<0.001
Volumen (ml)	3.04 ±1.31	3 ±2.23	0.8254
Cuenta (millones/ml)	93.1 ±50.87	36.92 ±33.5	<0.001
Cuenta total (millones)	270.57 ±171.29	110.13 ±141.91	<0.001
Motilidad total (Porcentaje)	54.27 ±11.3	44.43 ±15.06	<0.001
Cuenta Total motil (Millones)	153.76 ±105.46	54.9 ±73.34	<0.001
Morfología Normales (porcentaje)	3.76 ±1.61	2.07 ±1	<0.001
Prueba t de student. Significancia en valor de p debajo de 0.05.			

Cuando analizamos la Tabla #2 encontramos un grupo más selecto de pacientes, ya que el grupo #1 se circunscribe a los donantes a quienes se les practicó una prueba de capacitación y de congelación – descongelación. Lo anterior reduce considerablemente la N pero nos deja un grupo más homogéneo para comparar los parámetros de interés y de ahí que obtenemos datos interesantes. Nuevamente encontramos diferencia con impacto estadístico en el análisis en fresco de la muestra en el rubro de edad, días de abstinencia, cuenta / concentración espermática, cuenta total, motilidad total, cuenta total mótil y morfología de Kruger. Al avanzar a la prueba de Capacitación de las muestras de los candidatos a donantes y compararla con los pacientes oncológicos vemos que solo el volumen no representa una diferencia estadística significativa, por otro lado la concentración espermática, la motilidad total, la cuenta total mótil y la morfología normal de Kruger presentan diferencia estadística. Al someter las muestras a la prueba de congelación y descongelación se mantiene la diferencia estadística con marcada importancia en el parámetro de cuenta / concentración y en la motilidad.

TABLA #2	Donantes	Pacientes Oncológicos	p
	N: 85	N: 68	
Edad	24.33 ±3.86	28.4 ±6.66	<0.001
Días de abstinencia	2.68 ±1.16	2.12 ±0.65	<0.001
Volumen (ml)	3.57 ±1.34	3 ±2.23	0.0514
Cuenta (millones/ml)	135.66 ±49.35	36.92 ±33.5	<0.001
Cuenta total (millones)	435.13 ±167.66	110.13 ±141.91	<0.001
Motilidad total (Porcentaje)	61.19 ±4.74	44.43 ±15.06	<0.001
Cuenta Total motil (Millones)	263.6 ±94.49	54.9 ±73.34	<0.001
Morfología Kruger Normales (porcentaje)	4.6 ±1.25	2.07 ±1	<0.001
Volumen (ML) Capacitación	1 ±0	0.93 ±0.35	0.0844
Cuenta (Millones/ML) Capacitación	90.54 ±24.65	27.46 ±23.33	<0.001
Cuenta total Móvil (Millones) Capacitación	85 ±22.72	24.36 ±27.32	<0.001
Motilidad Total (%) Capacitación	94.02 ±1.95	67.35 ±28.38	<0.001
Normales (%) Capacitación	7.11 ±1.97	2.65 ±1.53	<0.001
Cuenta(Millones / ML) Prueba de descongelación	81.78 ±18.14	22.24 ±20.17	<0.001
Motilidad (%) Prueba de descongelación	60.75 ±4.86	34.14 ±25.76	<0.001
Prueba t de student. Significancia en valor de p debajo de 0.05.			

Si el análisis se enfoca exclusivamente al análisis de la cuenta / concentración espermática surgen datos de interés, mostrados en la Tabla #3. Se subdividió la población en 3 grupos tomando como base los pacientes oncológicos y el rubro de cuenta / concentración espermática y se obtuvieron 3 grupos. El 1er grupo concentró pacientes con cuenta <5 millones/ml (oligozoospermia severa), el 2º grupo contiene pacientes con cuenta espermática entre 5-15 millones/ml mientras que el 3er grupo consta de pacientes con Concentración espermática normal >15 millones/ml. Cuando hacemos una comparación en la cuenta / concentración espermática entre las muestras capacitadas contra las muestras posteriores a la prueba de congelación / descongelación podemos notar que el único grupo donde hay una reducción significativa de la cantidad de espermatozoides por mililitro es en el grupo cuyo conteo era normal (pasando por una reducción de 20.56%), no así en el grupo de oligozoospermia –reducción de 3.22%- u oligozoospermia severa –reducción de 4.5%-, ya que en estos dos últimos no hubo impacto estadístico significativo.

TABLA #3	Promedio	N	Desviación estándar	Correlación	p	Cambio
OLIGOZOOSPERMIA SEVERA						
Cuenta(millones / ml) Prueba de descongelación	1.325	8	1.26576	0.996	0.351	4.5%
Cuenta (MILLONES/ML)	1.3875	8	1.39431			
OLIGOZOOSPERMIA						
Cuenta(millones / ml) Prueba de descongelación	7.5	4	1	0.87	0.391	3.22%
Cuenta (Millones/ml)	7.75	4	0.95743			
CUENTA NORMAL						
Cuenta (millones / ml) Prueba de descongelación	26.2786	56	19.98579	0.937	<0.001	20.56%
Cuenta (Millones/ml)	33.0821	56	22.35625			
Correlaciones de Pearson. Significancia en valor de p debajo de 0.05. Pacientes oncológicos: Oligozoospermia severa: 11.7%, Oligozoospermia: 5.8%, Concentración normal: 82.3%						

Ahora trasladándonos al rubro de Motilidad total en los pacientes oncológicos se

despliega la tabla #4. En esta podemos observar 2 subgrupos: los pacientes que otorgaron una muestra catalogada según los criterios de la OMS 2010 como normal y aquellos que otorgaron una muestra con motilidad Anormal. De los 68 pacientes, 6 otorgaron una muestra con motilidad total por debajo del requisito, representando un 8.82%. en el grupo de motilidad normal la motilidad inicial fue de 73.82% antes de la prueba de descongelación y 37.67% posterior a esta, representando una disminución de 48.96% del valor inicial y con impacto estadístico significativo. En el Grupo que inicialmente mostró motilidad anormal, inicialmente se observaba un 10% previo a la prueba de descongelación y 2.85% posterior a ésta. Se resume una disminución del 71.43% en este grupo.

TABLA #4 GRUPO MOTILIDAD TOTAL NORMAL Y ANORMAL EN PACIENTES ONCOLÓGICOS						
Normales	Promedio	N	Desviación Estándar	Correlación	P	% cambio
Motilidad Total (%) Inicial	73.8226	62	21.4044	0.551	<0.001	48.96%
Motilidad (%) Prueba descongelación	37.6774	62	24.76431			
No normales						
Motilidad Total (%) Inicial	10	6	14.14	0.899	0.129	71.43%
Motilidad (%) Prueba descongelación	2.857	6	3.9			
Correlaciones de Pearson. Significancia en valor de p debajo de 0.05.						

10. DISCUSIÓN

En cuanto a que las muestras proporcionadas por los pacientes oncológicos presentan parámetros espermáticos más comprometidos que la población general el consenso parece evidente. En un estudio realizado por Agarwal A. se presentó la evidencia de 20 años de experiencia de conservación espermática por razón oncológica y esos resultados coinciden con los nuestros. ^(36, 41)

En el estudio realizado por Said y colaboradores también se evidencia concordancia con nuestro estudio. Las muestras obtenidas de pacientes con cáncer tenían menor concentración espermática, menor motilidad y menor tasa de supervivencia a la criopreservación. Un punto de la controversia entre las muestras criopreservadas es que para Said et. Al, el plasma seminal es protector contra los efectos deletéreos que el proceso de criopreservación tiene contra el espermatozoide, dato relevante ya que en el procesamiento de dichas muestras en nuestro Centro de Fertilidad incluye la eliminación de la mayoría del mismo. ⁽⁴²⁾

Para muestras que entran a protocolos de congelación y descongelación, la estadística de la literatura publicada tiene cercanía con los datos obtenidos y mostrados en la tabla #2. Tradicionalmente se ha mencionado que sólo el 50% de la cuenta espermática sobrevive al proceso de criopreservación y descongelación, y nuestra tabla muestra porcentajes similares. ⁽⁴³⁾

En los pacientes oncológicos, que aparecen en la tabla #3, podemos ver que aquellos que no caen dentro del diagnóstico de oligozoospermia pueden conseguir fácilmente el número aceptado de 5-10 millones de Cuenta Total Mótil (CTM) para ser candidatos a procedimiento de Inseminación Intrauterina. Así lo comenta Nangia et. Al. En sus guías clínicas se hace la sugerencia de garantizar, en caso de ser posible, al menos 6 inseminaciones intrauterinas a esta población de pacientes. Partiendo de los datos de la tabla #3 no habría tanto problema en los pacientes oncológicos que no caen en oligozoospermia, pero sí lo habría en este porcentaje de pacientes, ya que para reunir al menos un vial con ese requisito de CTM algunos pacientes deberían dar varias muestras. ⁽⁴⁴⁾

En estudios realizados en muestras de semen criopreservadas tanto por cáncer como por oligozoospermia severa, se ha demostrado que la predicción de una mala recuperación posterior a la descongelación aparece con mayor frecuencia en muestras que inicialmente caían por debajo del percentil 5 según los valores de la OMS 2010, independientemente del

motivo por el cual se criopreservara la muestra. De hecho, si la motilidad y la viabilidad se encuentran en rangos normales pero la concentración espermática es menor al percentil 5 no puede garantizarse una recuperación adecuada de la muestra posterior a la prueba de descongelación. Esto aplica especialmente al cáncer testicular, pero no puede generalizarse al resto de las estirpes neoplásicas donde los resultados son más inconsistentes y variados. Sin embargo cuando se revisa la tabla #3 de nuestro estudio, la pérdida de concentración espermática en el proceso de descongelación en pacientes con oligozoospermia severa y oligozoospermia no presentó diferencia estadística significativa, solamente la hubo en aquellos pacientes que, contrario a Degl'Innocenti et al, acudían reportando concentraciones espermáticas normales. Cabe destacar que la población de nuestro estudio en cuanto a reportarse como oligozoospermia u oligozoospermia severa es muy reducida. ⁽⁴⁵⁾

Para MacKenna A los resultados son similares a los nuestros. En su estudio de más de 500 pacientes con cáncer, evaluando las muestras pre y post congelación, 12.7% presentaron con oligozoospermia severa y 35% con oligozoospermia, mientras que 44.3% fueron normales en cuanto a concentración. Al analizar la CTM esta fue 12 previo a congelación y 7 posterior a la misma (con diferencia significativa) representando una reducción de 32%. Mientras que en nuestra tabla #4 en nuestro estudio también existe una diferencia estadísticamente significativa pero es mucho mayor, del 48.9% en los pacientes que inicialmente mostraron motilidad total normal mientras que en aquellos que se presentaron con astenozoospermia la diferencia fue de 71.43%. ⁽⁴⁰⁾

11. CONCLUSIONES

De este Trabajo podemos concluir varios puntos. Primeramente, sigue siendo papel crucial de los médicos referidores proporcionar una oportunidad de preservar fertilidad a los varones que han recibido el diagnóstico de cáncer, y así mismo es mandatorio por los Médicos Biólogos de la Reproducción, conocer las técnicas que les facilitarán lograr este objetivo.

Posterior a nuestros análisis, se observa que aquellos varones que sí acuden a un centro de Fertilidad para preservación de muestra espermática, tienden a mostrar parámetros seminales más deteriorados que la población general; sin embargo, si sus parámetros ya encajaban en el diagnóstico de oligozoospermia severa no existió diferencia estadística significativa entre la muestra previa y posterior a las pruebas de descongelación.

Como se comentó en el marco teórico, podría tratar de instituirse un mínimo de Cuenta Total Mótil (CTM) que garantice un porcentaje promedio de embarazos comparados con la población general, de forma que pudiera solicitarse, en la medida posible del tiempo para las terapias antineoplásicas, mayor cantidad de muestras a estos pacientes hasta q logaran obtenerse 2 viales con CTM en rango de 5-10 millones para un mínimo de 2 Inseminaciones Intrauterinas y 1 vial más en caso de necesitar técnicas de reproducción de alta complejidad.

Definitivamente algunos parámetros contienen poblaciones muy pequeñas en el estudio para emitir alguna conclusión con peso científico, así que hacen falta trabajos que amplíen su población de estudio y nos proporcionen más luz en este tema.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Stefania Ferrari, Alessio Paffoni, Francesca Filippi, Andrea Busnelli, Walter Vegetti, Edgardo Somigliana, Sperm cryopreservation and reproductive outcome in male cancer patients: a systematic review, *Reproductive BioMedicine Online* (2016).
2. Lee SJ, Schover LR, Partridge AH, et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. *J Clin Oncol*. 2006;24(18): 2917–31.
3. Daniel M. Stein, Fertility Preservation Preferences and Perspectives Among Adult Male Survivors of Pediatric Cancer and Their Parents. *Journal of adolescent and young adult oncology*. Volume 3, Number 2, 2014, 75-82.
4. Kosciński I, Wittemer C, Lefebvre- Khalil V, Marcelli F, Defosse A, Rigot JM. Optimal management of extreme oligozoospermia by an appropriate cryopreservation programme. *Hum Reprod* 2007;22:2679–84.
5. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Department of Reproductive Health and Research; 2010.
6. Cooper, T. G., Noonan, E., von Eckardstein, S., Auger, J., Baker, H. W. G., Behre, H. M., Vogelsong, K. M. (2009). World Health Organization reference values for human semen characteristics*‡. *Human Reproduction Update*, 16(3), 231–245.
7. Morris JG, Acton E, Murray BJ, Fonseca F. Freezing injury: the special case of the sperm cell. *Cryobiology* 2012;64:71–80.
8. P. F. Watson, “The causes of reduced fertility with cryopreserved semen,” *Animal Reproduction Science*, vol. 60-61, pp. 481–492, 2000.
9. Botchan A, Karpol S, Lehavi O, Paz G, Kleiman SE, Yogev L, et al. Preservation of sperm of cancer patients: extent of use and pregnancy outcome in a tertiary infertility center. *Asian J Androl* 2013;15:382–6.
10. Roger G. Gosden. Fertility Preservation: Definition, History, and Prospect. *Seminars in reproductive medicine*/volume 27, number 6 2009.
11. Di Santo, M., Tarozzi, N., Nadalini, M., & Borini, A. (2012). Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. *Advances in Urology*, 2012, 1–12. doi:10.1155/2012/854837.

12. Leon Speroff, Marc A. Fritz. *Endocrinología Ginecología Clínica y Esterilidad*. Lippincott Williams & Wilkins, 2011. 8va Edición
13. Keith L. Moore, BA, MSc, PhD, DSc, FIAC, FRSM, FAAA, T. V. N. Persaud, MD, PhD, DSc, FRCPath (Lond.), FAAA, Mark G. Torchia, MSc, PhD. *Embriología clínica*. Elsevier Saunders 2013. 10ª Edición.
14. Esteves, S. C., Zini, A., Aziz, N., Alvarez, J. G., Sabanegh, E. S., & Agarwal, A. (2012). Critical Appraisal of World Health Organization's New Reference Values for Human Semen Characteristics and Effect on Diagnosis and Treatment of Subfertile Men. *Urology*, 79(1), 16–22.
15. Mark Sigman, M.D. Cancer treatment and male fertility: effects of therapy and current and future management options. Vol. 100 No. 5 / November 2013: 1179.
16. American Society of Reproductive Medicine. Posthumous collection and use of reproductive tissue: a committee opinion. *Fertil Steril* 2013;99:1842–5.
17. Quinn GP, Gonçalves V, Sehovic I, Bowman ML, Reed DR. Quality of life in adolescent and young adult cancer patients: a systematic review of the literature. *Patient Relat Outcome Meas*. 2015;6:19-51.
18. Menon S, Rives N, Mousset-Simeon N, Sibert L, Vannier JP, Mazurier S, et al. Fertility preservation in adolescent males: experience over 22 years at Rouen University Hospital. *Hum Reprod (Oxford, England)*. 2009;24(1):37–44.
19. Feldschuh J, Brassel J, Durso N, Levine A. Successful sperm storage for 28 years. *Fertil Steril*. 2005;84(4):1017.
20. Abram McBride, J., & Lipshultz, L. I. (2018). Male Fertility Preservation. *Current Urology Reports*, 19(7).
21. Botchan A, Karpol S, Lehavi O, Paz G, Kleiman SE, Yogev L, et al. Preservation of sperm of cancer patients: extent of use and pregnancy outcome in a tertiary infertility center. *Asian J Androl* 2013;15:382–6.
22. Woodruff, T. K., Smith, K., & Gradishar, W. (2016). Oncologists' Role in Patient Fertility Care. *JAMA Oncology*, 2(2), 171.
23. Siegel, R., Ma, J., Zou, Z., Jemal, A., 2014. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J. Clin.* 64, 9–29. Erratum in: *CA Cancer J Clin.* 2014 64, 364.
24. Schover LR, Brey K, Lichtin A, Lipshultz LI, Jeha S. Knowledge and experience regarding cancer, infertility, and sperm banking in younger male survivors. *J Clin Oncol* 2002;20:1880–9

25. Schover LR, Brey K, Lichtin A, Lipshultz LI, Jeha S. Oncologists' attitudes and practices regarding banking sperm before cancer treatment. *J Clin Oncol* 2002;20:1890–7
26. Oktay K, Bedoschi G, Pacheco F, Turan V, Emirdar V. First pregnancies, live birth, and in vitro fertilization outcomes after transplantation of frozen-banked ovarian tissue with a human extracellular matrix scaffold using robot-assisted minimally invasive surgery. *Am J Obstet Gynecol* 2016;214:94.e1–9
27. Levine J. Preserving fertility in children and adolescents with cancer. *Children* 2014;1:166–185.
28. Curaba M, Poels J, van Langendonck A, Donnez J, Wyns C. Can prepubertal human testicular tissue be cryopreserved by vitrification. *Fertil Steril* 2011; 95:2123.e9–12
29. Francisca Martinez et al. Update on fertility preservation from the Barcelona International Society for Fertility Preservation–ESHRE–ASRM 2015 expert meeting: indications, results and future perspectives†, ‡ *Human Reproduction*, Vol.32, No.9 pp. 1802–1811.e2, 2017.
30. Picton HM, Wyns C, Anderson RA, Goossens E, Jahnukainen K, Kliesch S, Mitchell RT, Pennings G, Rives N, Tournaye H et al. A European perspective on testicular tissue cryopreservation for fertility preservation in prepubertal and adolescent boys†. *Hum Reprod* 2015;30: 2463–2475.
31. Ioannis Vakalopoulos, Impact of cancer and cancer treatment on male fertility. *Hormones* 2015, 14(4):579-589
32. Huyghe E, Matsuda T, Daudin M, et al, 2004 Fertility after testicular cancer treatments: Results of a large multicenter study. *Cancer* 100: 732-737
33. Ioannis Vakalopoulos, Impact of cancer and cancer treatment on male fertility. *Hormones* 2015, 14(4):579-58.
34. Bizet P, Saias-Magnan J, Jouve E, Grillo JM, Karsenty G, Metzler-Guillemain C, et al. Sperm cryopreservation before cancer treatment: a 15-year monocentric experience. *Reprod Biomed Online* 2012;24:321–30.
35. Nangia, A. K., Krieg, S. A., & Kim, S. S. (2013). Clinical guidelines for sperm cryopreservation in cancer patients. *Fertility and Sterility*, 100(5), 1203–1209. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.08.054.
36. Agarwal A, Sidhu RK, ShekarrizM, Thomas AJ. Optimum abstinence time for cryopreservation of semen in cancer patients. *J Urol* 1995;154:86–8.

37. Silvan U, Diez-Torres A, Núñez M, Aréchaga J, Current urologic care for testicular germ cell tumors in pediatric and adolescent patients. *Urol Oncol* 2015, 33: 17-28.
38. American Society of Reproductive Medicine. Recommendations for gamete and embryo donation: a committee opinion. *Fertil Steril* 2013;99:47–62.
39. Auger J, Sermondade N, Eustache F. Semen quality of 4480 young cancer and systemic disease patents: baseline data and clinical considerations. *Basic Clin Androl.* 2016;26:3.
40. Antonio MacKenna. Semen quality before cryopreservation and after thawing in 543 patients with testicular cancer. *JBRA Assisted Reproduction* 2017;21(1):31-34.
41. Hotaling JM, Lopushnyan NA, Davenport M, Christensen H, Pagel ER, Muller CH, et al. Raw and test-thaw semen parameters after cryopreservation among men with newly diagnosed cancer. *Fertil Steril* 2013;99:464–9.
42. Said TM, Tellez S, Evenson DP, Del Valle AP. Assessment of sperm quality, DNA integrity and cryopreservation protocols in men diagnosed with testicular and systemic malignancies. *Andrologia* 2009;41:377–82.
43. Nijs M, Ombelet W. Cryopreservation of human sperm. *Hum Fertil (Camb)* 2001;4:158–63.
44. Nangia, A. K., Krieg, S. A., & Kim, S. S. (2013). Clinical guidelines for sperm cryopreservation in cancer patients. *Fertility and Sterility*, 100(5), 1203–1209. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.08.054.
45. Degl’Innocenti, S., Filimberti, E., Magini, A., Krausz, C., Lombardi, G., Fino, M. Baldi, E. (2013). Semen cryopreservation for men banking for oligospermia, cancers, and other pathologies: prediction of post-thaw outcome using basal semen quality. *Fertility and Sterility*, 100 (6), 1555–1563.e3. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.08.005.