

CRIOPRESERVACIÓN DE GAMETOS EN PACIENTES ONCOLÓGICOS



María Álvarez Montuno



Residente 3º año Análisis Clínicos en
Hospital Universitario de Badajoz

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN
2. CÁNCER EN CRIOPRESERVACIÓN
3. PROCEDIMIENTOS PREVIOS A LA CRIOPRESERVACIÓN
4. TÉCNICAS DE CRIOPRESERVACIÓN
5. NUEVAS TÉCNICAS APLICADAS A LA CRIOPRESERVACIÓN
6. ANÁLISIS DE DATOS EN EXTREMADURA
7. CONCLUSIONES

1. INTRODUCCIÓN

- En Reproducción Humana Asistida, el campo de la criobiología es uno de los que más ha evolucionado.
 - Para hacerse una idea → Primera ley de reproducción asistida en 1988
→ Aún los protocolos de vitrificación no estaban adaptados al humano, no existía demanda para la preservación de fertilidad femenina y ni siquiera estaban legalizados los matrimonios entre personas del mismo sexo.
- Según el Registro Nacional de Actividad 2019-Registro SEF:
 - 895 desvitrificaciones de oocitos propios.
 - 29.495 transferencias embrionarias procedentes de 30.357 descongelaciones



Estos datos muestran que en nuestro país la criopreservación y su posterior utilización es una práctica habitual

- Ley actual → Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida.
 - Última actualización → Orden SND/1215/2021, de 5 de noviembre.

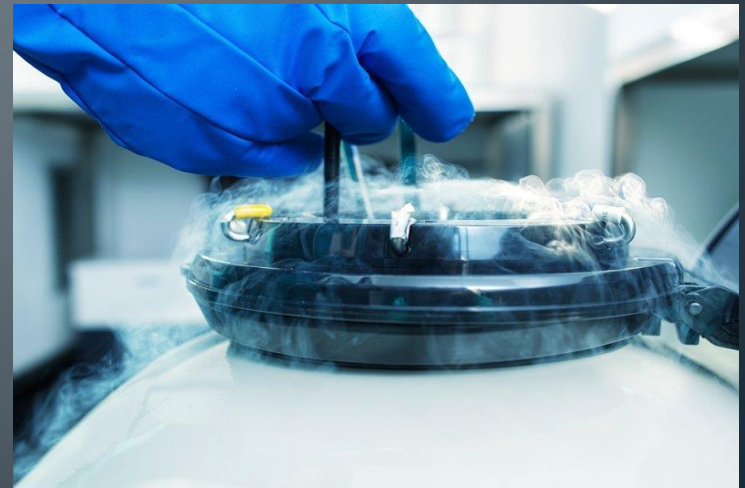


LEGISLACIÓN CONSOLIDADA

Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida.

Jefatura del Estado
«BOE» núm. 126, de 27 de mayo de 2006
Referencia: BOE-A-2006-9292

- Criopreservación consiste en conservar el material biológico a bajas temperaturas durante largos periodos de tiempo, deteniendo sus funciones vitales hasta el momento de la descongelación.
- Preservación de Fertilidad (PF): Conjunto de estrategias médicas y de laboratorio que tienen el fin de conservar la descendencia genética parental en adultos y niños con riesgo de esterilidad.
- El cáncer es capaz por sí mismo de alterar la calidad de los gametos y su función, pero es el tratamiento con quimioterapia y radioterapia el principal causante de los daños.



- UN POCO DE HISTORIA...

- Mesopotamia (2000 AC) ya era conocido el efecto del frio para la conservación del material biológico.
- 1776 Spallanzini → Experimento que demostró que los espermatozoides del semen de caballo recobraban la movilidad después de un ciclo de congelación-descongelación.
- 1983 → Se registran y publican datos de las primeras gestaciones humanas conseguidas tras criopreservación y posterior transferencia embrionaria.
- Las técnicas de CP llevan en uso más de 30 años, las cuales han sido fundamentales para mejorar la eficiencia de los procedimientos de RHA.



2. CÁNCER EN CRIOPRESERVACIÓN

- Un estudio publicado en Junio de 2021 concluyó:
 - Probabilidad de que una mujer pre-menopausia desarrolle un tumor maligno → Aprox. 6% → Cáncer de mama es el más común.
- En 2013 a nivel global había 1.8 billones → Se estima que aumentará a 2 billones en 2025.
- Basándose en estas estadísticas aprox. 100 millones de mujeres a nivel mundial tendrán riesgo de sufrir disfunción ovárica asociada a quimioterapia y podrían recurrir a la preservación de fertilidad.
- En un estudio retrospectivo y prospectivo de 102 mujeres sometidas a quimioterapia se vio que el 77.9% sufrieron amenorrea irreversible a lo largo de los 12 meses posteriores de completar el tratamiento

RIESGO DE ESTERILIDAD SEGÚN EL TIPO DE CÁNCER

Bajo (<20%)	Medio (20-80%)	Alto (>80%)
Leucemia	Leucemia Mieloblástica Aguda	Neoplasias testiculares
Tumor de Wilm	Hepatoblastoma	Sarcoma de tejidos blandos (estadio IV)
Tumor cerebral	Osteoblastoma	Sarcoma de Ewing metastásico
Sarcoma de tejidos blandos (estadio I)	Sarcoma de tejidos blandos (estadio II y III)	
Tumor de células germinales	Sarcoma de Ewing	
Tumor de células de la granulosa	Linfoma no Hodgkin	
Retinoblastoma	Enfermedad de Hodgkin con tratamiento alternativo	
	Tumor cerebral: Radioterapia craneoespinal	

RIESGO DE ESTERILIDAD EN RELACIÓN CON EL TRATAMIENTO

RIESGO	TRATAMIENTO	USO
ALTO (>80%)	Quimioterapia alquilante	Cáncer de mama, Linfoma No Hodgkin (LNH), sarcoma y Trasplante de médula osea
	Irradiación corporal total	Trasplante Médula Ósea
	Radiación craneal > 4 Gy	Tumor Cerebral
	Radiación pélvica/radiación abdominal total: > 6 Gy mujer adulta > 10 Gy mujer postpuberal >15 Gy chicas prepuberales	Cáncer de ovario, Tumor de Wilm, Sarcoma
INTERMEDIO (40-60%)	Cisplatino, Carboplatino y Doxorubicina	Cáncer mama
	Cisplatino	Cáncer cervical
	FOLFOX4	Cáncer de colon
BAJO (<20%)	Vincristina, Metotrexate, Actinomicina, Bleomicina, Mercaptopurina y Vinblastina ABVC	Linfoma Hodgking, Linfoma No Hodgking y Leucemia
	CHOP (Ciclofosfamida, Doxorubicina, Vincristina, Prednisona)	Linfoma de Hodgking, Linfoma No Hodgking y Leucemia
	Antraciclina/ Citarabin	Leucemia Mieloide Aguda
RIESGO MUY BAJO O SIN RIESGO	Metotrexate, Fluoracilo, Vincristina, Tamoxifeno	Leucemia, Cáncer de cabeza, cuello y mama, Cáncer de pulmón
DESCONOCIDO	Anticuerpos monoclonales	Cáncer de mama y colon
	Inhibidores de la tirosina kinasa	Cáncer de mama, colon, cabeza y cuello

- Puntos que deben tenerse en cuenta a la hora de considerar la criopreservación de gametos en uno de estos enfermos:
 - 1.- ¿Posponer el tratamiento para poder preservar la fertilidad (PF) pone en riesgo la supervivencia?.
 - 2.- ¿La edad del paciente es adecuada para la técnica que se va a elegir?.
 - 3.- ¿Los protocolos de estimulación hormonal (en el caso de la mujer) afectan a los tumores?.
 - 4.- ¿El enfermo esta correctamente informado de todas las opciones disponibles?.

3. PROCEDIMIENTOS PREVIOS A LA CRIOPRESERVACIÓN

- Imprescindible hacer una serie de pruebas para elaborar una historia clínica adecuada:
 - Información personal.
 - Anamnesis.
 - Informe detallado del tipo de cáncer diagnosticado.
 - Serología:
 - Examen básico: Sífilis, Hepatitis B, Hepatitis C y VIH en ambos.
 - Se incluye la Rubeola en el caso de la mujer.
 - A raíz de la pandemia PCR negativa SARS Co19 24-72h previas.

Seminograma en el varón

- Valorar volumen, pH, licuefacción y aspecto macroscópico
- Fresco para evaluar la movilidad.
- Vitalidad.
- Concentración de espermatozoides.
- Frotis para evaluar la morfología.
- Reacción Mixta de Antiglobulina (MAR) para evaluar si hay anticuerpos anti-espermatozoides.
- Recuento leucocitario (si es necesario).
- Análisis bioquímico de marcadores de glándulas accesorias (opcional)

Análisis específico en la mujer

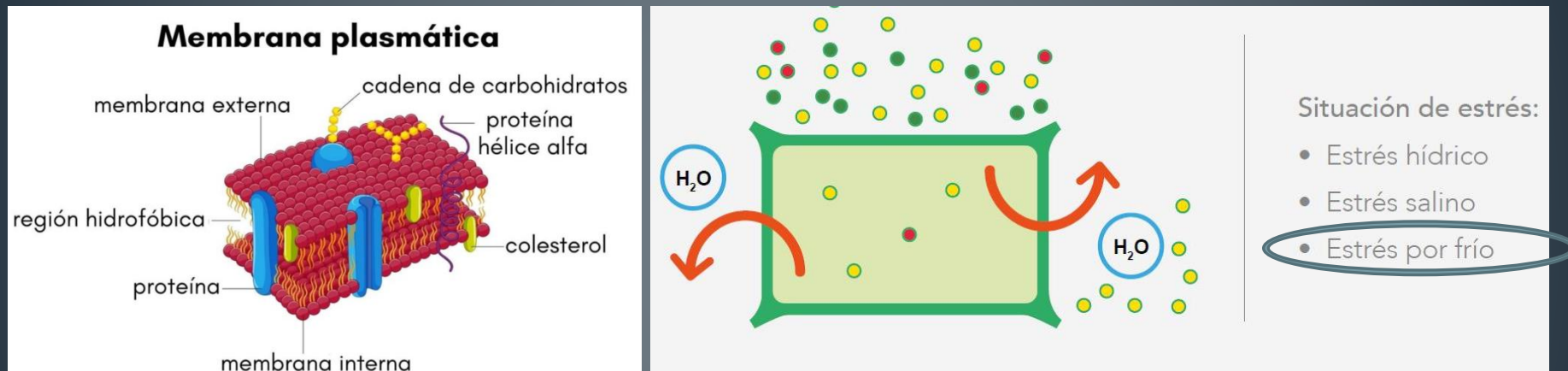
- Exploración física ginecológica y mamaria.
- Ecografía vaginal.
- Estudio Hormonal:
 - Basal del eje hipofisario gonadal: FSH, LH y estradiol.
 - Hormona antimülleriana (AMH) → Marcador de la reserva ovárica.
 - TSH ante la sospecha de patología tiroidea.

4. TÉCNICAS DE CRIOPRESERVACIÓN

- EFFECTOS DE LA CP EN LAS CÉLULAS:

<u>FACTORES FÍSICOS</u>	Aumento de la presión hidrostática
	Cambios en la presión osmótica
	Acción mecánica de los cristales de hielo
<u>FACTORES QUÍMICOS</u>	Cambios del pH
	Radicales libres
	Efectos Redox
	Efectos de los Agentes Crioprotectores (ACPs)

- MB celulares → Distribución proteínas y fosfolípidos → Alteración de la permeabilidad → Estrés osmótico → Deshidratación celular



- ↑ Agua extracelular = Cristales que dañan las membranas
- Cristales intracelulares = Daño en orgánulos

APÓPTOSIS

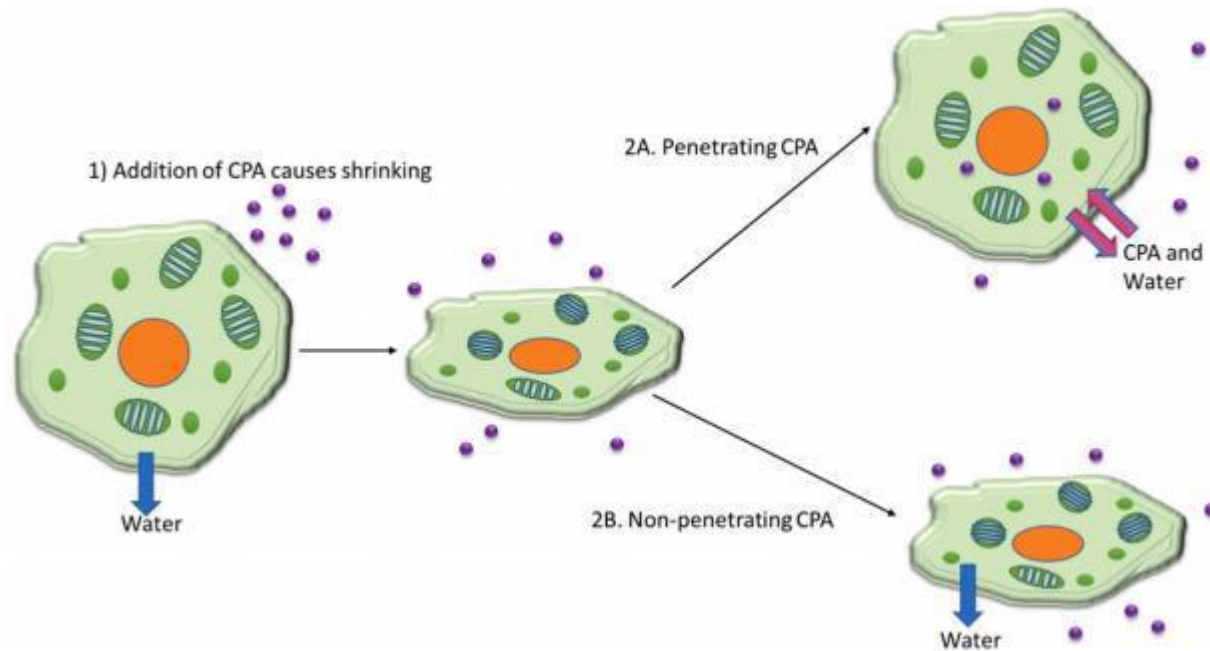
- Efectos sobre el genoma:

HIPEROSMOLARIDAD	Roturas de cadena
	Generación de oxígeno reactivo
	Alteraciones cromosómicas
	Alteración de la unión ADN-proteínas
OXÍGENO REACTIVO	Roturas de cadena
	Fragmentación
FLUCTUACIONES DE pH	Desnaturalización
	Desestabilización doble hélice
	Desaminación, despurinización y despirimidización
TEMPERATURA	Desnaturalización
AGENTES CRIOPROTECTORES (ACPs):	
Glicerol	Alteración de la conformación del ADN
Propilen Glicol	Incrementa la metilación
Etilen Glicol	Desestabilización de la cromatina
DMSO	Roturas de cadena
	Cambio del patrón de metilación

- AGENTES CRIOPROTECTORES (ACPs):
 - Finalidad → Disminuir el efecto perjudicial de la congelación.
 - Sustancias con una solubilidad elevada.
 - Efecto citotóxico directamente proporcional a la temperatura y concentración en que son utilizados.
 - Mecanismo de acción: Limitar el cambio conformacional de las proteínas + Reducir la formación de cristales.



- Se pueden clasificar en dos grupos:
 - Crioprotectores Permeables o Intracelulares: Glicerol, Etilen Glicol, el 1,2 Propanodiol y el Dimetil Sulfóxido.
 - Crioprotectores Impermeables o Extracelulares: Yema de huevo, Trealosa, la Sacarosa, el Ficoll y el Polivinilpirrolidona (PVP).



- TÉCNICAS DE CONGELACIÓN

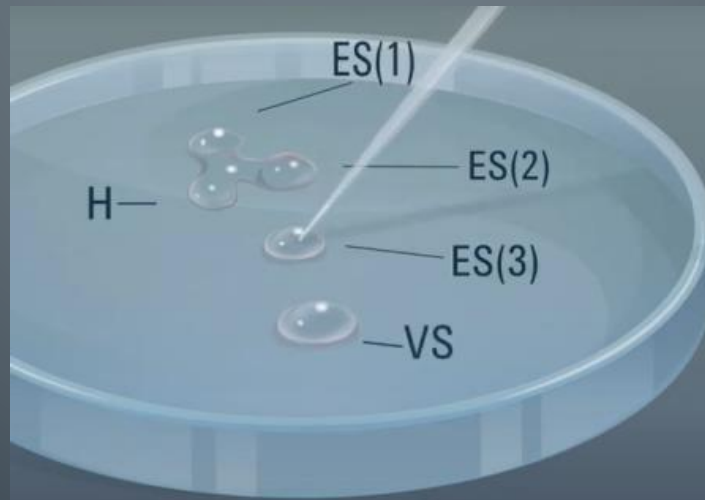
- CONGELACIÓN LENTA

- Actualmente se usa para los espermatozoides
- Protocolo
 - 1º Temperatura 5-8°C durante 1,5h
 - 2º Temperatura de -80°C (en vapores de nitrógeno) durante 30 min
 - 3º Sumergir en nitrógeno líquido la muestra a -196°C



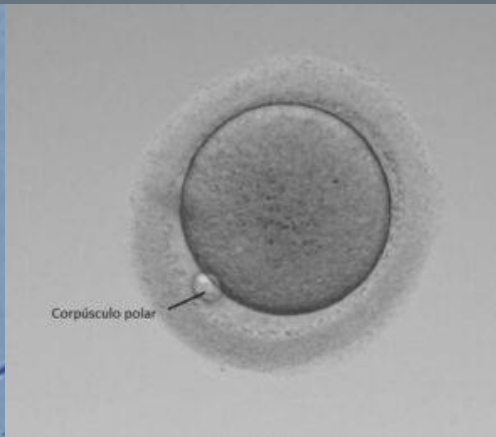
- VITRIFICACIÓN

- Se usa para ovocitos y embriones
- Se lleva a cabo en 15min
- Se requieren mayores concentraciones de ACPs → Mayor riesgo de citotoxicidad → Mayor rapidez de actuación
- Una vez preparadas se sumergen directamente en nitrógeno líquido a -196°C → Minimiza la formación de cristales



- TÉCNICAS DE DESCONGELACIÓN

- Si la muestra procede de una congelación lenta → T° ambiente 1 min → Baño a 37°C 10-15 min → Lavado del semen para eliminar ACPs
- Si la muestra procede de una vitrificación → Directamente 1 min a 37°C (paso crítico) → Placa de Petri a T° ambiente con diferentes soluciones de descongelación → Medio de cultivo 37°C + 5% CO₂.

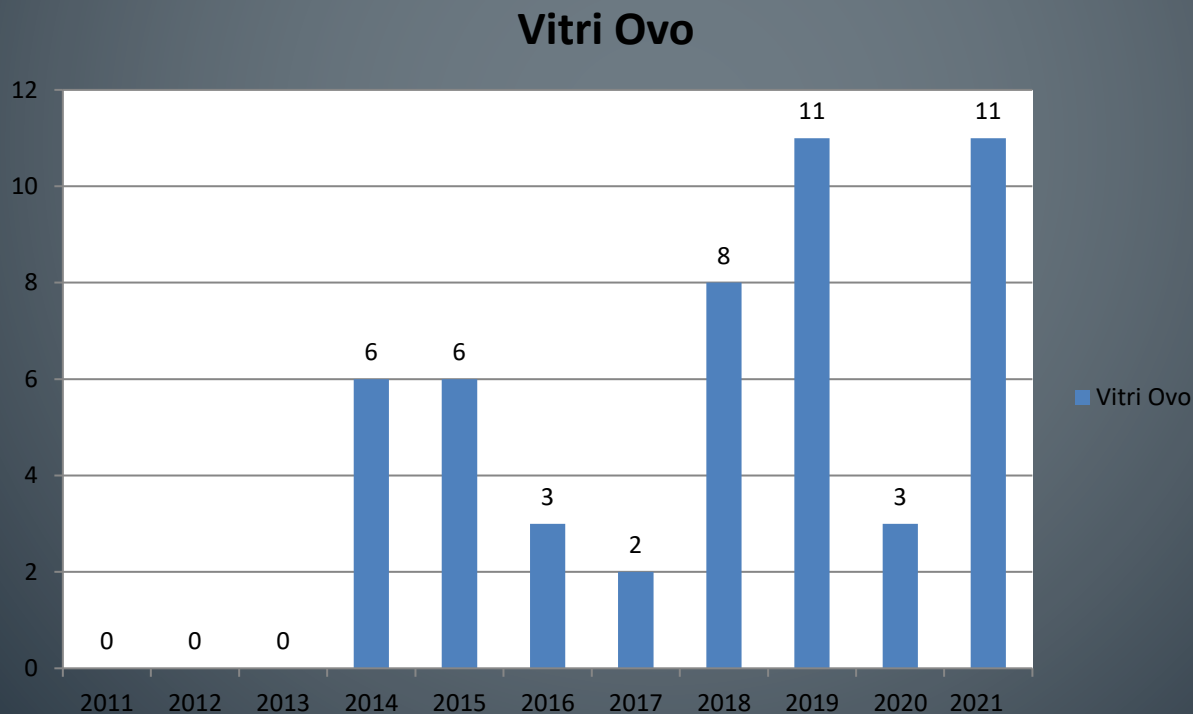


5. NUEVAS TÉCNICAS APLICADAS A LA CRIOPRESERVACIÓN

- Vitricación de espermatozoides
 - AÚN EN ESTUDIO: Parece que mejora postdescongelación la movilidad y disminuye la fragmentación de ADN espermático.
- Criopreservación de tejido espermático
- Criopreservación de ovario completo en edades pediátricas
 - Método en fase experimental, con la finalidad de poderlo trasplantar una vez los pacientes estén curados.
- Examen genético personalizado en onco-fertilidad
 - Busca conocer los genes implicados en desencadenar el daño producido durante el tratamiento oncológico, la reparación del mismo y la apoptosis celular con el fin de predecir la susceptibilidad genética.

6. ANÁLISIS DE DATOS EN EXTREMADURA

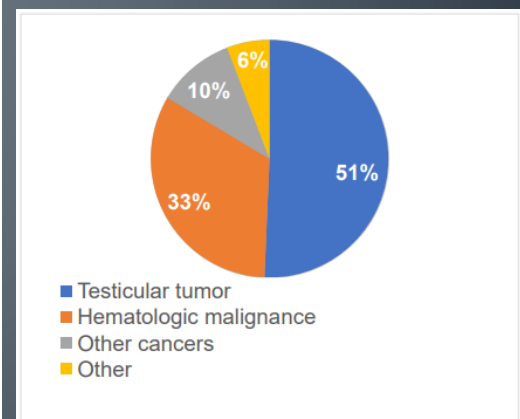
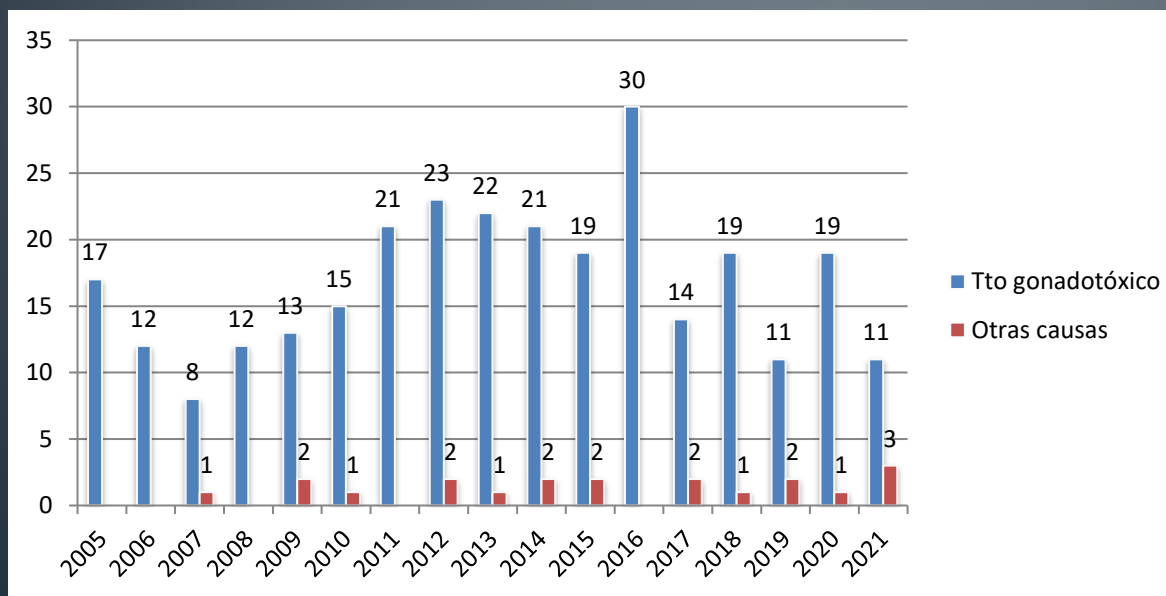
- CRIOPRESERVACIÓN PREVENTIVA DE OVOCITOS:
 - Comenzó en 2014



• CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES

• Trabajo para EUROMEDLAB de Marian:

- Se han registrado un total de 292 pacientes desde abril de 2005 a diciembre de 2021.
- Los motivos de criopreservación desde dicha fecha se distribuyen de la siguiente forma:



7. CONCLUSIONES

- La criopreservación de gametos como método preventivo es una técnica clásica y fundamental en los laboratorios de RHA.
- Actualmente se hace congelación lenta para el semen y vitrificación para ovocitos/embriones.
- Hoy día se siguen investigando nuevas técnicas con el fin de conseguir la máxima eficiencia para la Preservación de la Fertilidad.

- En Extremadura la criopreservación es una práctica habitual, cada día más demandada para los ovocitos, pero que actualmente se realiza de forma más frecuente en espermatozoides.
- Es importante que los pacientes diagnosticados sean informados de que existe esta posibilidad antes de comenzar el tratamiento.
- La criopreservación cumple una importante función social; además del beneficio psicológico que supone para el paciente ya que les da esperanza y expectativas de futuro.

¡¡MUCHAS GRACIAS POR VUESTRA
ATENCION!! 😊

