



VI Jornada SAB-SAMeR 2013



Sociedad Argentina de Biología (SAB) – Sociedad Argentina de Medicina Reproductiva (SAMeR)

Oncofertilidad. Avances Científicos y Clínicos en Fertilidad en Hombres con Cáncer

Jueves 15 de Agosto de 2013, de 16 a 20 hs Auditorio Fundación Pablo Cassara

Organizan y coordinan: Dra. Mónica Vazquez-Levin (SAB) y Capítulo de Preservación de la Fertilidad (SAMeR)

PROGRAMA

- 16:00 - 16:45 hs. **Inscripción.**
- 16:45 - 17:00 hs. Apertura, a cargo de los Presidentes de ambas sociedades Dr. Gustavo Somoza (SAB) y Dr. Sebastián Gogorza (SAMeR) y organizadores de la Jornada.
- 17:00 - 17:30 hs. **Regulación del equilibrio osmótico durante la criopreservación de espermatozoides humanos. Estudios en muestras de pacientes oncológicos.**
Dra. María José Munuce. Laboratorio de Estudios Reproductivos, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Rosario. Santa Fe. Argentina.
- 17:30 - 18:00 hs. **Efectos de la quimioterapia y la radioterapia sobre la fertilidad masculina.**
Dr. Omar Layus. Hospital Italiano, CABA, Argentina.
- 18:00 - 18:20 hs. **Comentarios-Preguntas.**
- 18:20 - 18:40 hs. **Intervalo.**
- 18:40 - 19:10 hs. **Estrategias para preservar la fertilidad en varones con cáncer.**
Dra. Florencia Fulco, CEGYR, CABA, Argentina.
- 19:10 - 19:40 hs. **Inestabilidad genética: la ruta que conduce de células madre pluripotenciales a células germinales cancerosas.**
Dr. Juan Carlos Biancotti. Zilkha Neurogenetic Institute, University of Southern California, Los Angeles, CA, EE.UU.
- 19:40 - 20:00 hs. **Comentarios-Preguntas.**
- 20:00 hs. **Cierre. Entrega Certificados Asistencia.**

Regulación del equilibrio osmótico durante la criopreservación de espermatozoides humanos. Estudios en muestras de pacientes oncológicos

Adriana Caille y María José Munuce

Laboratorio de Estudios Reproductivos, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas
Universidad Nacional de Rosario.
Reprolab, Sanatorio Británico de Rosario

Durante el tránsito por el tracto reproductivo femenino, el espermatozoide humano transitará por ambientes de distinta composición osmótica. Dado que existe un gradiente descendente de osmolalidad (plasma seminal-ámpula) para contrarrestar el *stress* hipoosmótico, el espermatozoide equilibrará su medio interno intercambiando agua y osmolitos a través de su membrana plasmática.

Esta situación también ocurrirá *in vitro* cuando separemos a los espermatozoides del plasma seminal cuya osmolalidad oscila entre 256 a 537 mOsm/kg con los medios de cultivo estándar (280 mOsm/kg). Para mantener su tamaño y su función el espermatozoide posee canales que se activan para sacar osmolitos e iones y revertir el ingreso de agua. Cuando se inhiben por ejemplo los canales de K⁺ sensibles a quinina, se producen modificaciones en la trayectoria del espermatozoide, la cual se torna menos progresiva por el ingreso de agua con hinchamiento del flagelo, pero se mantiene su estado acrosomal.

Una técnica muy utilizada para diferir la paternidad es la criopreservación de espermatozoides. Consiste en enfriar controladamente células o tejidos hasta temperaturas de -196°C. Las células se deshidratan por la alta osmolalidad externa ya que si queda agua intracitoplasmática, se formarán cristales de hielo que actuarán como vidrios rompiendo estructuras intracelulares necesarias para el funcionamiento celular. Durante el procedimiento se agregan sustancias químicas protectoras (crioprotectores) que consisten en una solución salina, yema de huevo y antibióticos.

El modo de acción consiste en que debido a la elevada osmolalidad (hiperosmolales) extraen de la célula el agua y la deshidratan para prevenir la formación de hielo intracelular. Nuestros resultados muestran que la viabilidad post descongela-

do resulta > 65 % con > 45 % móviles. En las muestras recuperadas por *swim up*, los espermatozoides presentan mayor pérdida de acrosoma (aproximadamente 60 % de reaccionados), lo que reflejaría que sólo un 40 % conservaría su acrosoma. Es factible que la asociación de injurias a las que resulta expuesto el espermatozoide durante la criopreservación/descongelación/selección de espermatozoides móviles, lleve a que se sobrepasen sistemas de regulación osmótica (canales de K⁺ sensibles a quinina) y ya no consigan adaptarse al desafío osmótico ingresando agua ante el *stress* hipoosmótico de más de 1000 mOsm/Kg.

A pesar de que demostramos daño en una gran subpoblación de la muestra, es de esperar que exista un remanente funcional y con posibilidad de fecundar. Hoy día los tratamientos oncológicos resultan efectivos y preservarían la fecundidad ya que más del 97 % de los pacientes recuperan la función testicular durante los 3 años posteriores al tratamiento. Sin embargo, no disponemos *a priori* herramientas para distinguir aquellos pacientes susceptibles a resultar dañados, por lo que la indicación de preservación es necesaria a todos los jóvenes en edad reproductiva que deban exponerse a este tipo de terapéutica.

Estrategias para preservar la fertilidad en varones con cáncer

María Florencia Fulco

Médica Uróloga, Unidad de Oncofertilidad, CEGyR

Gracias a los avances en las terapias oncológicas, la sobrevivencia de los pacientes con cáncer se ha incrementado. Esto es particularmente evidente en los varones menores de 30 años, en quienes las principales enfermedades malignas son las oncohematológicas y las de células germinales. Los pacientes ya curados consultan por los denominados “efectos tardíos” de las terapias contra el cáncer, y sin duda uno de los efectos tardíos que más motiva la consulta es el compromiso de la capacidad fértil. Así nace una nueva área dentro de la Medicina Reproductiva: la Oncofertilidad, que podemos definirla como “una nueva disciplina

que involucra el estudio y el desarrollo de medidas de prevención y protección del impacto del cáncer y sus tratamientos en la salud reproductiva”. Las principales sociedades de Medicina Reproductiva y de Oncología han establecido normativas, para que sirvan de guía a los centros que tratan pacientes oncológicos. Las normativas según las cuales se rige la Unidad de Oncofertilidad de nuestro centro se condicen con las establecidas por la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO)¹, por la Sociedad Internacional para la preservación de la Fertilidad (ISFP)² y por la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (ASRM).³

Estrategias para preservar el potencial reproductivo

El procedimiento por excelencia para preservar la fertilidad es la *criopreservación de semen*, dado que es accesible y efectiva en la mayoría de los pacientes. Idealmente se deben obtener por masturbación 2 ó 3 muestras, antes del inicio de la terapia gonadotóxica. Factores relacionados al cáncer pueden dificultarlo, como ansiedad, cansancio, hipogonadismo, dolor, diabetes, problemas neurológicos y efectos adversos de medicamentos, como opioides y antidepresivos. En estas situaciones pueden ser útiles los inhibidores de la fosfodiesterasa 5 (sildenafil y derivados), la estimulación vibratoria del pene, la electroeyaculación (que requiere anestesia general), y la recolección y el procesamiento de semen retroeyaculado. En estos casos los agonistas Alfa (como la pseudofedrina) pueden ser útiles. Las *opciones quirúrgicas* se ofrecen a aquellos pacientes que por alguna de las razones comentadas, o por patologías previas, no obtienen espermatozoides aptos para ser criopreservados. Dentro de los procedimientos quirúrgicos se describen los que instrumentan el epidídimo y los que instrumentan el testículo; la aspiración epididimaria percutánea (PESA) o microquirúrgica (MESA) ofrecen buenas tasas de recupero cuando la azoospermia es de causa obstructiva; la primera puede ser realizada en el consultorio con anestesia local; la segunda requiere anestesia general para exteriorizar la gónada. La aspiración testicular (TESA) también puede realizarse en el consultorio con anestesia local. Si bien no ofrece buenas tasas de rescate, fue el punto de partida para desarrollar la técnica de

mapeo testicular diagnóstico.⁴ Sin lugar a dudas la técnica quirúrgica por excelencia para pacientes con azoospermia obstructiva es la biopsia testicular (TESE), realizada en quirófano, con anestesia general, y que permite obtener espermatozoides en el 50% de los casos, siendo este porcentaje aún mayor cuando se realizan tres o más biopsias⁵. Para ejemplificar, en nuestro centro la tasa de rescate por medio de TESE fue del 78% en los últimos 12 meses. Se realizaron modificaciones sobre esta técnica, como la biopsia con magnificación (MD TESE),⁶ basándose en el principio de que la morfología de los túbulos seminíferos puede orientar hacia zonas de espermatogénesis activa, o la técnica de “ONCO TESE”,⁷ disección *ex vivo* de la pieza de orquiectomía de pacientes con testículo único o tumores bilaterales.

La idea de realizar *tratamientos médicos* para preservar la fertilidad surgió al observar que la terapia oncológica en niños antes de la adrenarca era menos deletérea para la serie germinal que en pacientes post-púberes. Se realizaron múltiples estudios con distintos protocolos en base a análogos de GnRH, antiandrógenos o testosterona, pero hasta la fecha ninguno mostró efectividad como terapia gonadoprotectora,⁸ por lo que su uso no es recomendado.

El varón prepúber

Los pacientes que no han tenido desarrollo puberal no iniciaron la espermatogénesis, por lo que todas sus células germinales son premeióticas. La única opción para preservar la fertilidad es la *criopreservación de parénquima testicular*, obtenido mediante biopsia.¹⁻³ El objetivo es poder trasplantar este tejido en el paciente una vez completada la terapia oncológica, para reestablecer la espermatogénesis. Si bien este procedimiento es experimental, porque hasta la fecha no ha sido posible concretarlo en pacientes, hay varias líneas de investigación centradas en obtener espermatozoides de este tejido prepuberal, como el *autotransplante* de células madre en testículo una vez completada la terapia oncológica, que permitió obtener espermatozoides con capacidad fecundante en modelos animales,⁹ o la maduración *in vitro* de gonias hasta el estadio de espermátides, que también lograron producir blastocistos *in vitro*.¹⁰

¿Cuál es el mejor momento para criopreservar?

Estudios recientes demostraron que las terapias oncológicas pueden inducir modificaciones en el material genético de las células germinales, y que estas modificaciones podrían también identificarse en el embrión. Se demostró, por ejemplo, que algunos análogos de la citidina se incorporan al ADN, lo que conduce a una disminución de la metilación del mismo.^{11,12} La metilación permite muchos procesos de expresión genómica, por lo que esto podría verse reflejado clínicamente con mayores pérdidas de embarazo. Sin embargo, todavía es desconocido el efecto que podría tener en la descendencia.

La experiencia en CEGyR

Evalúamos los 42 pacientes varones que consultaron en nuestro centro para preservar la fertilidad por causa oncológica desde enero de 2012 hasta la fecha, y encontramos que 41 estaban en condiciones de criopreservar semen. El diagnóstico predominante fue cáncer testicular (60%), seguido por linfoma Hodgkin (25%). Sólo el 35% de estos pacientes concurren al consultorio de asesoramiento oncológico; este porcentaje bajo de consultas probablemente hable del espacio que todavía queda por llenar por parte del equipo de salud.

A modo de ejercicio tomamos 13 de estos pacientes al azar (1° grupo), y de la población de pacientes de CEGyR tomamos al azar 20 pacientes teratozoospermicos mayores de 46 años (2° grupo) y 10 pacientes con parámetros seminales normales (3° grupo), y evaluamos la movilidad, el conteo espermático, la morfología, la fragmentación del ADN medida con la técnica de TUNEL, y la cuantificación de survivin, proteína que inhibe la apoptosis por inhibición de la vía de las caspasas, y que habitualmente no está presente en los tejidos sanos, pero sí se ha evaluado su expresión en células cancerosas, y en el embrión y el ovocito, pero no todavía en espermatozoides. Encontramos que si bien todos los parámetros estaban alterados en los pacientes con cáncer, las alteraciones eran mayores en aquellos con diagnóstico de linfoma Hodgkin.

Aspectos éticos

El Código de Ética de SAMeR dice textualmente que “Quien decida criopreservar gametos o embriones debe (...) dejar establecida su voluntad sobre los posibles destinos de los gametos o embriones en caso de no utilizarlos para sí mismo o si el centro pierde contacto con él/ella”. También expresa que “no deben conservarse gametos de una persona muerta o cercana a morir, o de una persona en estado vegetativo postcoma, sin su consentimiento por escrito”, y que “si una clínica recibe la notificación de que un titular de gametos ha muerto, debe descartar los gametos, salvo que haya una instrucción previa, clara y atestiguada”. Los centros de reproducción deberían observar estas recomendaciones para incluirlas en los consentimientos informados que firman los pacientes.

Conclusiones

- La criopreservación de semen en adultos, tanto de eyaculado como de orina, así como de espermatozoides obtenidos por biopsia testicular, es el único método de preservación de fertilidad establecido.
- La criopreservación de tejido testicular en pacientes prepúberes es una técnica disponible pero experimental.
- Existe la posibilidad de daño genético en las gametas después del inicio de la terapia oncológica, por lo que la preservación de la fertilidad debe ser llevada a cabo lo antes posible, preferentemente antes del inicio de cualquier tratamiento.
- Se debe discutir con el paciente oncológico y su familia el riesgo de infertilidad y las opciones para preservar el potencial reproductivo. Se debe documentar esta discusión.
- Es importante tener en cuenta los aspectos éticos de acuerdo al código de ética de SAMeR. El consentimiento informado es de vital importancia.

Referencias

1. Loren AW, Mangu PB, Nohr Beck L, Brennan L, Magdalski AJ, Partridge AH, Quinn G, Wallace WH, Oktay K. Fertility preservation for patients with cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol* 2013;31(19):2500-2510.

2. SS Kim, J Donnez, P Barri, A Pellicer, P Patrizio, Z Rosenwaks, P Nagy, T Falcone, C Andersen, O Hovatta, H Wallace, D Meirow, D Gook, SH Kim, CR Tzeng, Shuetu Suzuki, B Ishizuka, MM Dolmans. Recommendations for fertility preservation in patients with lymphoma, leukemia, and breast cancer. *J Assist Reprod Genet* 2012; 29:465–468.
3. The Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology and the Practice Committee 6 of the American Society for Reproductive Medicine. Fertility Preservation in Patients Undergoing Gonadotoxic Therapy or Gonadectomy. 2012. Epub ahead for print.
4. Turek PJ, Cha I, Ljung BM. Systematic fine needle aspiration of the testis: correlation to biopsy and results of organ “mapping” for mature sperm in azoospermic men. *Urology* 1997;49:743–48.
5. P. Donoso, H. Tournaye, P. Devroey. Which is the best sperm retrieval technique for non-obstructive azoospermia? A systematic review. *Hum Reprod Update* 2007;13(6):539–549.
6. AA Dabaja, PN Schlegel. Microdissection testicular sperm extraction: an update. *AJA* 2013;15: 35–39.
7. K. Furuhashi, T. Ishikawa, H. Hashimoto, S. Yamada, S. Ogata, Y. Mizusawa, Y. Matsumoto, E. Okamoto, S. Kokeguchi, M. Shiotani. Onco-testicular sperm extraction: testicular sperm extraction in azoospermic and very severely oligozoospermic cancer patients. *Andrologia* 2013;45:107–110.
8. ML Meistrich, Gunapala Shetty. Hormonal Suppression for Fertility Preservation in Males and Females. *Reproduction* 2008;136(6):691–701.
9. BP Hermann, M Sukhwani, F Winkler, JN Pascarella, KA Peters, Y Sheng, H Valli, M Rodriguez, M Ezzelrab, G Dargo, K Peterson, K Masterson, C Ramsey, T Ward, M Lienesch, A Volk, DK Cooper, AW Thomson, JE Kiss, MCT Penedo, GP Schatten, S Mitalipov, KE Orwig. Spermatogonial stem cell transplantation into Rhesus testes regenerates spermatogenesis producing functional sperm. *Cell Stem Cell* 2012 2; 11(5):715–26.
10. Palermo et al. ESHRE 2013.
11. Yu-Bin Ding, Chun-Lan Long, Xue-Qing Liu, Xue-Mei Chen, Liang-Rui Guo, Yin-Yin Xia, Jun-Lin He*, Ying-Xiong Wang. 5-Aza-29-deoxycytidine Leads to Reduced Embryo Implantation and Reduced Expression of DNA Methyltransferases and Essential Endometrial Genes. *PLoS ONE* 2012 7(9): e45364.
12. TLJ. Kelly, E Li, JM Trasler. 5-Aza-29-Deoxycytidine Induces Alterations in Murine Spermatogenesis and Pregnancy Outcome. *J Androl* 2003;24,(6):822-830.

Inestabilidad genética: la ruta que conduce de células madre pluripotenciales a células germinales cancerosas

Juan Carlos Biancotti

*Zilkha Neurogenetic Institute
University of Southern California
Los Angeles, CA, EE.UU.*

Las células madre pluripotenciales (PSC) que componen el macizo celular interno del embrión humano (fuente de las células madre embrionarias) experimentan un número limitado de divisiones celulares previo a su diferenciación. Sin embargo, cuando estas células se perpetúan en cultivo como líneas celulares, se ven sometidas a numerosos ciclos celulares, lo cual trae aparejado la adquisición de anomalías genéticas.

Este proceso, conocido como “adaptación”, involucra la ganancia o pérdida de material genético que no se produce en forma aleatoria, sino por el contrario, es consistente con las alteraciones encontradas en células cancerosas. Esta alteración se observa tanto en células madre embrionarias (hESC) como en células madre pluripotenciales inducidas (hiPS) obtenidas por reprogramación de células somáticas humanas.

La alteración más frecuente y representativa es la duplicación del cromosoma 12, de modo similar a lo observado en los tumores de células germinales como el carcinoma embrionario. El análisis de la expresión génica global demuestra que células madre pluripotenciales con trisomía 12 se agrupan junto con tumores de células germinales, y separadas de hESC y hiPS euploides y tejido testicular control.

Estas células trisómicas proliferan más rápido que las células control con idéntico *background* genético, y tienen menor tendencia a diferenciarse tanto in vivo como in vitro. De hecho, PSC con trisomía 12 originan teratomas más agresivos que PSC euploides, de los cuales se pueden recuperar células símil-ES con elevada expresión de genes de pluripotencialidad.

Estos resultados muestran que el cultivo prolongado de PSC puede inducir transformación en células euploides, las cuales adquieren características y fenotipo similar al carcinoma embrionario.