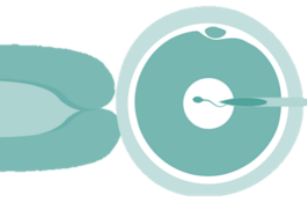




PRESERVACIÓN DE LA FERTILIDAD EN LA PACIENTE ONCOLÓGICA

Oleksandra Harahonych



TRABAJO FIN
DE GRADO
BIOQUÍMICA

CURSO 2020-2021





Dedicado a Pancho, por ser el mejor compañero de estudio. Ojalá hubiéramos terminado esto también juntos.





DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Dña. *Oleksandra Harahonych* estudiante de Grado en Bioquímica de la facultad de Química de la Universidad de Murcia, **DECLARO:**

Que el Trabajo de Fin de Grado que presento para su exposición y defensa titulado "*Preservación de la fertilidad en la paciente oncológica*" y cuya tutora es Dña. *Alfonsa García Ayala*

es original y que todas las fuentes utilizadas para su realización han sido debidamente citadas en el mismo.

Murcia, a *13* de *julio* de 2021.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Oleksandra'.





LISTADO DE ABREVIATURAS

ABVD – (doxorubicina, bleomicina, vinblastina, dacarbazina)

AFC – Recuento de folículos antrales

AMH – Hormona antimülleriana

BEACOPP – (doxorubicina, bleomicina, vincristina, etopósido, ciclofosfamida, procarbazona)

CA – (clina antracina, ciclofosfamida)

CAM 5.2 – Citoqueratina de bajo peso molecular

CLBR – Tasa acumulada de nacimiento vivo

CPR – Tasa acumulada de embarazo clínico

CHOP – (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona)

CO – Criopreservación de ovocitos

COPR – Tasa acumulada de embarazo en curso

COPP/MOPP – (ciclofosfamida o mostaza nitrogenada, vincristina, procarbazona, prednisona)

COST-LESS - *Controlled Ovarian Stimulation Treatment with Letrozole Supplementation Study*

CTO – Criopreservación de tejido ovárico

CVAD – (ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina, dexametasona, citarabina, metotrexato)

CVP – (ciclofosfamida, vincristina, prednisona)

DMSO – Dimetilsulfóxido

EFP – Preservación de la fertilidad por la edad

EG – Etilenglicol

FAC – (fluorouracilo, doxorubicina, ciclofosfamida)

FEC – (fluorouracilo, epirrubicina, ciclofosfamida)

FIV – Fecundación *in vitro*

FP – Preservación de la fertilidad

FSH – Hormona folículo estimulante

FSHr – FSH recombinante

GCDFP15 – *Gross Cystic Disease Fluid Protein-15*

GnRH – Hormona liberadora de gonadotropina

GnRHa – Agonista de GnRH

hCG – Gonadotropina coriónica humana

hCGr – hCG recombinante

HL – Linfoma de Hodgkin

HSA – Albúmina de suero humano

ICSI – Inyección intracitoplasmática

LH – Hormona luteinizante

LLA – Leucemia linfoblástica aguda

LMA – Leucemia mieloblástica aguda

LMC – Leucemia mieloide crónica

MF – (ciclofosfamida, metotrexato, fluorouracilo)

MGB1 – Mamaglobina-1

MIV – Maduración *in vitro*

NLH – Linfoma no Hodgkin

Onco-FP – Preservación de la fertilidad por tratamiento oncológico

POI – Insuficiencia ovárica prematura

RNV – Tasa de recién nacido vivo

SHO – Síndrome de hiperestimulación ovárica

TCMH – Trasplante de células madre



hematopoyéticas

TXT – (5-fluorouracilo, epirrubicina,
ciclofosfamida + Docetaxel)

UI – Unidades Internacionales

WT1 – Antígeno tumoral de Wilms-1



ÍNDICE

Resumen/Abstract	1
Introducción	3
➤ Foliculogénesis y regulación hormonal.....	6
➤ Marco legal.....	9
Objetivos	11
Metodología	12
Resultados y discusión	13
1. Efectos de la quimioterapia sobre la fertilidad	13
➤ Tratamientos gonadotóxicos.....	13
➤ Resultados gonadotoxicidad.....	15
2. Estimulación ovárica	21
➤ Convencional.....	21
➤ Pacientes con cáncer de mama.....	22
➤ Preservación de emergencia.....	23
➤ Resultados.....	26
3. Criopreservación de ovocitos y embriones	28
➤ Criopreservación de ovocitos.....	28
➤ Criopreservación de embriones.....	29
➤ Resultados.....	30
4. Criopreservación de tejido ovárico	32
➤ Resultados.....	33
➤ Transferencia de células malignas.....	34
5. Otras técnicas	37
➤ Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos inmaduros (MIV).....	37
➤ Transposición ovárica u ooforopexia.....	37
Conclusión	39
Bibliografía	41





RESUMEN

En la presente revisión bibliografía se analizan las opciones disponibles para la preservación de la fertilidad en pacientes diagnosticadas de cáncer que van a someterse a quimioterapia. En concreto, se centra en los casos más comunes de los programas de preservación, siendo el cáncer de mama el principal indicador seguido de linfomas y leucemias. Esta nueva área de la reproducción asistida surge debido al aumento de las tasas de supervivencia y al creciente retraso de la maternidad, ya que la mayoría de pacientes oncológicas no tienen hijos en el momento del diagnóstico y, además, a que a partir de los 35 años la reserva ovárica empieza a verse comprometida y la calidad de los ovocitos también empeora. En cuanto al daño que producen los tratamientos antineoplásicos sobre los folículos ováricos se tratan dos hipótesis: daño directo a los folículos que lleva a una pérdida acelerada de los que quedan o de los vasos sanguíneos provocando la fibrosis de la corteza ovárica y la atrofia de los folículos.

La elección de la técnica depende principalmente del tipo de cáncer, el tiempo disponible, la edad y la reserva ovárica de la paciente y se realiza antes del tratamiento oncológico. Ante todo, las técnicas se basan en la criopreservación de ovocitos, embriones y tejido ovárico mediante su vitrificación, la cual consiste en una congelación ultra-rápida en nitrógeno líquido en presencia de elevadas concentraciones de solutos. En general, la primera elección es la criopreservación de ovocitos o embriones obtenidos mediante inyección intracitoplasmática (ICSI) si no existe limitación de tiempo desde el diagnóstico del cáncer y el inicio de la quimioterapia. Estos ovocitos se obtienen tras la estimulación ovárica de la paciente y posterior punción. Por otro lado, la criopreservación de tejido ovárico se realiza cuando no se puede retrasar el inicio de la quimioterapia, ya que no requiere de estimulación, y el tejido se obtiene por laparoscopia. También se utiliza en el caso de pacientes menores de edad ya que sus ovocitos no son maduros, aunque pueden completar la maduración tras su autotrasplante o también existe la posibilidad de su maduración *in vitro* (MIV) y posterior criopreservación. Por último, en el caso de combinar quimioterapia con radioterapia se recurre a la transposición ovárica fuera del campo de irradiación mediante laparoscopia.

Los resultados obtenidos hasta el momento apoyan el uso de estas técnicas, representando el método más eficaz para cumplir el deseo genésico de aquellas pacientes con cáncer que hayan sufrido la pérdida de la reserva ovárica tras la quimioterapia.



ABSTRACT

This literature review examines the available options for fertility preservation in patients diagnosed with cancer who need chemotherapy. Specifically, it deals with the most common cases of preservation programs, breast cancer is the main indicator followed by lymphomas and leukemias. This new area of assisted reproduction arises from the increase in survival rates and the increase in maternity delay, also the most oncological patients do not have children at the time of diagnosis. In addition, after the age of 35 the ovarian reserve begins to be compromised and the quality of the oocytes too. Regarding the damage that antineoplastic treatments cause on the ovarian follicles, two hypotheses are addressed: direct damage to the follicles which accelerated loss of the remaining follicles or of the blood vessels which causing fibrosis of the ovarian cortex and atrophy of the follicles.

The choice of the technique depends mainly on the type of cancer, the time available, the age and the ovarian reserve of the patient and the fertility preservation is performed before oncological treatment. All the techniques are based on the cryopreservation of oocytes, embryos and ovarian tissue by vitrification which consists of an ultra-rapid freezing in liquid nitrogen with the presence of high concentrations of solutes. In general, the first choice is the cryopreservation of oocytes or embryos obtained by intracytoplasmic injection (ICSI) if there is no time limitation from the diagnosis of the cancer and the start of chemotherapy. These oocytes are obtained after ovarian stimulation of the patient and subsequent tap. On the other hand, cryopreservation of ovarian tissue is performed when the begin of chemotherapy cannot be delayed, considering that it does not require stimulation, and tissue is obtained by laparoscopy. It is also used in the case of young patients because their oocytes are not mature, however they can complete the maturation after their autotransplantation or there is the possibility of their maturation in vitro (MIV) and subsequent cryopreservation. Finally, in the case of combining chemotherapy with radiation therapy, is used ovarian transposition by laparoscopy.

The results obtained at the present support the use of these techniques, representing the most effective method to motherhood of those cancer patients who have suffered the loss of ovarian reserve after chemotherapy.



INTRODUCCIÓN

Los avances en los tratamientos oncológicos y las mejoras en los métodos de detección han llevado a un aumento de las tasas de supervivencia en las pacientes con cáncer en edad reproductiva hasta valores de 80-90 %. Sin embargo, la gonadotoxicidad de estos tratamientos disminuye la fertilidad de la paciente mediante efectos a largo plazo como insuficiencia ovárica prematura (POI). El riesgo de POI es 4 veces mayor si se recibe quimioterapia en la adolescencia, pero se multiplica por 24 si el tratamiento es recibido entre los 21 y 35 (De la Fuente, 2011), por lo que aproximadamente entre el 20-50 % de mujeres jóvenes desarrollan POI después del tratamiento con alquilantes, que son agentes que modifican directamente la estructura del ADN mediante alquilación y formación de puentes cruzados bloqueando así la replicación (Calonge, 2016; Marín, 2021). El hecho de que más del 90 % de las afectadas no tengan hijos en el momento del diagnóstico (Lawrenz, 2012) ha llevado a la creación de una nueva área en la reproducción asistida: la preservación de la fertilidad (FP). De esta manera las pacientes tienen la posibilidad de procrear con sus propios gametos después de la remisión del cáncer (Cobo, 2018). Esto es posible gracias a la preservación de ovocitos, embriones y/o tejido ovárico antes del tratamiento gonadotóxico mediante su congelación (Calonge, 2016).

Un estudio mediante encuestas realizado en Suiza e Italia concluyó que de las 303 pacientes que participaron el 54 % deseaban futuros hijos biológicos antes del diagnóstico y entre ellas el 71 % lo mantuvo después del diagnóstico. También pudieron comprobar que el principal temor de estas mujeres era el de transmitir el cáncer a la descendencia o no poder cuidar de sus hijos en caso de recaída. Además, el 67 % discutieron sobre la fertilidad con sus médicos antes de iniciar la quimioterapia y, finalmente, sólo el 27 % optó por la preservación de la fertilidad (Ruggeri, 2019). Debido al creciente retraso de la maternidad muchas de estas pacientes no podrían cumplir su deseo de ser madre posteriormente, por lo que es de vital importancia transmitir a la paciente las opciones disponibles para la preservación de su fertilidad.

En general, la preservación de la fertilidad (FP) antes del tratamiento del cáncer es muy recomendable si la probabilidad de no quedarse embarazada tras la terapia contra el cáncer es superior al 30 % (ISFP Practice Committee, 2012). En este trabajo vamos a centrarnos en los siguientes casos:

- 1) Cáncer de mama.** Es el tumor invasivo más común en países occidentales (Sánchez-Serrano, 2009) y la indicación más frecuente para la preservación de la fertilidad por procesos patológicos en la mujer. Se estima su presencia en un 25 % antes de la menopausia, 15 % antes de 35-45 años y 2 % en menores de 34 años, con una incidencia de 1 caso de cáncer de mama en cada 228 mujeres antes de los 45 años (Sánchez-Serrano, 2009; Calonge, 2016). En 2018, se ha calculado que 2,1 millones de nuevos casos fueron diagnosticados en todo el mundo (Sciorio, 2020). La supervivencia a los 5 años es del 88% por lo que se estima que entre un 8 % y 10 % buscarán un embarazo (Calonge, 2016), suponiendo estas mujeres aproximadamente la mitad de la demanda de PF (Checa Vizcaíno, 2012).



Además, la incidencia ha aumentado durante la última década, pero a su vez la mortalidad ha disminuido, y a esto se le suma el retraso de la maternidad, por lo que la mayoría de mujeres no han cumplido su deseo reproductivo en el momento del diagnóstico (Sánchez-Serrano, 2009).

El mejor momento para la preservación de la fertilidad es después de la cirugía y antes de la terapia adyuvante. La criopreservación de embriones o de ovocitos se recomienda como una opción de preservación de la fertilidad antes de la quimioterapia. En los casos en los que el tratamiento es urgente se puede considerar la criopreservación de tejido ovárico, aunque también se puede considerar la recuperación de ovocitos inmaduros seguida de maduración *in vitro* (MIV) (ISFP Practice Committee, 2012).

- 2) **Linfomas.** El linfoma de Hodgkin (HL) es una neoplasia originada en células linfoides en diferentes estadios de maduración, lo cual explica su gran heterogeneidad biológica y clínica. Suele ser la segunda indicación para PF ya que aproximadamente un 1,7 % se diagnostican en pacientes menores de 20 años, un 3,8 % en pacientes de 20-34 años y el 6,8 % en pacientes entre 35-44 años (De la Fuente, 2011; Manau Trullás, 2018). Por otro lado, el linfoma no Hodgkin (NLH) es menos frecuente que el linfoma de Hodgkin en pacientes menores de 30 años y tiene una tasa de curación esperable del 60-70 % (Manau Trullás, 2018).

Según la edad se siguen diferentes estrategias para la preservación de la fertilidad:

- **Mujer adulta:** debido a que en la mayoría de casos no se puede retrasar el tratamiento oncológico se considera como primera opción la criopreservación de tejido ovárico. En los casos en los que sí se pueda retrasar el tratamiento se recomienda criopreservación de ovocitos o de embriones. También puede considerarse la recuperación de ovocitos inmaduros seguida de MIV y criopreservación de ovocitos o embriones. El efecto protector del agonista de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRHa) es cuestionable y controvertido, sin embargo, se puede considerar el tratamiento con GnRHa debido a su efecto protector para pacientes femeninas sometidas a quimioterapia que no se vayan a someter a trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) (ISFP Practice Committee, 2012).
- **Prepúber:** en este caso, al no poseer tejido maduro se procede a la criopreservación del tejido ovárico si el riesgo de insuficiencia ovárica después del tratamiento del cáncer es lo suficientemente alto como para justificar el procedimiento (ISFP Practice Committee, 2012).

- 3) **Leucemias.** Es el cáncer hematológico más común en mujeres menores de 20 años (Donnez, 2013) con una supervivencia global del 66-90 % en pacientes menores de 15 años (Manau Trullás, 2018). Aunque las tasas de supervivencia después del cáncer infantil también han mejorado considerablemente en las últimas décadas, la prevalencia de insuficiencia ovárica es del 6,3 % en 5 años, por tanto, tienen riesgo de presentar efectos tardíos de los cuales la infertilidad es el más frecuente (Moussaoui, 2021). En pacientes pediátricos, el riesgo de fracaso gonadal con quimioterapia es muy bajo en ausencia de TCMH (ISFP Practice Committee, 2012).

Las estrategias a seguir son las siguientes:



- Mujer adulta: Se debe considerar la criopreservación del tejido ovárico antes del TCMH. Sin embargo, el tejido recolectado de pacientes con leucemia no debe utilizarse para el autotrasplante debido al alto riesgo de reintroducción de células cancerosas. Alternativamente, se puede considerar la recuperación de ovocitos inmaduros seguida de MIV y criopreservación de ovocitos o embriones ([ISFP Practice Committee, 2012](#)).
- Prepúber: Criopreservación del tejido ovárico antes del TCMH, aunque tampoco puede autotrasplantarse debido al alto riesgo de reintroducción de células cancerosas. En ausencia de TCMH, la preservación de la fertilidad antes de la quimioterapia no es necesaria ([ISFP Practice Committee, 2012](#)).

A pesar de los progresos conseguidos se cree que cerca del 30 % de las mujeres diagnosticadas con cáncer no están debidamente informadas de las opciones de FP. Es necesario un asesoramiento individualizado en función del riesgo de insuficiencia gonadal, dependiendo de múltiples factores, incluyendo la edad y la reserva ovárica (número de folículos primordiales) que disminuye exponencialmente con la edad, el nivel de gonadotoxicidad de los fármacos y regímenes específicos, el tipo de tumor y su riesgo de metastatización al ovario; su fertilidad previa o no, la existencia de pareja o no y el tiempo disponible hasta iniciar el tratamiento ([Calonge, 2016](#); [Díaz-García, 2018](#); [Manau Trullás, 2018](#)).



1. FOLICULOGÉNESIS Y REGULACIÓN HORMONAL

Los ovarios tienen dos funciones: la foliculogénesis y secreción de estrógenos y progestágenos. Están formados por una corteza externa muy gruesa que contiene los folículos ováricos, y está poco delimitada con la parte interna, la médula. La foliculogénesis es la formación de los folículos en los que se desarrollan los ovocitos y comienza con las células germinativas primordiales que son células extragonadales que migran desde el saco vitelino embrionario hasta la corteza de la gónada, donde se diferencian en folículos primordiales e inducen la diferenciación del ovario (Brüel, 2015). En el tercer mes de desarrollo fetal, cuando la mitosis aumenta, los ovocitos de los folículos primordiales se detienen en la profase de la primera división meiótica y en el quinto mes de desarrollo la atresia o muerte celular reduce la cantidad de folículos primordiales exponencialmente de unos 5.000.000 hasta un millón en el momento del parto. Este número de folículos primordiales no aumenta posteriormente, por lo que constituye una reserva finita que se define antes de nacer. Antes de la menopausia una mujer produce sólo unos 400 folículos maduros, que contienen un ovocito secundario (Ross, 2012).

La maduración de los folículos primordiales comienza con la fase proliferativa cuando las células aplanadas que rodean al ovocito primario se tornan cúbicas y empieza a crecer, momento en el que recibe el nombre de folículo primario. Tras esto, el ovocito sigue creciendo y empieza a secretar glucoproteínas que forman una cubierta denominada zona pelúcida, las células foliculares de la lámina basal interna se tornan cilíndricas denominándose células de la granulosa, que poseen receptores para la hormona luteinizante (LH), mientras que la parte externa la forman las células de la teca, cuya capa interna está compuesta por células secretoras de andrógenos (precursores de estrógenos) que sintetizan por acción de la hormona luteinizante (LH) y poseen tanto receptores para la hormona folículo estimulante (FSH) como receptores LH. Entonces comienzan a aparecer cavidades con contenido líquido entre las células de la granulosa que se unen en una única cavidad denominada antro y que caracteriza al folículo secundario o antral. El folículo sigue aumentando de tamaño hasta alcanzar los 15-20 mm cuando constituye un folículo maduro o folículo De Graaf, que contiene el ovocito secundario maduro y sobresale de la superficie del ovario (Ross, 2012; Brüel, 2015). (Figura 1)

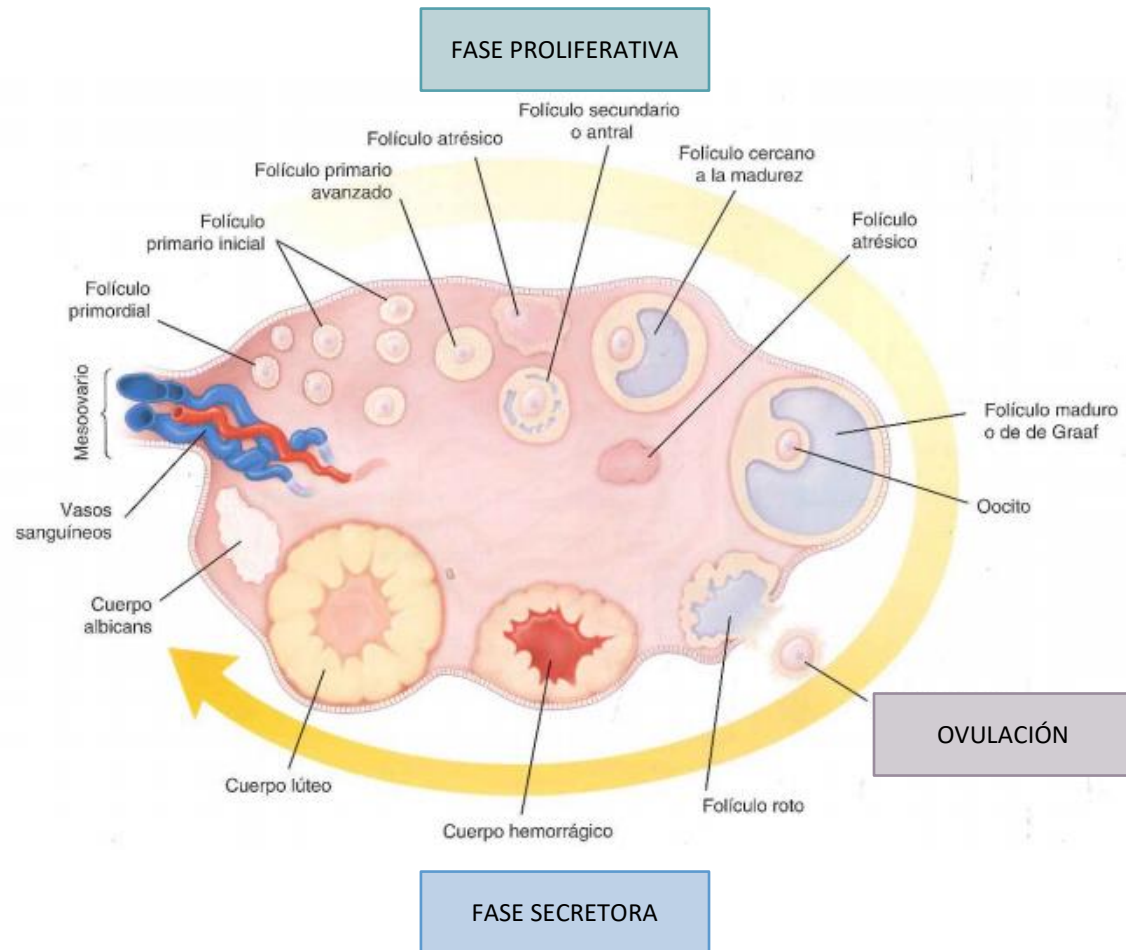


Figura 1. Esquema foliculogénesis (Ross, 2012).

Las gonadotropinas FSH y LH son secretadas por la adenohipófisis inducidas por la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) secretada por el hipotálamo. Ambas estimulan el crecimiento del folículo e inducen un aumento de la cantidad de receptores en las células de la granulosa y de la teca, además estimulan la secreción de estrógenos de las células de la teca. El aumento de la concentración de estrógenos inhibe por retroalimentación negativa la secreción de FSH, momento en el que tiene lugar el reclutamiento del folículo dominante y la atresia del resto y, posteriormente, la ovulación (Brüel, 2015).

Antes de la ovulación la adenohipófisis aumenta la liberación de LH y las células de la granulosa dejan de secretar estrógenos, tras esto se completa la primera división meiótica y cada célula recibe la misma cantidad de cromosomas pero una de ellas recibe la mayor parte del citoplasma, constituyendo el ovocito secundario, mientras que la otra forma el primer cuerpo polar. La fase proliferativa termina con la ovulación, que se produce en la mitad del ciclo menstrual y constituye el proceso por el que el ovocito secundario se libera del folículo De Graaf, entonces comienza la segunda división meiótica y se detiene en metafase. El ovocito no reanuda la división hasta que no sea fecundado por el espermatozoide. En la segunda mitad del ciclo, conocida como fase secretora, se produce la formación del cuerpo lúteo y durante ambas fases también se producen modificaciones en el endometrio que, en conjunto, se denominan ciclo menstrual (Ross, 2012; Brüel, 2015). (Figura 2)

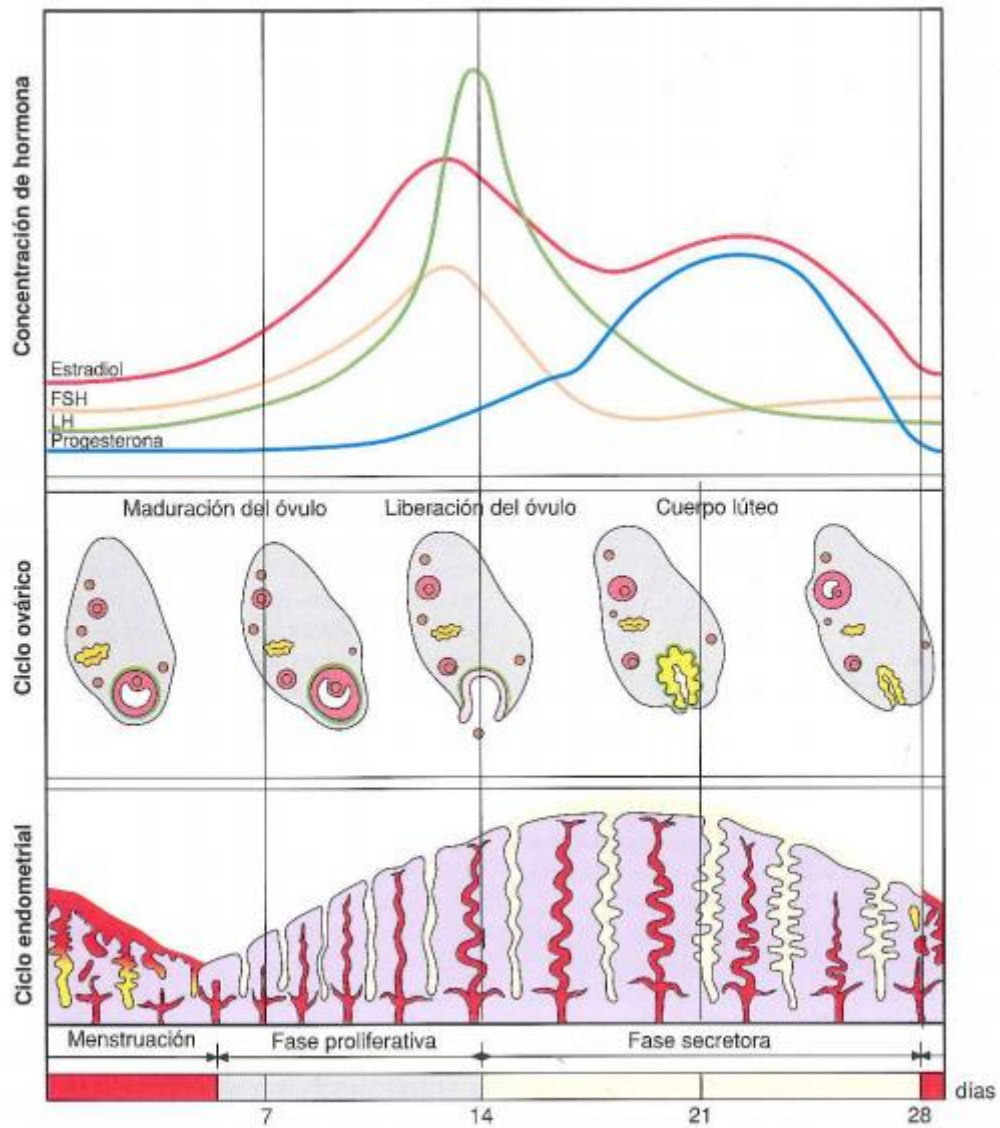


Figura 2. Esquema del ciclo hormonal, ovárico y menstrual (Brüel, 2015).



2. MARCO LEGAL

La **Ley 14/2006** sobre técnicas de reproducción humana asistida no regula la preservación de gametos, tejido ovárico ni embriones. Sin embargo, hace ciertas menciones de la criopreservación: “el semen podrá criopreservarse en bancos autorizados durante toda la vida del varón de quien procede, los ovocitos y tejido ovárico requieren de una autorización del centro para su criopreservación; y en el caso de estos últimos y de los embriones se contempla su criopreservación para la utilización por la propia mujer progenitora o su cónyuge (femenino), entre otras posibilidades”. También fija como plazo máximo para la preservación de ovocitos o embriones en el momento en que la mujer receptora deje de reunir los requisitos clínicamente adecuados para la práctica de la técnica. Donde sí se contempla expresamente la preservación de gametos y embriones a estos fines es en la **Orden SSI/2065/2014**, de 31 de octubre (Calonge, 2016). Se permite la congelación de gametos y embriones para preservar la fertilidad en caso de indicación médica, remarcándose que deben darse los siguientes criterios:

1º Se realizará en pacientes con posible riesgo de pérdida de su capacidad reproductiva asociada a exposición a tratamientos gametotóxicos o a procesos patológicos con riesgo acreditado de fallo ovárico prematuro o riesgo acreditado de fallo testicular primario.

2º La transferencia de los gametos o preembriones criopreservados se llevará a cabo en mujeres menores de 50 años, siempre y cuando no presenten ningún tipo de patología en la que el embarazo pueda entrañarle un grave e incontrolable riesgo, tanto para su salud como para la de su posible descendencia.

3º Se realizará exclusivamente por indicación médica, no incluyéndose cuando sea únicamente a petición propia del paciente para uso diferido” (Calonge, 2016).

Como otras nuevas tecnologías reproductivas, la aplicación de criopreservación y trasplante ovárico plantea una serie de cuestiones legales y éticas potenciales relacionadas con el bienestar del paciente y de la descendencia. Entre ellas, el límite de edad para poder hacer uso de los ovocitos, embriones o tejido ovárico criopreservado, el tiempo máximo de su almacenamiento, la capacidad de un menor diagnosticado de cáncer para dar su consentimiento, etc. Además de las mejoras en los tratamientos de reproducción asistida también serán necesarias mejoras en la seguridad. Se nos pueden plantear dilemas éticos como si una mujer que solicita el uso de su tejido ovárico preservado ha alcanzado la edad habitual de la menopausia en su cultura o ha superado una edad designada tiene derecho a hacer uso de sus ovocitos congelados. El factor importante en esta situación es la salud de una anciana que solicita un reemplazo autólogo o MIV de sus folículos (ovocitos) con el propósito de iniciar un embarazo. No es ético establecer un embarazo a través de estas técnicas para una anciana si no puede cumplir con los criterios de salud y responsabilidad. Además, ¿es ético cosechar y congelar tejido ovárico sin una certeza de éxito en el trasplante? Un diagnóstico de cáncer es una crisis de vida para cualquier persona. En una encuesta, los pacientes de cáncer han mostrado un fuerte deseo de estar informados de las opciones disponibles



para la preservación de la fertilidad y la reproducción futura. Aunque los pacientes de cáncer desean desesperadamente preservar la fertilidad sin otra opción, es responsabilidad de los especialistas en cáncer y fertilidad tratar de evitar malentendidos y el mal uso de esta nueva tecnología ya que las tasas de éxito no son del 100 %, ya que dependen de cada caso en concreto. En resumen, hay muchas cuestiones éticas que deben ser cuidadas en el desarrollo de esta tecnología (Tao, 2008).



OBJETIVOS

- Observar los efectos que produce la quimioterapia sobre la fertilidad.
- Comprender los métodos de actuación según el tipo de cáncer y la edad de la paciente.
- Discutir las ventajas e inconvenientes de cada método.
- Conocer los resultados obtenidos hasta el momento.



METODOLOGÍA

Para la recolección de datos utilicé la página web **ScienceDirect** de la editorial Elsevier donde accedí a los artículos autenticándome con el correo de la Universidad de Murcia. Seleccioné las revistas más reconocidas de medicina y biología reproductiva, reproducción asistida, endocrinología, ginecología y oncología. Entonces realicé una primera selección utilizando las palabras clave *fertility preservation* y a partir de ahí fui buscando artículos concretos de los puntos a tratar según iba leyendo la información general como *effects of chemotherapy*, *ovarian stimulation*, *emergency fertility preservation* *ovocyte cryopreservation*, *ovarian tissue cryopreservation*, *MIV*, etc.

Finalmente, después de leer, seleccionar y ordenar los artículos por temas establecí los objetivos y me decanté por tratar sólo los casos de cáncer de mama, linfomas y leucemias ya que eran más numerosos y a que por cuestión de extensión no me daría tiempo a tratar más casos. Por lo que realicé una última búsqueda de los resultados obtenidos de preservación de la fertilidad en estos casos, además de estudios que compararan los diferentes métodos de estimulación ovárica y que evaluaran los tratamientos de reproducción asistida tras la remisión del cáncer. Los artículos más antiguos los utilicé por el reconocido prestigio de los autores, pero en su mayoría me decanté por la última década ya que como en cualquier campo van surgiendo avances que dan lugar a mejores resultados, por ejemplo, pude comprobar el progreso de la criopreservación de tejido ovárico que desde 2019 dejó de considerarse experimental.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. EFECTOS DE LA QUIMIOTERAPIA SOBRE LA FERTILIDAD

La toxicidad derivada de la quimioterapia se manifiesta en las distintas células de los folículos ováricos. Las células de la granulosa son células con un elevado ritmo de división celular y el daño inducido por la quimioterapia puede llevar desde amenorrea temporal hasta a POI o menopausia prematura con síntomas como atrofia vaginal, osteoporosis, enfermedad cardiovascular e infertilidad. En el caso de las células germinales, que tienen un bajo ritmo de división, el daño producido es directamente al ADN produciendo apoptosis, mutaciones puntuales imposibles de detectar, además de alteraciones cromosómicas como las aneuploidías (Manau Trullás, 2018). Hay varias teorías que explican el daño de las células germinales:

- 1. Toxicidad sobre estroma ovárico:** El daño es debido a cambios en la microvascularización por la exposición a antineoplásicos. Se asocian con isquemia y posterior fibrosis cortical, comprometiendo la supervivencia de los folículos (Manau Trullás, 2018).
- 2. Toxicidad directa sobre los folículos:** Los folículos primordiales constituyen la reserva ovárica de la paciente y existen en número finito desde la fase embrionaria. Los folículos están formados por ovocitos primarios rodeados por una única capa de células foliculares, todavía no funcionales desde el punto de vista endocrinológico. Con la edad, en condiciones fisiológicas, la pérdida de folículos es exponencial. Al ser expuesta la paciente a agentes gonadotóxicos, si la destrucción de los folículos es parcial, ello dará lugar a menopausia precoz, y si esta es total, a infertilidad. Los folículos primarios y secundarios, ya disponen de células de la granulosa cuboides capaces de secretar hormonas, y su destrucción es la responsable de la amenorrea que acompaña a la quimioterapia (Manau Trullás, 2018).
- 3. Fenómeno de *burn-out* o reclutamiento elevado de folículos:** Con el daño de folículos primarios y secundarios por la quimioterapia se produce una disminución de las sustancias que en condiciones fisiológicas inhiben la maduración de los folículos primordiales (Manau Trullás, 2018). El daño del ADN y la acción mitocondrial conducen a la apoptosis y al agotamiento prematuro e irreversible de los folículos en crecimiento por efecto citotóxico directo e indirecto a través del de crecimiento excesivo de los folículos primordiales (*burn-out*) y atrofia ovárica con fibrosis (Berjeb, 2021)

1) Tratamientos gonadotóxicos

El riesgo de daño gonadal va a depender del tipo de régimen, la dosis y el número de ciclos. Por lo que existen protocolos de quimioterapia que afectan a la fertilidad de la paciente (esterilizantes), que generalmente incluyen agentes alquilantes como ciclofosfamida, busulfán y procarbazona (Manau Trullás, 2018), y otros que no producen efectos apreciables sobre la fertilidad (no esterilizantes). Se ha informado que el 64% de las pacientes adultas sometidas a terapia de cáncer experimentaron uno o más de los



síntomas de insuficiencia ovárica (Badawy, 2009). A continuación, vamos a analizar los tratamientos antineoplásicos más usados según el riesgo gonadal:

➤ **Alto riesgo (>80% amenorrea permanente):**

- Ciclofosfamida: Es el agente más comúnmente implicado en causar daño a los ovocitos y las células de la granulosa de una manera dosis-dependiente (Donnez, 2013), que varía en función de la edad de la paciente (5 g para mujeres mayores de 40 años, 9 g entre 30-40 años y 20 g entre 20-30 años) (Manau Trullás, 2018).
- Los agentes alquilantes, como busulfán, a menudo se asocian con radiación ionizante abdominal (Manau Trullás, 2018). Se ha informado que una dosis de radioterapia de 5-20 Gy administrada al ovario es suficiente para alterar completamente la función gonadal independientemente de la edad de la paciente (Donnez, 2013).
- BEACOPP (doxorrubicina, bleomicina, vincristina, etopósido, ciclofosfamida, procarbazona) en pacientes mayores de 30 años (Manau Trullás, 2018).
- COPP/MOPP o híbrido (ciclofosfamida o mostaza nitrogenada, vincristina, procarbazona, prednisona) (Manau Trullás, 2018).
- TCMH: Las tasas de POI en linfomas y leucemias son del 70 % al 100 % y las tasas de recién nacido vivo después del tratamiento son del 3 % al 8 % (ISFP Practice Committee, 2012).

➤ **Riesgo intermedio (40-60% amenorrea permanente):**

- BEACOPP escalado en pacientes menores de 30 años (Manau Trullás, 2018). En el caso del HL las tasas de POI son alrededor del 50 % en los menores de 30 años (ISFP Practice Committee, 2012).
- MF (ciclofosfamida, metotrexato, fluorouracilo) o CA (clina antracina, ciclofosfamida) el riesgo es del 33 % en el caso del tratamiento del cáncer de mama (ISFP Practice Committee, 2012).
- FEC (fluorouracilo, epirrubicina, ciclofosfamida), FAC (fluorouracilo, doxorrubicina, ciclofosfamida) o CA seguido de docetaxel, en el 50-65 % de los casos de cáncer de mama experimentarán amenorrea (ISFP Practice Committee, 2012).

➤ **Bajo riesgo (<20% amenorrea permanente):**

- ABVD (doxorrubicina, bleomicina, vinblastina, dacarbazina) en mayores de 32 años (Manau Trullás, 2018).
- CHOP (ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina, prednisona) (Manau Trullás, 2018).
- CVP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona) (Manau Trullás, 2018).
- Antraciclina y citarabina (Manau Trullás, 2018).

➤ **Muy bajo riesgo:**

- ABVD: En menores de 32 años (Manau Trullás, 2018). Las tasas de POI para HL son inferiores al 10 % en la edad reproductiva (ISFP Practice Committee, 2012).
- Metotrexato: El riesgo irá aumentando en función de la intensidad de la dosis y repetición de las mismas (Manau Trullás, 2018).
- CHOP: Las tasas de POI para pacientes con NHL son de alrededor del 5 % y las tasas de embarazo después del tratamiento son del 50 % (ISFP Practice Committee, 2012).



- Hyper-CVAD (ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina, dexametasona, citarabina, metotrexato): Las tasas de POI son del 14 % en NHL y las tasas de embarazo después del tratamiento son del 43 % (ISFP Practice Committee, 2012).

En el caso de los tratamientos para leucemias, el riesgo de infertilidad en pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA) o leucemia mieloblástica aguda (LMA) es muy bajo, ya que los protocolos de tratamiento contemporáneos implican dosis más bajas de alquilantes o están desprovistos de alquilantes. La leucemia mieloide crónica (LMC) se puede tratar con inhibidores de la tirosina cinasa como imatinib o rituximab que pueden no perjudicar la fertilidad en seres humanos, pero hay datos insuficientes sobre estos medicamentos sobre el potencial reproductivo (ISFP Practice Committee, 2012).

2) Resultados gonadotoxicidad

La evidencia de que la quimioterapia produce una pérdida de la reserva ovárica ha sido probada. En un estudio que incluía pacientes que tenían principalmente cánceres hematológicos compararon la densidad de los folículos primordiales antes y después del tratamiento gonadotóxico. Hay que tener en cuenta que ésta es inversamente proporcional a la edad de la paciente (Figura 3). Sin embargo, se pudo comprobar que pacientes expuestas a quimioterapia tenían un recuento folicular menor comparándolas con pacientes de la misma edad sanas (Figura 4). Además, también compararon los efectos de distintos regímenes antineoplásicos viendo que, entre aquellos tratados con regímenes alquilantes (CHOP, AC, VACA y BEACOPP) y aquellos que habían recibido regímenes no alquilantes (ABVD, idarubicina-citoarabina, etopsida metotrexato y ADE-GMT), el recuento medio de folículos primordiales fue significativamente menor en los que habían recibido un alquilante (Figura 4, comparación grupo 32 años tratados CHOP, alquilante, y AC, no alquilante) (Oktem, 2007).

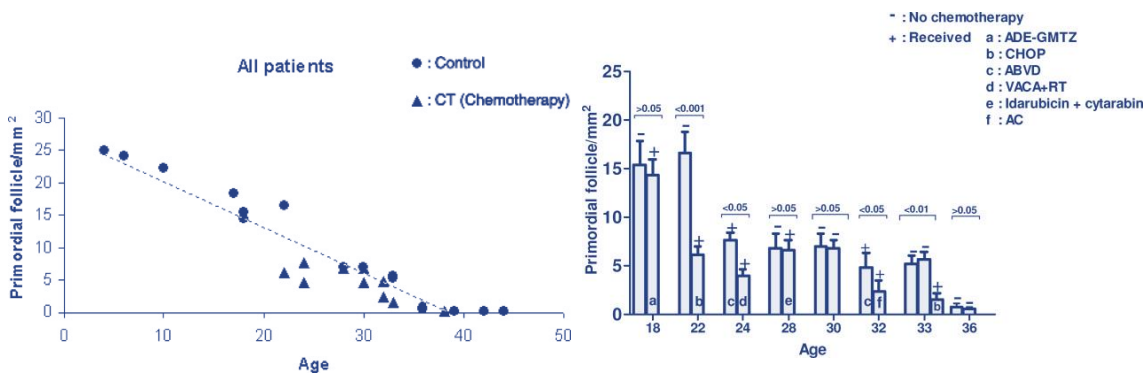


Figura 1. Densidad folicular basal inversamente proporcional a la edad de la paciente (Oktem, 2007).

Figura 2. Recuento de folículos en pacientes sanos y tratados con quimioterapia (Oktem, 2007).

También se ha evaluado el daño histológico del ovario, siendo el estudio más importante el de Meirow y colaboradores (2007). Los objetivos de este estudio fueron evaluar el daño en los ovarios humanos expuestos a quimioterapia no esterilizante. Lo primero a tener en cuenta es que el efecto de la

quimioterapia en el ovario no es un fenómeno de todo o nada y que el número de folículos primordiales supervivientes tras el tratamiento está en relación inversa con la dosis de quimioterapia. En muchas pacientes jóvenes, el daño ovárico es sólo parcial, y pueden recuperar la función gonadal después de la quimioterapia. Sin embargo, dado que estas pacientes jóvenes podrían haber perdido parte de su reserva folicular primordial ovárica, podrían tener un mayor riesgo de menopausia prematura.

El estudio histológico de muestras cosechadas para criopreservación se realizó mediante tinción con hematoxilina eosina y mediante una tinción inmunohistoquímica específica para progenitores de células endoteliales CD34p mostrando que las pacientes previamente expuestas a quimioterapia presentaban cambios patológicos relacionados con el tejido vascular. Los grandes vasos sanguíneos del estroma cortical presentaron engrosamiento y una prominente hialinización, fibrosis intimal leve a moderada y engrosamiento de la capa muscular. Estos cambios causaron estrechamiento severo y obliteración de la luz vascular (Figura 5 y 6) (Meirow, 2007).

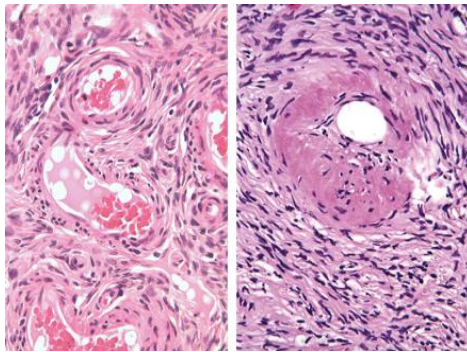


Figura 5. Vaso sanguíneo de ovario normal Vs. Vaso sanguíneo expuesto a quimioterapia (Tinción de H&E, 400x) (Oktem, 2007).

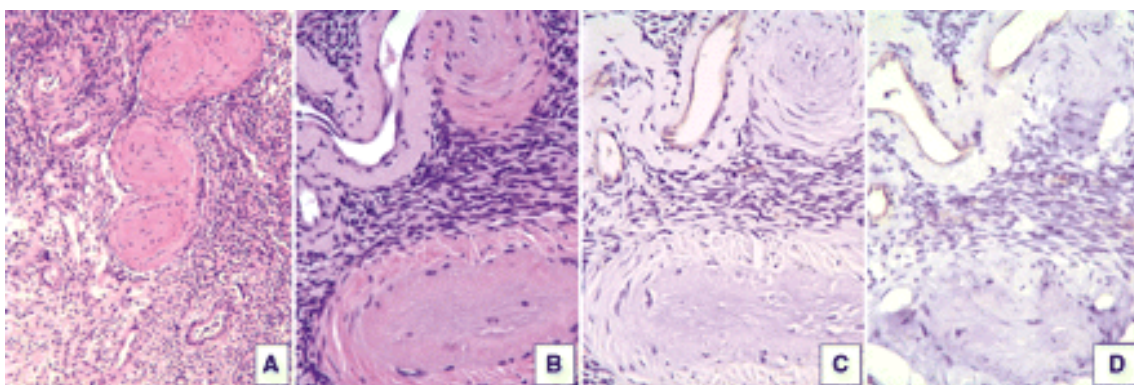


Figura 6. Cambios vasculares demostrados en ovarios expuestos a quimioterapia. Tinción de H&E (A 200x y B 400x) Tinción inmunohistoquímica con CD31 (C) y CD34 (D) (Meirow, 2007).

Mediante la tinción inmunohistoquímica con CD31 y CD34 se destaca el revestimiento endotelial preservado en los vasos dañados (Figura 6C y D). En la corteza de los ovarios expuestos a la quimioterapia se observó la proliferación de pequeños vasos sanguíneos sin ningún patrón de organización, denominada neovascularización (Figura 7). La mayor tinción con CD34 (Figura 8B) en comparación con CD31 (Figura 8A) apoya que se trata de vasos sanguíneos de neovascularización ya que los progenitores de las células endoteliales CD34⁺ se incorporan en la neovasculatura de los órganos isquémicos para acelerar la tasa de restauración de la sangre a un órgano isquémico y CD31 se une al endotelio de vasos maduros (Meirow, 2007).

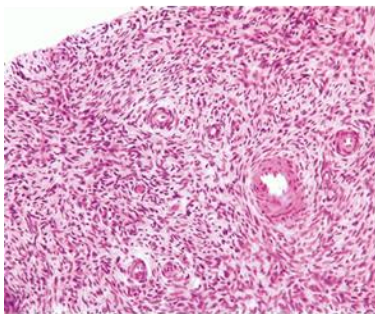


Figura 7. Neovascularización de ovario expuesto a quimioterapia (Tinción de H&E, 400x) (Meirow, 2007).

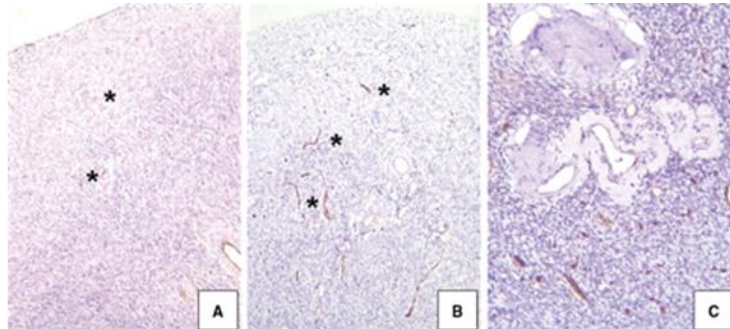


Figura 8. Tinción inmunohistoquímica con CD31 de tejido maduro (A) 100x y CD34 que se incorpora a tejido neovascular (B) 100x. (C) Daño vascular asociado a la proliferación de pequeños vasos sanguíneos presentes cerca y alrededor de los vasos dañados (Tinción inmunohistoquímica con CD34, 200x) (Meirow, 2007).

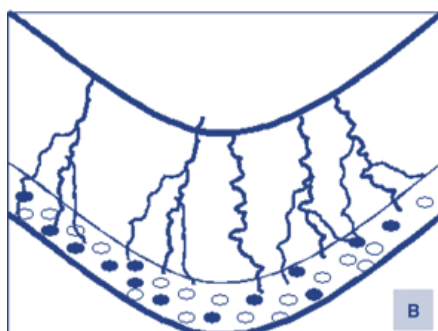
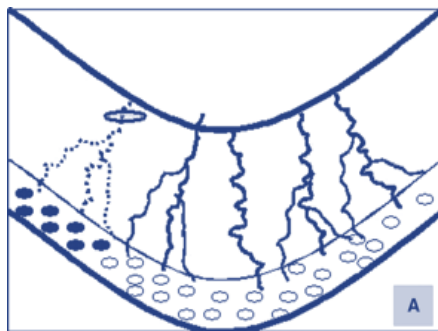


Figura 9. (A) La lesión del vaso sanguíneo de la arteria terminal causa un área localizada de fibrosis cortical y pérdida focal de folículos primordiales (discos negros). (B) Folículos lesionados y pérdida por efecto apoptótico. directo de la quimioterapia (Meirow, 2007).

Por lo tanto, la quimioterapia causa lesiones en los vasos sanguíneos ováricos y el estrechamiento y la obstrucción de los vasos sanguíneos dará lugar a la interrupción del suministro de sangre a ciertas áreas de la corteza ovárica, lo que resulta en fibrosis focal y neovascularización. Entonces la reserva ovárica queda en una zona carente de vascularización y se atrofian los folículos. Así, cuando las pacientes son esterilizadas con altas dosis de quimioterapia toda la corteza se lesiona y se produce atrofia con la pérdida de folículos primordiales y, finalmente, esto lleva a la insuficiencia ovárica. Aunque existe otra hipótesis en la que la quimioterapia primero causa daño a los folículos y entonces los vasos sanguíneos son menos atraídos a esa zona y el resultado es la fibrosis focal. Los resultados de este estudio sugieren que la quimioterapia afecta a todo el ovario, y no sólo a nivel directo de los folículos. La figura 9 presenta las dos hipótesis de pérdida folicular: pérdida segmentaria con fibrosis después de una lesión vascular, según los resultados de este estudio (9A) y los efectos directos de la

quimioterapia en los folículos primordiales que causarán la disfunción de los folículos distribuidos equitativamente en toda la corteza (9B) (Meirow, 2007).

Sin embargo, estudios recientes apoyan la segunda hipótesis por la que los agentes quimioterapéuticos afectan directamente a los folículos primordiales o a los folículos en crecimiento (Figura 10). Esta disminución de folículos primordiales puede conducir a una mayor activación de los que han quedado y llevar a la pérdida acelerada de la reserva ovárica. La quimioterapia puede tener dos efectos diferentes en la función ovárica. La primera es inmediata, durante o después del tratamiento, que es esa pérdida de folículos en crecimiento que resulta en amenorrea. Sin embargo, si los folículos primordiales restantes son suficientes tras el cese del tratamiento, la población de folículos en crecimiento se restaurará y la menstruación se reanudará. Por lo que el efecto a largo plazo causado por el agotamiento de la reserva ovárica resultará en una vida reproductiva más corta y POI. Cuando la reducción de la reserva folicular primordial está casi completa, el efecto es agudo y el POI es inmediato. Todo esto se debe a que el número de folículos primordiales se determina antes del nacimiento, el ovario tiene una cantidad fija de ovocitos. Los folículos primordiales son continuamente reclutados, pero sólo muy pocos pasarán a través de la etapa pre-ovulatoria y finalmente sólo uno ovulará: la mayoría se vuelven atróficos y mueren en algún momento durante el desarrollo (Sciorio, 2020).

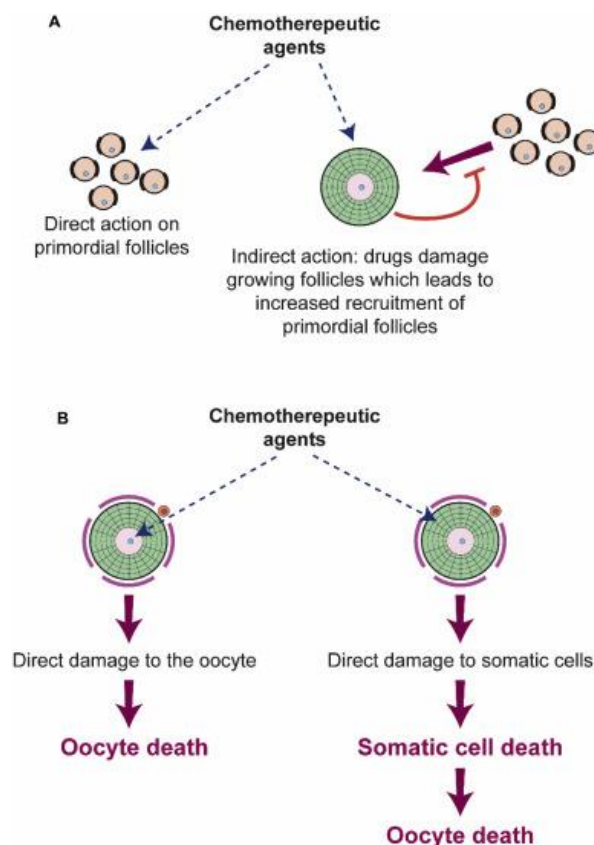


Figura 10. (A) Los agentes quimioterapéuticos podrían estar afectando directamente al *pool* de folículos primordiales. A medida que los folículos en crecimiento inhiben el reclutamiento de folículos primordiales, la pérdida de esta población en crecimiento conducirá a una mayor activación de los folículos primordiales y así la pérdida de esa reserva. (B) Los agentes quimioterapéuticos podrían estar dirigidos directamente al ovocito o a las células somáticas. La muerte de ovocitos sería el resultado de la muerte de las células somáticas foliculares, ya que el ovocito depende de estos para su supervivencia (Sciorio, 2020).



Otra forma de evaluar el impacto de la quimioterapia en la reserva ovárica es el nivel de hormona antimülleriana (AMH). Un estudio retrospectivo reciente realizó el seguimiento de 134 pacientes de entre 15 y 40 años que fueron remitidas para la preservación de la fertilidad antes del tratamiento contra el cáncer de mama y linfoma de Hodgkin en su mayoría. El impacto de la quimioterapia en la reserva ovárica se estudió comparando la AMH inicial media y la AMH media después del tratamiento. La comparación se hizo según el tipo de cáncer y los protocolos antineoplásicos utilizados y, además, se estudió la correlación entre la disminución de la AMH y el número de ciclos con la edad de las pacientes y con la asociación de la radioterapia a la quimioterapia. Los protocolos más comunes fueron BEACOPP, ABVD o ambos en el linfoma de Hodgkin y FEC + TXT (5-fluorouracilo, epirrubicina, ciclofosfamida + Docetaxel) en el cáncer de mama. El promedio de ciclos fue de $6 \pm 1,7$ y se utilizó ciclofosfamida en el 86,4 % de los casos (Berjeb, 2021).

Se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre la AMH media antes y después del tratamiento en todas las pacientes con linfoma tratadas con BEACOPP o aquellas con cáncer de mama tratadas con el protocolo FEC + TXT. Esto podría explicarse por el hecho de que ambos protocolos contenían ciclofosfamida, que como hemos dicho anteriormente es el agente alquilante con mayor riesgo de gonadotoxicidad, pudiendo producir la destrucción de los folículos incluso a dosis bajas. Para el protocolo ABVD, no se encontró ninguna diferencia entre los niveles de AMH antes y después del tratamiento independientemente de la edad de los pacientes. Lo que demuestra que es un protocolo con un riesgo moderado de gonadotoxicidad (Berjeb, 2021).

Además, la caída de la AMH observada en pacientes de cáncer de mama fue mayor que en pacientes con linfoma de Hodgkin (Berjeb, 2021). En estudios anteriores también encontraron que los niveles de AMH en las pacientes afectadas por el LH o el LNH eran significativamente más bajos antes del inicio de la quimioterapia que en los controles sanos. Además, aunque las pacientes con linfoma eran más jóvenes tuvieron un rendimiento de menos ovocitos que las de cáncer de mama (Lawrenz, 2012).

La **figura 11** muestra los niveles de AMH de los grupos de estudio y control y el número de ovocitos recuperados en el grupo de pacientes con linfoma en comparación con el grupo de pacientes con cáncer de mama. Si tomamos al cáncer como una enfermedad sistémica, el aumento de las citocinas también podría conducir a una reducción de la reserva ovárica en las mujeres. Y el hecho de que la reserva ovárica ya esté comprometida en mujeres jóvenes con un linfoma antes del inicio de la quimioterapia incrementa el riesgo de que incluso una quimioterapia menos agresiva pueda conducir a un deterioro relevante de la función ovárica en pacientes con LH y LNH. Por lo tanto, la preservación de la fertilidad es de vital importancia en estas pacientes (Lawrenz, 2012).

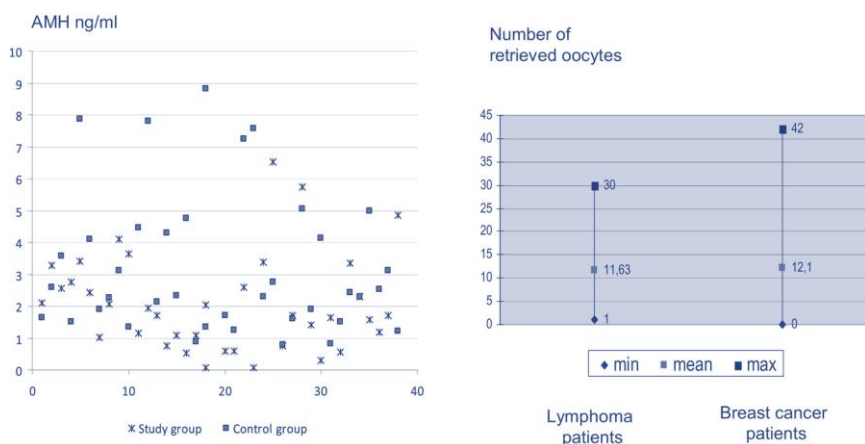


Figura 11. Niveles de AMH de pacientes con linfoma y del grupo de control y número de ovocitos recuperados de pacientes con linfoma en comparación con pacientes con cáncer de mama (Lawrenz, 2012).

Como hemos dicho anteriormente, el número de folículos primordiales disminuye con la edad (Figura 12) y puede ser un factor predictivo de agotamiento ovárico secundario al tratamiento contra el cáncer. De manera que cuanto más joven es la paciente mejor resiste la quimioterapia ya que posee una mayor reserva inicial de folículos primordiales. Sin embargo, un bajo nivel de AMH no necesariamente conduce a la infertilidad, aunque puede significar un aumento de la edad biológica de las mujeres con una reserva ovárica deteriorada cuantitativa pero no necesariamente cualitativamente. Por lo tanto, sería interesante ampliar este trabajo mediante un seguimiento prolongado en términos de tasa de embarazo, tasa de natalidad viva y, por supuesto, controles de AMH a intervalos regulares para todas las pacientes remitidas para la preservación de la fertilidad (Berjeb, 2021).

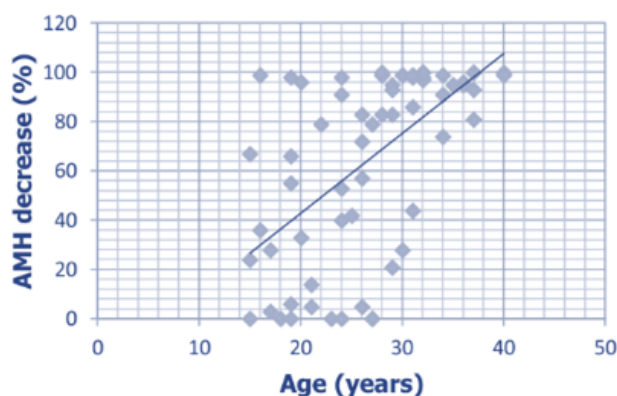


Figura 12. Correlación entre la disminución de AMH con la edad (Berjeb, 2021).



2. ESTIMULACIÓN OVÁRICA

Para la criopreservación de ovocitos o embriones, las mujeres tienen que someterse a estimulación ovárica por la hormona foliculoestimulante (FSH) para obtener crecimiento multifolicular, combinada con antagonistas o agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) para prevenir un aumento prematuro de la hormona luteinizante (LH) (Dahhan, 2017).

El tiempo medio de estimulación ha disminuido considerablemente con la introducción de antagonistas de GnRH en 1990 para disminuir la gonadotoxicidad del tratamiento (Blumenfeld, 2008) y protocolos de estimulación de inicio aleatorio. Además, con la coadministración de inhibidores de la aromatasas, ahora es posible lograr un crecimiento multifolicular sin alcanzar niveles suprafisiológicos de estrógenos, lo cual es deseable en el caso de cánceres sensibles a las hormonas (Marín, 2021).

En la actualidad existen diversos protocolos que vamos a analizar a continuación:

1) Convencional

La estimulación ovárica para la criopreservación de ovocitos o embriones se inicia al comienzo de la fase folicular el día 2-3 del ciclo menstrual y puede requerir de 2 a 6 semanas (Cakmak, 2013; Jochum, 2019). El protocolo con antagonista de la GnRH y agonista de GnRH (GnRHa) se considera como el protocolo estándar para las pacientes de cáncer sometidas a criopreservación ya que evita el pico LH y es el que se realiza cuando no hay limitaciones de tiempo. Ensayos aleatorizados muestran que la coadministración de GnRHa durante la quimioterapia puede reducir el riesgo de POI (Marín, 2021). Hasta ahora se había creído que era debido a que ejercía un efecto protector sobre el ovario ante el daño por ciclofosfamida mediante varios mecanismos: la disminución de la perfusión ovárica debido al estado hipoestrogénico generado por la GnRHa, lo que resulta en una menor exposición de los ovarios a los agentes quimioterapéuticos (Blumenfeld, 2008; Marín, 2021), la existencia de receptores GnRH-I y -II cuya activación provoca una disminución de la apoptosis, o a la regulación de una molécula antiapoptótica intragonadal como la esfingosina-1-fosfato (Blumenfeld, 2008; Badawy, 2009). Sin embargo, otros estudios muestran que la coadministración de GnRHa no previene el daño del ADN, la apoptosis o la reducción de la reserva ovárica (Turan, 2019), por lo que no está demostrado.

Ejemplo de estimulación estándar: en el día 2 del ciclo o el segundo día de interrupción de la píldora contraceptiva se administra 225 UI/día rFSH. El día 5 o 6 se realiza un recuento de folículos antrales basales mediante ecografía endovaginal y cuando los ovocitos tienen un tamaño de 12- 14 mm o el nivel de estradiol es mayor de 300 ng/mL, se administra un antagonista de la GnRH para evitar el pico prematuro de la LH. Al alcanzar un folículo los 18-20 mm se induce la ovulación mediante inyección subcutánea de 6500 UI de hCG-r (Gonadotropina coriónica humana). Los antagonistas GnRH se mantienen hasta ese día. La aspiración del folículo se realiza 34-36 h después del desencadenante de la ovulación. Los ovocitos son criopreservados en metafase II o fertilizados mediante inyección intracitoplasmática (ICSI) con la criopreservación posterior de los embriones (Dahhan, 2017; Jochum, 2019). (Figura 13)

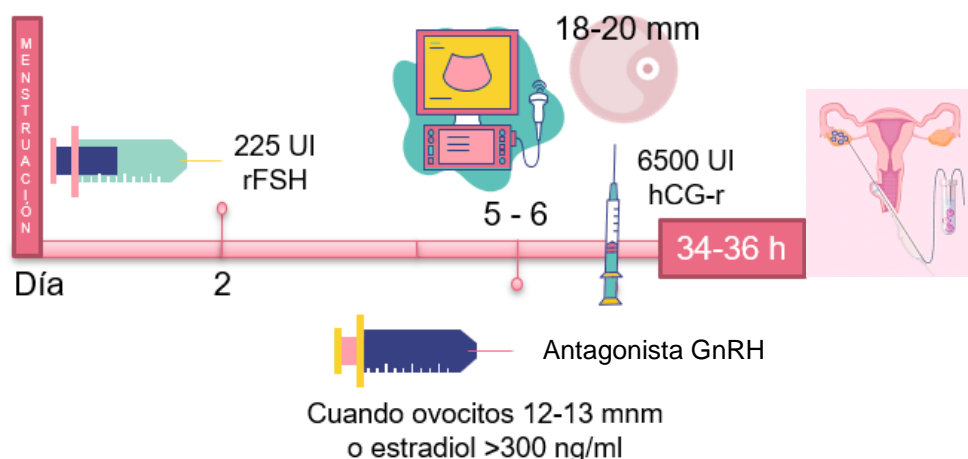


Figura 13. Protocolo de estimulación ovárica estándar basado en (Dahhan, 2017).

2) Pacientes con cáncer de mama

Las mujeres con cáncer de mama tienen tiempo suficiente para realizar la estimulación ovárica ya que la quimioterapia se puede retrasar hasta 12 semanas (Checa Vizcaíno, 2012). A pesar de que no existan estudios suficientes que demuestren que los estrógenos exógenos empeoren el pronóstico del cáncer de mama, se añaden a los protocolos de estimulación inhibidores de la aromatasa como tamoxifeno y letrozol porque parecen mejorar los pronósticos al usarse como terapia coadyuvante a largo plazo (Dahhan, 2017). El protocolo más utilizado es el COST-LESS (*Controlled Ovarian Stimulation Treatment with Letrozole Supplementation Study*) (Oktay, 2010; Alexander, 2021) cuyas ventajas son que no crea ningún retraso en la iniciación del tratamiento antineoplásico y produce el mismo número de ovocitos que un protocolo estándar (Checa Vizcaíno, 2012).

Por lo tanto, en la práctica la estimulación ovárica varía desde protocolos estándar sin agentes inhibidores de la aromatasa hasta protocolos de estimulación ajustados que añaden tamoxifeno o letrozol. Además, se ha visto que la diferencia en el número de ovocitos recuperados usando tamoxifeno o letrozol no es estadísticamente significativa, por lo que hoy en día ambos protocolos están aceptados (Dahhan, 2017).

Estimulación ovárica con tamoxifeno: administración de 60 mg de tamoxifeno por vía oral por la noche y 225 UI de rFSH desde el día 2 del ciclo. El día 5 de rFSH se administra un antagonista de GnRH. Cuando un folículo o más alcanza los 18-20 mm se induce la ovulación mediante inyección subcutánea de 6500 UI de hCG-r. Los antagonistas GnRH se mantienen hasta ese día, pero tamoxifeno y rFSH se dejan de administrar antes. La aspiración del folículo se realiza 34-36 h después del desencadenante y los ovocitos son criopreservados en metafase II o fertilizados mediante ICSI con la criopreservación de los embriones (Dahhan, 2017). (Figura 14)

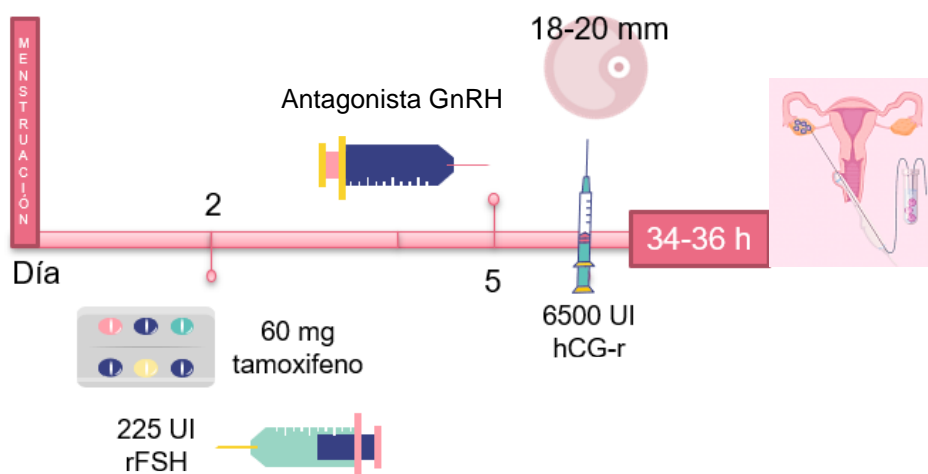


Figura 14. Protocolo de estimulación ovárica con tamoxifeno basado en (Dahhan, 2017).

Estimulación ovárica con letrozol: administración de 5 mg/día de letrozol por vía oral desde el día 2 del ciclo por las noches y desde el día 4 del ciclo 225 UI de rFSH. A partir de aquí es igual que en el protocolo anterior sólo que las mujeres reinician el letrozol en el día de la punción para evitar un aumento de rebote en los niveles de estradiol, y se mantiene durante 3 días (Dahhan, 2017). (Figura 15)

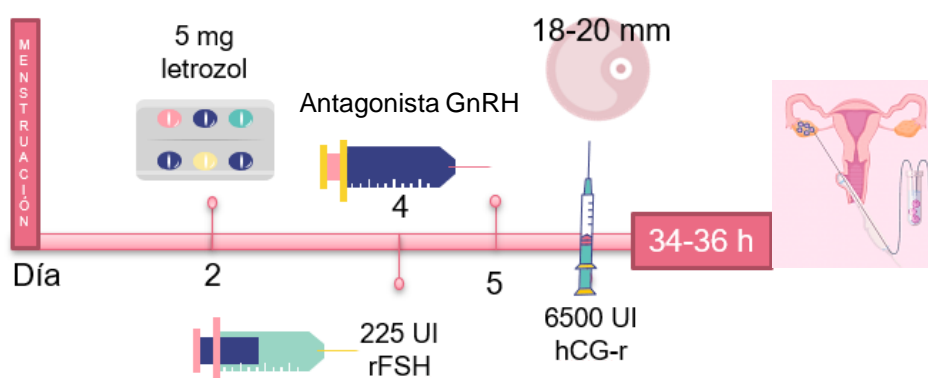


Ilustración 15. Protocolo de estimulación ovárica con letrozol basado en (Dahhan, 2017).

3) Preservación de emergencia

En los casos en los que la quimioterapia no puede posponerse, la estimulación se debe realizar con urgencia y la elección se realiza en función del día del ciclo menstrual de la paciente (Jochum, 2019) que se evalúa por el inicio del último período menstrual, por ultrasonido y/o por la concentración de progesterona. La fase folicular tardía se puede determinar por la aparición de un folículo dominante (mayor de 13 mm) a partir de día 7 del ciclo y nivel de progesterona menor de 2 ng/mL y la fase lútea por

concentraciones de progesterona mayores de 2 ng/ml o a partir del día 14 del ciclo. Además, es necesario medir los niveles séricos de estradiol, progesterona y LH durante cada visita para saber en qué parte del ciclo se encuentra la paciente (Cakmak, 2013; Jochum, 2019).

El número total de ovocitos obtenidos, de ovocitos maduros y las tasas de fecundación son similares a los obtenidos mediante un protocolo convencional en los primeros días del ciclo. Ocurre lo mismo con las tasas de gestación y las de implantación. El único inconveniente de este tipo de protocolos es que la duración de la estimulación es mayor precisando mayor cantidad de gonadotropinas que los protocolos estándar (Remohí, 2018).

Protocolo *Random-Start*

- En fase folicular tardía:** se comienza con 225 UI de rFSH si el tamaño de los folículos secundarios es menor de 12 mm y se mantiene antes de un aumento espontáneo de la LH. Después del pico de LH cuando los folículos alcanzan los 12 mm se inicia el antagonista de GnRH. Si alcanzan los 12 mm antes del aumento espontáneo de LH, se inicia la supresión hipofisaria con el antagonista GnRH. Cuando al menos dos folículos alcanzan 18 mm se desencadena la ovulación con hCG-r (5000 UI) o agonista de GnRH (0,1 mg) (Cakmak, 2013). La aspiración del folículo se realiza 34-36 h después del desencadenante y los ovocitos son criopreservados en metafase II o fertilizados mediante ICSI con la criopreservación de los embriones (Dahhan, 2017). (Figura 16)

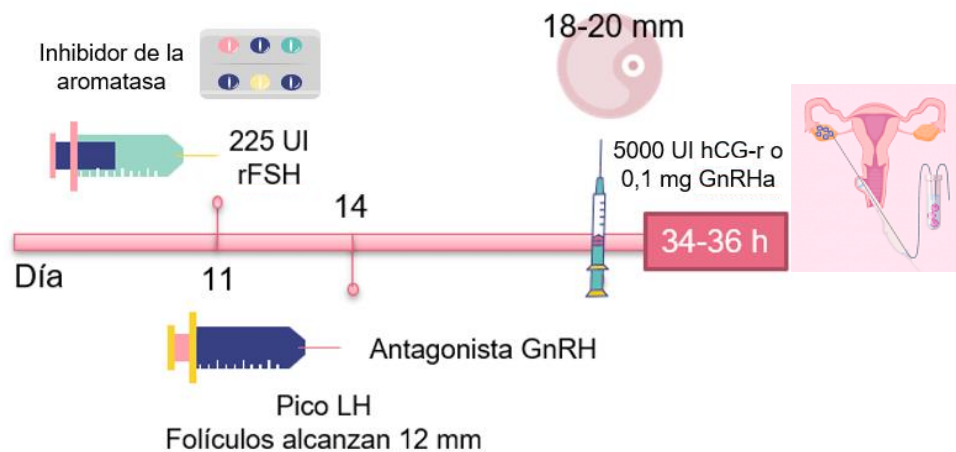


Figura 16. Protocolo de estimulación ovárica en fase folicular basado en (Cakmak, 2013).

- En fase lútea:** la ovulación se induce con hCG-r (5000 UI) o agonista de GnRH (0,1 mg) cuando el folículo dominante alcanza 18 mm de diámetro y la estimulación ovárica se inicia 2-3 días después. La administración de antagonistas de GnRH se inicia cuando los folículos secundarios alcanzan los 12 mm, para prevenir un pico prematuro de LH (Cakmak, 2013). Cuando al menos dos folículos alcanzan 18 mm se desencadena la segunda ovulación con hCG-r (5000 UI) o GnRH

(0,1 mg) y la aspiración del folículo se realiza 34-36 h después. Los ovocitos son criopreservados o fertilizados (Dahhan, 2017; Vaiarelli, 2018). (Figura 17)

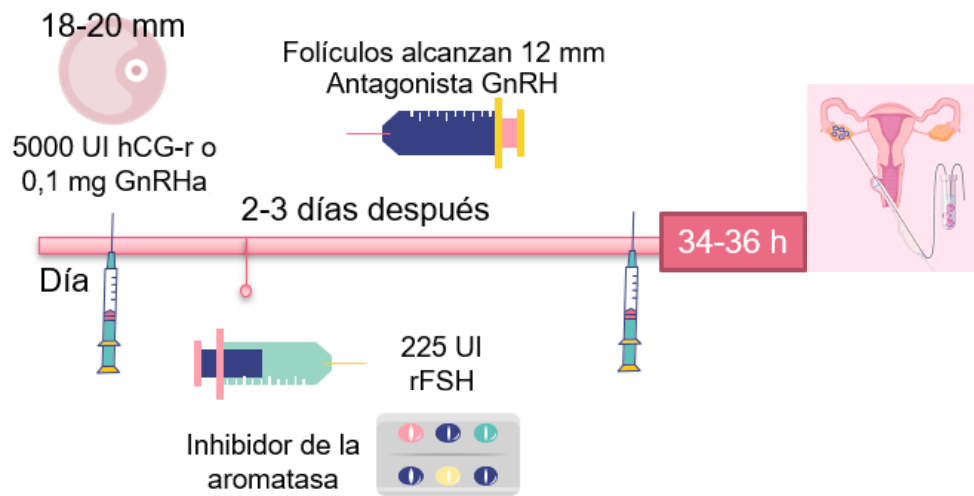


Figura 17. Protocolo de estimulación ovárica en fase lútea basado en (Cakmak, 2013).

Protocolo DuoStim (doble estimulación en el mismo ciclo ovárico)

Este protocolo se utiliza en el caso de pacientes que presentan una baja respuesta en el primer ciclo de estimulación. Combina la estimulación convencional en fase folicular con la estimulación en fase lútea. Primero se realiza un protocolo de estimulación estándar y después de la recuperación de los ovocitos se realiza una segunda estimulación ovárica generalmente con dosis bajas de FSH (75-150 UI/día) y citrato de clomifeno (25-100 mg/día) o letrozol (2,5-5 mg/día) hasta que los folículos midan 13 mm. Cuando al menos dos folículos alcanzan 18 mm se desencadena la maduración con hCG (5000 UI) o GnRHα (0,1 mg). Se recomienda tomar 600 mg de ibuprofeno tras el desencadenante y al día siguiente cada 8 horas (Zhang, 2015; Vaiarelli, 2018). La aspiración del folículo se realiza 34-36 h después del desencadenante y los ovocitos son criopreservados o fertilizados (Dahhan, 2017). (Figura 18)

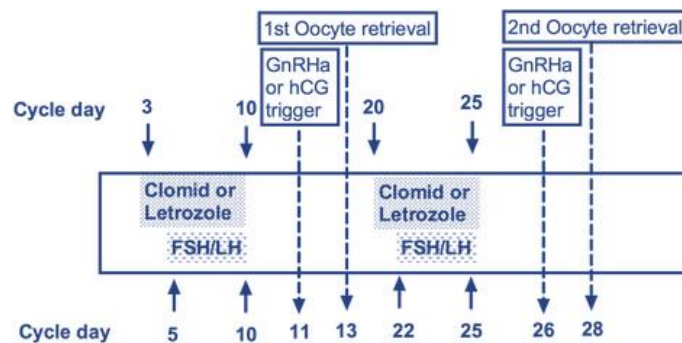


Figura 18. Protocolo doble estimulación (Luo, 2020).



4) Resultados

Existe controversia entre la utilización de hCG o GnRHa como desencadenante de la maduración final. Esto es debido al riesgo de síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO) que es una situación que se produce durante la fase lútea y que se caracteriza por crecimiento ovárico persistente, acumulación de líquido en las cavidades recubiertas del mesotelio, en particular pelvis y abdomen, y desequilibrio hídrico secundario. Generalmente, se presenta como una complicación por la administración de hCG (Remohí, 2018) y puede producir un retraso del inicio de la quimioterapia. Además, otro inconveniente del tratamiento con hCG es que puede dar una prueba de embarazo positiva, lo que también puede retrasar el inicio del tratamiento oncológico (Oktay, 2010). Los metaanálisis más recientes hablan de un riesgo de SHO relativo mayor de 3,79 cuando se utiliza hCG como desencadenante y muestran que con el uso de GnRHa la incidencia es menor (Remohí, 2018).

Uno de estos estudios evaluó la seguridad del protocolo COST-LESS para pacientes con cáncer de mama utilizando los dos desencadenantes en dos grupos diferentes de pacientes. Los resultados revelaron que el número medio total de ovocitos recuperados fue similar con GnRHa y hCG (16.4 ± 10.3 y 12.8 ± 7.7 , respectivamente). Sin embargo, el número medio de ovocitos metafásicos II (11.9 ± 6.6 y 7.4 ± 4.9 ; $P < 0,001$), la tasa media de maduración ($77,3 \pm 21,1$ % y $68,5 \pm 23,3$ %; $P = 0,049$) y la tasa media de fertilización fue mayor en el grupo GnRHa ($84,1 \pm 11,1$ % y $74,0 \pm 24,9$ %; $p = 0,027$). Además, también indujo una mayor supresión de la producción de estrógenos que hCG lo que indica que se trata de un protocolo más seguro para cánceres hormonodependientes como el cáncer de mama (Oktay, 2010).

Por otro lado, se han comparado los resultados del protocolo COST-LESS en pacientes con cáncer de mama y un protocolo convencional para cáncer no hormonodependiente. La duración media de la estimulación es similar, al igual que las dosis de gonadotropinas y el número total de ovocitos obtenidos. Sin embargo, las concentraciones de estradiol fueron superiores en el caso de cáncer no dependiente de hormonas lo que demuestra la efectividad del protocolo COST-LESS, donde se incorpora un inhibidor de la aromatasa que reduce el pico de estradiol, además de antagonistas de GnRH y un análogo de GnRH para la inducción de la ovulación (Checa Vizcaíno, 2012).

También se han comparado los resultados del protocolo *Random-start* en fase folicular y fase lútea y hasta ahora habían sido similares. Sin embargo, recientemente en un estudio retrospectivo que incluía 100 pacientes, 20 estimuladas en la fase lútea y 80 en la fase folicular, se han observado diferencias. Se obtuvo un mayor número de ovocitos maduros en fase lútea en comparación con la estimulación en fase folicular ($13,1 \pm 8,0$ vs $9,2 \pm 5,8$]; $p = 0,01$) y un mayor rendimiento total (16.8 ± 9.3 vs 11.8 ± 7.3]; $p = 0.01$). Pero las dosis de gonadotropinas y la duración media de la estimulación fueron similares. Por tanto, los resultados sugieren que la estimulación lútea es tan efectiva e incluso mejor que la estimulación de fase folicular en cuanto al número de ovocitos maduros recuperados. De hecho, el rendimiento folicular maduro y total obtenido al finalizar la estimulación fue significativamente mayor en la fase lútea en comparación con la fase folicular (Jochum, 2019).



En cuanto a la comparación entre el protocolo *Random-start* y el convencional se han publicado pocos estudios y los resultados han sido contradictorios. Un metaanálisis estableció que cuatro estudios han concluido que no hay diferencia significativa entre los dos protocolos, mientras que en seis estudios los ciclos de inicio aleatorio requerían dosis más altas de gonadotropina y estimulaciones más largas que los ciclos de inicio convencionales. Por otro lado, dos estudios han concluido que los ciclos de inicio aleatorio producen más ovocitos totales que los ciclos de inicio convencional, y un estudio que los ciclos de inicio aleatorio producían un mayor número de ovocitos maduros (Alexander, 2021). Por lo que podemos concluir que, de momento, ambos protocolos están aceptados, basando la elección en el tiempo disponible.

3. CRIOPRESERVACIÓN DE OVOCITOS Y EMBRIONES

En la década de 1940 se descubrió que el glicerol podría proteger al espermatozoide de daños durante la criopreservación y descongelación y en 1953 se consiguió el primer nacimiento humano a partir de espermatozoides congelados. Las mejoras en las tecnologías de reproducción durante las décadas posteriores condujeron al primer nacimiento humano a partir de un embrión congelado en 1984, y dos años más tarde al primer nacimiento humano de un ovocito congelado (Technology, 2013; Sciorio, 2020).

La vitrificación tiene lugar cuando una solución con elevada concentración de solutos se somete a bajas temperaturas y al enfriamiento ultra-rápido para solidificar la célula en un estado similar al vidrio, almacenándola directamente en nitrógeno líquido (hasta -239°C /minuto) (Remohí, 2018). Se aplica actualmente a la criopreservación de ovocitos, embriones y tejido ovárico y se ha convertido en la estrategia de oro para la preservación de la fertilidad ya que no precisa cirugía y utiliza protocolos de estimulación ovárica altamente probados (Technology, 2013).

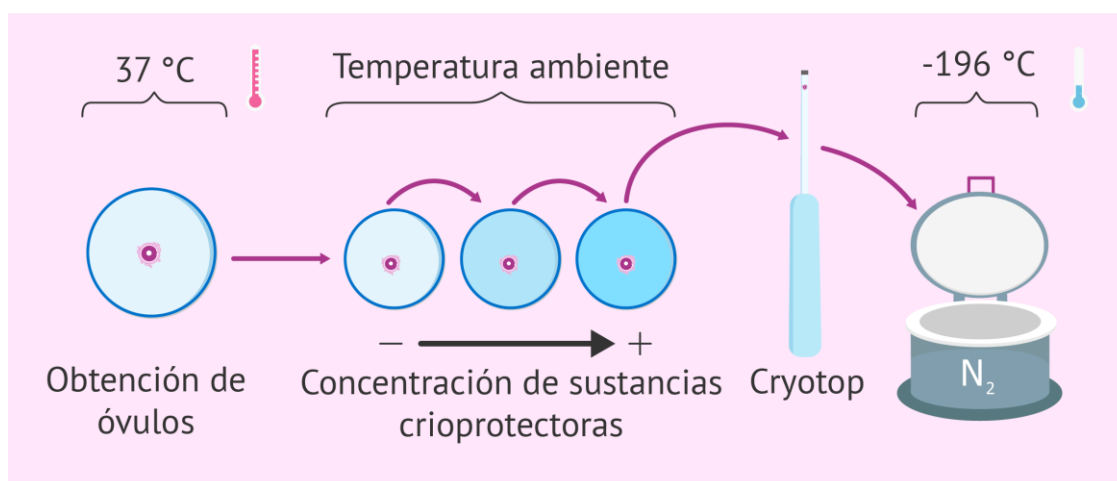


Figura 19. Vitrificación de ovocitos (reproducción asistida.org).

Las altas concentraciones de crioprotectores, como etilenglicol (EG) y dimetilsulfóxido (DMSO), se asocian a mayores niveles de toxicidad y lesiones osmóticas (Tao, 2008). Para minimizar estas lesiones una buena estrategia es la combinación de ambos crioprotectores y la disminución de las concentraciones que requiere altas velocidades de enfriamiento. Todo esto ha sido posible gracias a la reducción al máximo del volumen de solución utilizando un soporte de mínimo volumen como el Cryotop ($0,1\ \mu\text{L}$) (Remohí, 2018).

1) Criopreservación de ovocitos (CO)

Los ovocitos que van a ser criopreservados se obtienen gracias a la estimulación ovárica que permite obtener el número máximo de ovocitos posibles en una sola punción, ya que se precisan entre 12 y 20 ovocitos para un 80 % de posibilidades de gestación (Calonge, 2016).



La punción ovárica se realiza mediante una aguja ecoguiada y acoplada a un tubo estéril con heparina, que aspira el líquido folicular que contiene los folículos ováricos. El tubo se mantiene a 37 °C durante todo el proceso y los ovocitos seleccionados para vitrificar son los que mantienen el cúmulo ovocitario (ovocito envuelto por células de la granulosa) (Rodríguez., 2016).

La lesión por enfriamiento es el principal obstáculo y puede afectar a la membrana, los microtúbulos, la organización citoesquelética y la zona pelúcida provocando endurecimiento que puede afectar a la penetración del espermatozoide, lo cual puede solucionarse empleando ICSI. Además, la vitrificación-desvitrificación puede dar lugar a fragmentación del ADN, daños a los orgánulos intracelulares y riesgos epigenéticos (Tao, 2008; Sciorio, 2020). A pesar de todo esto, esta técnica presenta buenos resultados de supervivencia tras desvitrificación, tasas de fecundación, implantación y embarazo siendo la técnica más eficiente hasta el momento (Calonge, 2016).

2) Criopreservación de embriones

Hasta hace poco era la única técnica para la preservación de la fertilidad porque presentaba mayores tasas de supervivencia vitrificación-desvitrificación. Sin embargo, se ha demostrado que las tasas de embarazo y recién nacido vivo (RNV) son comparables a las de vitrificación de ovocitos (Calonge, 2016; Remohí, 2018). Esta técnica está indicada para pacientes mayores de 18 años y con pareja, aunque también se puede optar por semen de donante (Calonge, 2016).

En este caso, después de la punción folicular de la paciente se procede a la fecundación de los ovocitos obtenidos mediante ICSI. Para ello, primero se realiza la decumulación de los ovocitos, es decir, la pérdida del cúmulo rico en ácido hialurónico que rodea al ovocito mediante hialuronidasa. Después se eliminan mecánicamente las células de la granulosa y se seleccionan los ovocitos maduros (detenidos en metafase II) mediante un microscopio invertido. Luego se seleccionan los espermatozoides y se procede a la microinyección en una placa de ICSI con ayuda del microscopio invertido. Entonces se incuba cada cigoto por separado a 37 °C, 5-6 % de CO₂ y en 40 µL de medio de cultivo basado en soluciones acuosas estériles con los nutrientes necesarios para su crecimiento y cubierto con una gota de aceite mineral. Un sistema automático evalúa su crecimiento para la selección embrionaria. Por último, se seleccionan los embriones que hayan realizado la 4ª ronda de divisiones mitóticas y adquiere el estadio de mórula (8 células) en el 4º día de desarrollo (Rodríguez., 2016).

En países como Estados Unidos la mayoría de las clínicas de fertilidad prefieren conservar embriones, mientras que en países como Alemania o Suiza la ley no permite su criopreservación (Alexander, 2021). Además, es importante destacar que el uso posterior de los embriones requerirá el consentimiento tanto de la paciente como de su pareja, lo que puede resultar en un problema si la relación no continúa en el momento de implantación (Sciorio, 2020). Por otro lado, también surgen preguntas sobre la necesidad de crear embriones existiendo la posibilidad de que la paciente no supere la enfermedad (Remohí, 2018).



3) Resultados

El estudio retrospectivo más grande hasta la fecha ha sido realizado por el Instituto Valenciano de Infertilidad con 6362 mujeres que se sometieron a preservación de la fertilidad entre 2007 y 2018. En éste, se compararon las tasas de nacido vivo de mujeres que se sometieron a la preservación de la fertilidad por la edad (EFP) o por tratamiento oncológico (Onco-FP). La mayoría de los pacientes del grupo Onco-FP fueron diagnosticados con cáncer de mama (64,6 %), seguidos por mujeres afectadas por linfoma de Hodgkin (11,6 %) y linfoma no Hodgkin (5,2 %). Mientras que EFP ha crecido más de un 20 % desde que comenzó el programa, en el caso de Onco-FP la tendencia se ha mantenido en un 1-2 % desde entonces (Cobo, 2018).

El protocolo antagonista más el protocolo letrozol fue el más utilizado en el grupo Onco-FP (72,8 %) siendo el número de ovocitos recuperados y vitrificados por ciclo mayor con el protocolo antagonista. Como era de esperar, el recuento de folículos antrales (AFC) fue menor en los pacientes EFP ya que la edad media era mayor, aunque fue comparable con pacientes de la misma edad con cáncer. Por otro lado, se empleó más tiempo para la estimulación en el caso de las pacientes EFP ya que no tenían ningún tratamiento que retrasar como las Onco-FP (13,9 vs. 11,1; $P < 0,0001$). Se recuperaron más ovocitos en las pacientes Onco-FP, pero la tasa de retorno fue menor (7,4 vs. 12,1 %). En total, hubo 115 (EFP) y 18 (Onco-FP) nacimientos y el 24,8 % y 21 %, respectivamente, volvieron para la transferencia de embriones sobrantes de los cuales nacieron 47 y 7 bebés más. La tasa acumulada de embarazo clínico (CPR = 65,9 vs. 42,8 %), la tasa acumulada de embarazo en curso (COPR = 57,7 % vs. 35,7 %) y la tasa acumulada de nacimiento vivo (CLBR 68,8 % vs. 42,1 %) fueron estadísticamente más altos para los pacientes EFP de 35 años que para las mujeres Onco-FP. Por el contrario, en el grupo de mayor edad (mayores de 35 años) los resultados fueron comparables entre ambos grupos. Y como era de esperar, los pacientes más jóvenes obtuvieron mejores desenlaces que los de mayor edad al realizar comparaciones intragrupo (Cobo, 2018).

Como podemos comprobar en la [figura 20](#) las curvas llegaron antes a la meseta para las pacientes mayores de 35 años obteniendo peores resultados en comparación con las jóvenes en ambos grupos. Por ejemplo, CLBR se duplicó cuando se utilizaron 8 ovocitos en pacientes EFP ≤ 35 años (32 %), mientras que el aumento fue menor en el caso de las pacientes mayores de 35 años. Las pacientes EFP más jóvenes, alcanzaron la meseta con 24 ovocitos con una tasa de éxito del 94,4 %; sin embargo, en el caso del grupo Onco-FP se alcanzó con la mitad de ovocitos y la tasa de éxito fue menor. Además, las curvas de los grupos Onco-FP prácticamente se solaparon y no se observaron diferencias estadísticas en el CLBR. Estos resultados lo más probable es que se deban al pequeño tamaño muestral debido a la baja tasa de retorno de las pacientes oncológicas (Cobo, 2018).

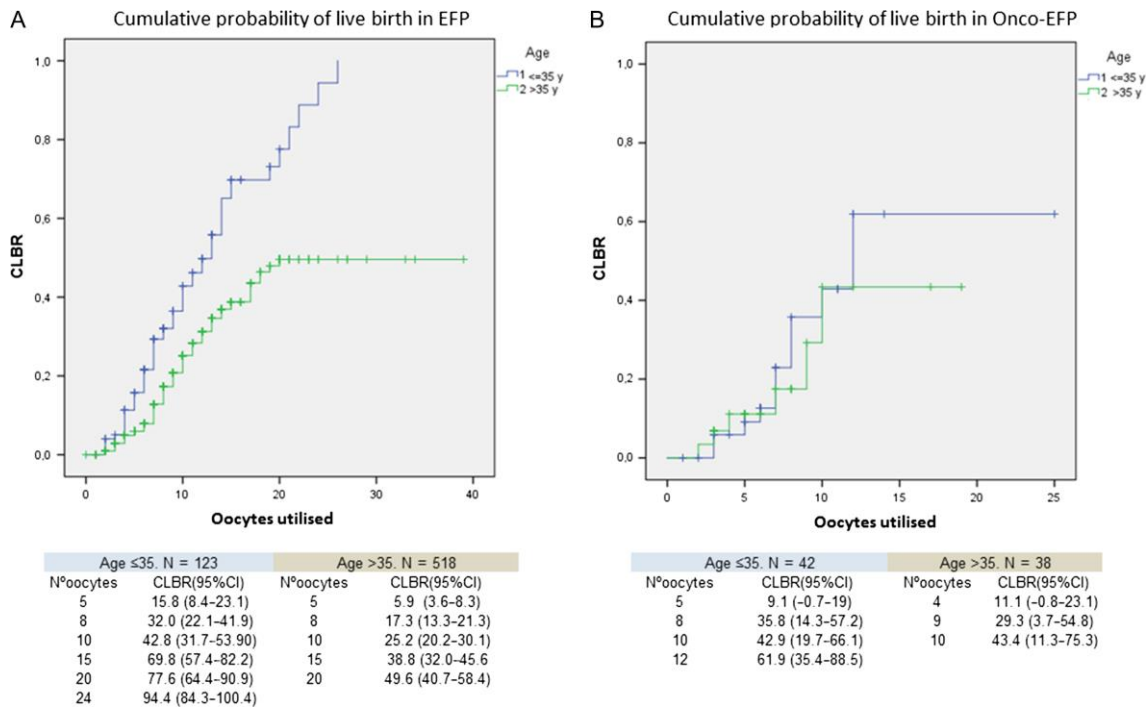


Figura 20. Capacidad acumulada de nacimiento vivo (CLBR) según el número de ovocitos utilizados (Método Kaplan-Meier en SPSS) (Cobo, 2018).

Las tasas de retorno se mantienen bajas principalmente al tiempo necesario para la completa remisión del cáncer, en las pacientes más jóvenes a la mayor probabilidad de que queden embarazadas de forma natural y en las pacientes con cáncer de mama al tratamiento prolongado con tamoxifeno (Cobo, 2018).

Los resultados obtenidos hasta ahora han sido contradictorios; en las revisiones algunos estudios obtienen números de ovocitos similares a los de mujeres sanas y en otros un número menor. Cuando se comparan pacientes con cáncer de mama con pacientes con neoplasias malignas hematológicas, gastrointestinales y sarcomas de tejido blando, la respuesta ovárica es similar. Sin embargo, el número de ovocitos maduros es significativamente menor en pacientes con cáncer de mama en comparación con aquellos con cáncer hematológico, debido a que se trata de un cáncer hormonodependiente y presenta una peor respuesta a la estimulación hormonal (Volodarsky-Perel, 2020).

También se ha evaluado el resultado de la preservación de la fertilidad en pacientes con cáncer de mama en diferentes estadios. Se puede ver que el número de ovocitos recuperados y maduros es similar entre los grupos de estadio bajo y alto, aunque la tasa de fertilización puede ser significativamente menor en el grupo de estadio alto. Lo que demuestra que el cáncer de mama de grado bajo presenta un mejor resultado cuando se realiza la FP que el de grado alto, lo que se asocia con una peor respuesta a la estimulación ovárica. Esto es debido a que el cáncer agresivo se acompaña de infiltración, invasión y destrucción del tejido circundante, causando una reacción inmune y metabólica sistémica que puede implicar metaloproteinasas de matriz, factor de crecimiento tumoral y factor de crecimiento endotelial vascular, las cuales juegan un papel en la proliferación celular folicular, foliculogénesis y maduración de ovocitos (Volodarsky-Perel, 2020).



4. CRIOPRESERVACIÓN DE TEJIDO OVÁRICO

El primer trasplante de tejido ovárico criopreservado se realizó en 1999, aunque el primer nacimiento vivo no se produjo hasta el 2004 (Campbell, 2019). Desde entonces se han registrado más de 130 nacimientos vivos en todo el mundo mediante esta técnica. Sin embargo, los datos del tejido conservado antes de la menarquía son escasos y, de momento, solo se han notificado 2 nacimientos vivos en este grupo de pacientes. Los resultados obtenidos han permitido que a finales de 2019 la *American Society for Reproductive Medicine* dejara de considerar la técnica como experimental (Moussaoui, 2021).

La criopreservación del tejido ovárico (CTO) tiene como objetivo restaurar la fertilidad en las mujeres y las niñas prepuberales que están en mayor riesgo de lesión ovárica y esterilidad debido al tratamiento gonadotóxico (Meirow, 2016), siendo el cáncer de mama una de las indicaciones más importantes en los países occidentales (Sánchez-Serrano, 2009) además de las pacientes que deben someterse a TCMH. El tejido se obtiene por laparoscopia y es extirpado por ooforectomía parcial, unilateral o bilateral. Posteriormente, una vez aislado, el córtex ovárico se escinde en fragmentos de aproximadamente 8 x 4 x 1 mm (Manau Trullás, 2018) y es vitrificado para ser autotrasplantado tras la remisión del cáncer (Varghese, 2008) aunque puede servir como fuente de folículos para la maduración *in vitro*. Los ovocitos inmaduros presentes en el tejido cortical tienen pocos orgánulos, no tienen zona pelúcida y son metabólicamente inactivos e indiferenciados. En comparación con los ovocitos en metafase II son menos sensibles al daño de criopreservación ya que también son más pequeños (Tao, 2008; Varghese 2008).

Según la *International Society for Fertility Preservation* (ISFP) es la primera elección para la preservación de la fertilidad cuando se cumplen los siguientes puntos:

1. Paciente menor de 37-38 años.
2. Paciente de cáncer pediátrico que no tienen otras opciones ya que la estimulación ovárica no es posible.
3. Paciente con función ovárica premenopáusica.
4. Cuando no se indica la vitrificación de embriones o de ovocitos porque no se permite la estimulación hormonal ni el retraso del tratamiento del cáncer.
5. Paciente con alto riesgo de POI después de la quimioterapia

Además, se exigen una serie de requisitos:

1. Consentimiento informado de pacientes adultos.
2. Consentimiento informado de padres/tutores, así como consentimiento informado de menores, si el paciente tiene menos de 18 años.
3. Paciente física y mentalmente preparada para la cirugía.
4. Deseos de tener un hijo en el futuro, preferiblemente antes de los 50 años.
5. Comprender los riesgos potenciales de la transmisión células cancerígenas.



La principal ventaja de esta técnica es que no necesita estimulación ovárica, por lo que el tratamiento antineoplásico no se retrasará y después del trasplante, en el 95 % de los casos, se reanuda la actividad ovárica normal con una duración media de 4-5 años (Campbell, 2019). Además, al tratarse de autotrasplante no es necesaria la inmunosupresión. Su principal limitación es la posibilidad de reintroducción de células cancerígenas. En el caso de los linfomas y cáncer de mama el riesgo es bajo, siendo las leucemias y los neuroblastomas los de mayor riesgo (Figura 21), por lo que no se indica en estos casos (Manau Trullás, 2018). Otro inconveniente tiene que ver con la vida útil del trasplante, la aparición de adherencias y/o daño isquémico en los folículos hasta que se desarrolla la neovascularización (Tao, 2008). Estudios recientes muestran tasas de embarazo tras reimplantación cercanas al 30 % y tasas de nacidos vivos de un 23 % (Campbell, 2019).

RIESGO ELEVADO (>11%)	RIESGO MODERADO (0,2-11%)	RIESGO BAJO (<0,2%)
Leucemia	Cáncer de mama - Estadio IV - Lobular infiltrante	Cáncer de mama - Estadio I-II - Ductal infiltrante
Neuroblastoma	Cáncer de colon	Carcinoma escamoso de cuello
Linfoma de Burkitt	Adenocarcinoma de cérvix	Linfoma de Hodgkin
	Linfoma no Hodgkin	Carcinoma osteogénico
	Sarcoma de Ewing	Rabdomiosarcoma no genital
		Tumor de Wilm's

Ilustración 21. Riesgo de transmisión de células malignas (Manau Trullás, 2018).

El trasplante de los fragmentos de tejido ovárico puede ser ortotópico o heterotópico. El ortotópico se realiza en la cavidad pélvica sobre la médula contralateral y permite la posibilidad de lograr un embarazo de forma natural si las trompas de Falopio permanecen intactas o por fecundación *in vitro* (FIV). El heterotópico se realiza fuera de la cavidad peritoneal, por ejemplo, en tejido subcutáneo y solo se ha descrito un embarazo mediante este trasplante (Donnez, 2013; Remohí, 2018).

1) Resultados

Un estudio realizado por España, Bélgica y Alemania evaluó 60 trasplantes ortotópicos. Observaron una restauración de la función ovárica en el 93% de los casos. En tres de los casos de la serie belga, la actividad no se recuperó porque no había folículos presentes en el tejido descongelado, lo que indica la necesidad de evaluar la densidad folicular antes del trasplante. El tiempo desde la reimplantación hasta la recuperación de la respuesta ovárica fue entre 3,5 y 6,5 meses, siendo más largo para los casos en los que se había recibido quimioterapia antes de la biopsia para la criopreservación. Además, más del 50% de las pacientes fueron capaces de concebir naturalmente y se comprobó que la edad de la paciente en el momento de la criopreservación del tejido es un factor predictivo ya que la mayoría de mujeres embarazadas tenían menos de 30 años (Donnez, 2013).

Otro estudio comparó la eficacia de la criopreservación de ovocitos (CO) y tejido ovárico (CTO) en pacientes sometidas a tratamientos gonadotóxicos. El grupo CO incluyó 1024 pacientes y el grupo CTO

800 siendo la cohorte comparada más grande hasta el momento. Los pacientes sometidos a CTO eran más jóvenes, pero no se vio diferencia significativa al evaluar la reserva ovárica. Las patologías más frecuentes fueron el cáncer de mama (CO, 60,3 %; CTO, 53,9 %) y el linfoma de Hodgkin (CO, 14,2 %; CTO, 19,9 %). La tasa de retorno fue mayor en las pacientes CTO (6,2 %) en comparación con las pacientes CO (4,8 %) y también fue mayor el tiempo medio de almacenamiento para el tejido ovárico. El 93,2% de los pacientes que volvieron para el autotrasplante del tejido ovárico recuperaron la función ovárica tras 3 meses y casi la mitad concibieron de forma natural. La tasa de recién nacido vivo (RNV) después de la transferencia de ovocitos fue del 32,6% y 18,2 % tras el reimplante del tejido ovárico. Además, en el 28,6 % de las pacientes se produjeron abortos espontáneos después de la concepción natural y en el 37,5 % después de FIV. Esto podría deberse a que la transferencia o autotrasplante puede producir una foliculogénesis disfuncional y una asincronía entre las células de la granulosa y el ovocito que puede alterar su morfología, lo que disminuye la tasa de maduración y de fertilización (Díaz-García, 2018).

2) Transferencia de células malignas

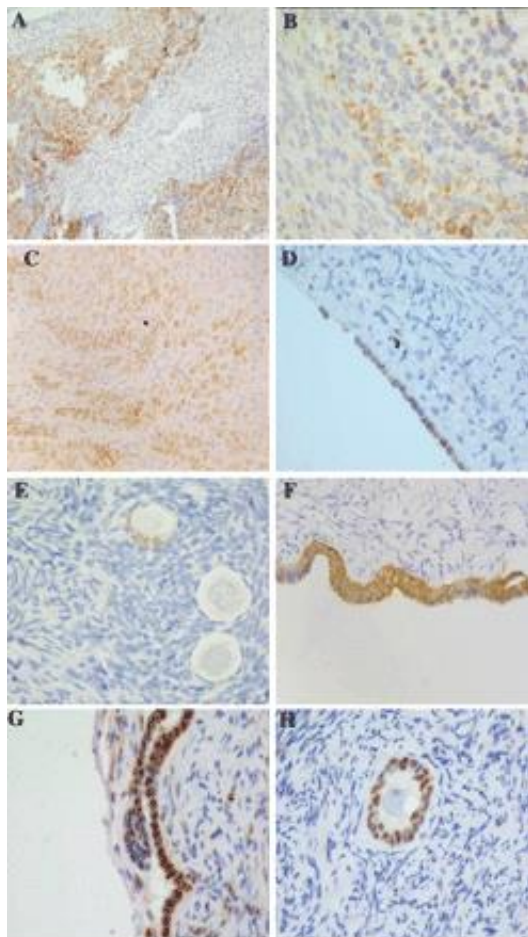


Figura 22. MGB1 +en células lúteas (A) y de la teca (B) grandes glóbulos intracitoplásmicos. GDFP-15 + en células lúteas (C) y epitelio de la superficie (D). CAM 5.2 + con un patrón intracitoplasmático difuso en células granulosas (E) y en el epitelio de superficie (F). WT1 + en epitelio de superficie (G) Y y células granulosas (H) (Sánchez-Serrano, 2009).

Uno de los inconvenientes del autotrasplante de tejido ovárico criopreservado es el riesgo de reintroducción de células cancerosas, siendo los casos de linfoma y cáncer de mama de bajo riesgo y los casos de leucemia los de riesgo mayor, ya que las células malignas pueden estar presentes en el torrente sanguíneo. En la actualidad, existen numerosos estudios que lo verifican.

Por un lado, en un estudio de 100 biopsias de tejido ovárico criopreservado realizado por el Instituto Valenciano de Infertilidad buscaron células metastásicas en pacientes de cáncer de mama en estadio temprano, ya que era el principal indicador de la preservación de la fertilidad. El estudio histológico consistió en una tinción hematoxilina eosina y una tinción inmunohistoquímica con cuatro marcadores: *Gross Cystic Disease Fluid Protein-15* (GCDFP15), un marcador específico del cáncer de mama que se expresa en el 77 % de los carcinomas, Mamaglobina-1 (MGB1), que sirve como marcador diferencial, citoqueratina de bajo peso molecular (CAM 5.2), un marcador universal de epitelio y el antígeno tumoral de Wilms-1 (WT1) que es específico del tejido ovárico y está ausente en el cáncer de mama. Éste último es

añadido para verificar el resultado ya que la reacción positiva GCDFP15 tiene una especificidad del 99%, pero la reacción negativa no es concluyente. Una reacción negativa para GCDFP15 unida a un positivo para WT1 proporciona casi 100% especificidad y sensibilidad. Los resultados del estudio fueron: 24% biopsias positivas para MGB1 (Figura 22 A y B); 21 % positivas para GCDFP15 (Figura 22 C y D); 90% positivas para CAM 5.2 y 100 % positivas para WT1. Por lo tanto, estos resultados respaldan la hipótesis de que la transferencia de tejido ovárico en pacientes con cáncer de mama en estadio temprano es segura, pero no se puede descartar que en estadios más avanzados no exista transferencia (Sánchez-Serrano, 2009).

Por otro lado, en otros estudios las neoplasias hematológicas son las más comunes donde el linfoma de Hodgkin (HL) es el más frecuente, seguido de la leucemia y el linfoma no Hodgkin (NHL) (Dolmans, 2013). Actualmente, los estudios realizados se basan en la detección de micrometástasis mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Uno de los primeros en detectar células malignas en tejido ovárico criopreservado de pacientes con neoplasias hematológicas fue el de Meirow y colaboradores (2008), donde se evaluó histológicamente la presencia de células cancerosas en el tejido ovárico descongelado de 56 pacientes, dos de ellas con leucemia mielógena crónica (LMC) y las restantes con HL y NHL. Éste consistió en la tinción mediante hematoxilina eosina; una tinción inmunohistoquímica con marcadores específicos para detectar las células *Reed-Sternberg* características de HL, anti-CD30 y anti-Ki67; y en la búsqueda de marcadores moleculares de células B y T en NHL y en LMC mediante PCR en tiempo real. En el caso de HL la tinción fue negativa para células *Reed-Sternberg* en tejido ovárico criopreservado y en el caso de NHL el análisis se basó en la detección de reordenamientos en las células T y B, siendo negativa la PCR tanto para el receptor de células T como para células B. Sin embargo, en LMC en una de las pacientes el resultado de la PCR cuantitativa en tiempo real fue positivo para la detección del cromosoma Philadelphia BCR-ABL, característico de esta enfermedad (Figura 23) (Meirow, 2008).

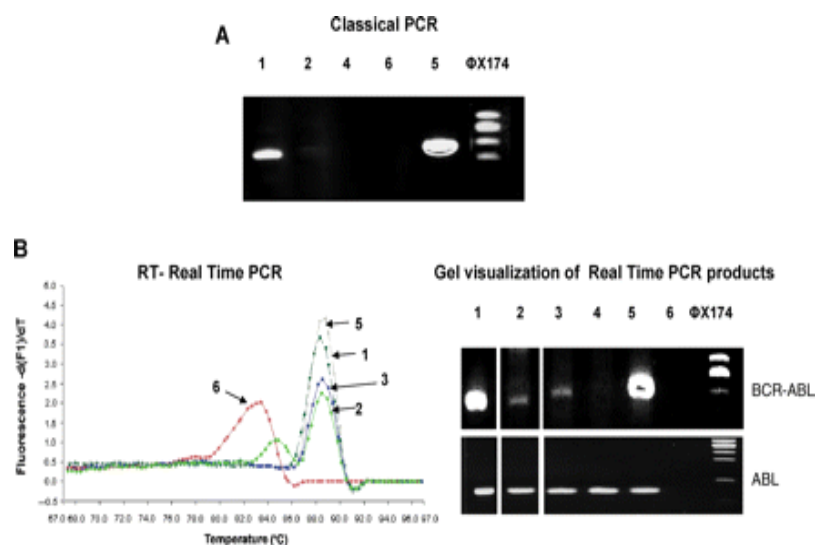


Figura 23. (A) PCR convencional negativa. (B) RT-PCR para el ARNm de BCR-ABL que indica la presencia del cromosoma Philadelphia en tejido ovárico de una paciente con LMC. 1, médula ósea; 2, ARNm de biopsia de ovario recolectado; 3, ARNm de biopsia de ovario descongelado; 4, muestra negativa; 5, células de control positivo con translocación; 6, control negativo; Φ X174, marcador de tamaño (Meirow, 2007).



Además, un análisis retrospectivo realizado en Japón ha revelado que los ovarios están comprometidos en el 8,7 % de los casos de leucemia mediante la autopsia de más de 5.000 pacientes. Y recientemente, un estudio belga y danés detectó la presencia de células malignas en tejido ovárico en el 33 y 70 % de los pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) y leucemia linfoblástica aguda (LLA) que sólo se habían sometido a un ciclo de quimioterapia, pero han demostrado mediante el xenotrasplante de tejido ovárico humano de pacientes en remisión en ratón que no se produce transferencia. Sin embargo, todavía no hay estudios en humanos que apoyen esto (Dolmans, 2013).

Con todo esto, podemos concluir que los resultados obtenidos hasta ahora respaldan la seguridad del autotrasplante de tejido ovárico en los casos de cáncer de mama en estadio temprano y linfomas, pero existe un elevado riesgo de transferencia de células cancerígenas en las pacientes con leucemia.



5. OTRAS TÉCNICAS

1) Maduración *in vitro* de ovocitos inmaduros (MIV)

El primer nacimiento vivo humano con esta técnica se registró en 1991 (Walls, 2018) y consiste en madurar *in vitro* ovocitos inmaduros obtenidos tras punción de pequeños folículos secundarios o antrales no estimulados mediante su cultivo (Remohí, 2018). También puede ser un método adicional o complementario a la criopreservación de tejido ovárico (Calonge, 2016). Está indicada para pacientes en los que no se recomienda estimulación (tumores hormonodependientes o lupus eritematoso sistémico) o cuando no se puede retrasar la quimioterapia (Remohí, 2018).

El procedimiento de recolección de los ovocitos inmaduros es más difícil debido al tamaño reducido de los folículos. Los ovocitos obtenidos se mantienen en medios de cultivos de maduración, durante un periodo de 24-48 h, que contienen LH recombinante, hCG y albúmina de suero humano (HSA) donde se encuentran factores de crecimiento y aminoácidos esenciales para el crecimiento. El medio previene la asincronía entre la maduración del citoplasma y el núcleo y también se puede emplear aditivos hormonales como FSH que ayudan en la expansión del cúmulo que rodea al ovocito maduro y aumentan las tasas de implantación. Las tasas de maduración obtenidas hasta el momento varían entre el 65 y 80% (Walls, 2018) y los ovocitos obtenidos pueden ser transferidos o criopreservados, o se pueden obtener embriones mediante ICSI que también pueden transferirse o criopreservarse.

Las ventajas de esta técnica son: reduce el riesgo de transmisión de células cancerosas en neoplasias malignas hematológicas o cáncer de mama (Varghese, 2008; Calonge, 2016; Campbell, 2019), no requiere de estimulación ovárica evitando el riesgo de SHO (Calonge, 2016), evita la necesidad de reimplantación del tejido ovárico (Tao, 2008) y que los ovocitos inmaduros soportan mejor la vitrificación (Tao, 2008; Calonge, 2016). Sin embargo, las tasas de gestación y de implantación son bajas y las de aborto altas, por lo que todavía supone un desafío a largo plazo (Remohí, 2018).

2) Transposición ovárica u ooforopexia

La transposición ovárica o ooforopexia se describió por primera vez en 1958 (Campbell, 2019) y consiste en posicionar a los ovarios en una localización alejada de la zona a irradiar, mediante laparoscopia, para evitar su daño por la radioterapia (Calonge, 2016; Remohí, 2018). Para esta técnica, los pedículos vasculares, que son las conexiones entre el útero y el ovario, se dividen y el ovario se coloca fuera del campo de radiación. Dependiendo de la zona irradiada se puede colocar en la pared lateral abdominal por encima del borde pélvico, en la parte superior de la cavidad peritoneal o detrás del útero, como en el caso de pacientes con HL (Manau Trullás, 2019; Remohí, 2018; Campbell, 2019). Está indicada para las pacientes que requieran radioterapia pélvica sin quimioterapia, o bien con quimioterapia de muy baja gonadotoxicidad (Manau Trullás, 2018) y es compatible con otras técnicas como criopreservación del tejido ovárico y/o ovocitos (Remohí, 2018). El alcance del daño ovárico por radioterapia depende de la



edad de la paciente, la dosis total de radiación, el volumen tratado y el programa de fraccionamiento (Campbell, 2019).

La principal desventaja es que utiliza cirugía y las posibles complicaciones derivadas de ella como el riesgo de torsión ovárica, lesión de estructuras adyacentes o quistes. Sin embargo, el riesgo de metástasis es muy bajo (Manau Trullás, 2018). La eficacia es variable, entre un 16 y un 90 % de las pacientes recuperan la función ovárica (Remohí, 2018) y hasta un 50 % pueden conseguir gestaciones espontáneas (Calonge, 2016). En 2014 un metaanálisis indicó que la función ovárica se recuperó en el 95 % de los casos con cáncer de cérvix, sin embargo, sólo se recuperó un 65 % en los casos de linfomas. Esto no es concluyente ya que sólo hubo 4 casos de linfomas, por lo que son necesarios más estudios (Manau Trullás, 2018). Además, de momento los datos sobre las tasas de nacidos vivos son escasos (Campbell, 2019).



CONCLUSIÓN

A pesar de que la pérdida de la fertilidad en las pacientes oncológicas haya adquirido mayor importancia en la última década sólo un pequeño porcentaje de las pacientes se someten a los tratamientos de preservación de la fertilidad y vuelven para cumplir su deseo genésico. Esto evidencia la dificultad en la toma de decisiones para muchas pacientes. El principal motivo es la complejidad para comprender la preservación de la fertilidad y la falta de un sistema de apoyo, además de la falta de conciencia de sus propios valores y creencias acerca de la reproducción. Debido a esto es muy importante la consulta con un especialista en fertilidad, sobre todo, en las pacientes con limitación de tiempo para el comienzo del tratamiento ya que son las que experimentan mayor estrés en el proceso de toma de decisiones y pueden llegar a perder la oportunidad de preservar su fertilidad (Kim, 2013).

Tras todo lo tratado anteriormente podemos concluir que los principales problemas a los que se enfrenta en la actualidad la preservación de la fertilidad en las pacientes oncológicas son los siguientes:

- La preservación de fertilidad con el objetivo de intentar obtener un embarazo en el futuro en pacientes con enfermedades de pronóstico grave y de futuro incierto en cuanto a supervivencia plantea un problema ético y moral, además del futuro incierto de embriones criopreservados.
- El éxito del tratamiento va a depender de la edad de la paciente, la reserva ovárica, el tipo de enfermedad, el pronóstico del tratamiento en cuanto a riesgo de fallo gonadal, si los ovarios son accesibles, etc.
- El paciente debe ser informado en la mayor brevedad posible y la información debe ser personalizada. Además, la toma de decisiones médicas se debe realizar en conjunto entre el oncólogo de la paciente y el especialista de fertilidad, por lo que es necesaria una buena comunicación entre ambos. En algunos casos la urgencia en la toma de decisiones por parte del paciente puede afectar a su autonomía por la presión ejercida por sus allegados.
- No es posible garantizar que la paciente pueda conseguir la gestación cuando lo desee; sin embargo, es el método más eficaz disponible en la actualidad.
- En países como España o Países Bajos, la preservación de la fertilidad en mujeres con cáncer se considera una asistencia sanitaria básica general (Dahhan, 2017); sin embargo, en otros países como Estados Unidos no está incluida en el seguro médico.
- Existe limitación de tiempo para el inicio del tratamiento contra el cáncer. El tiempo de demora en la aplicación de los tratamientos es uno de los indicadores de calidad más importante a tener en consideración en los protocolos de actuación en las unidades de reproducción humana. Por ello, se necesitan protocolos de actuación que permitan una respuesta rápida a las demandas de tratamiento con eficacia y seguridad.
- El efecto negativo de la estimulación ovárica sobre los tumores hormonodependientes y el riesgo de síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO).



- Existen riesgos quirúrgicos o anestésicos en el autotrasplante del tejido ovárico y transposición ovárica.
- En el caso de MIV se podría obtener un número de ovocitos maduros insuficientes.

Por todo esto, aunque existan algunas limitaciones y en algunos casos los estudios realizados son escasos, los resultados obtenidos hasta el momento equilibran la balanza en favor de la preservación de la fertilidad ya que proporciona una opción real de ser madre tras la remisión del cáncer. Por lo tanto, debe considerarse hacer este tema más accesible y que las pacientes sean capaces de comprender la prevalencia de los beneficios sobre los inconvenientes, sobre todo, debido a la tendencia actual a retrasar la maternidad.



BIBLIOGRAFÍA

- Alexander, V. M. (2021). Ovarian stimulation for fertility preservation in women with cancer: A systematic review and meta-analysis comparing random and conventional starts. *Journal of gynecology obstetrics and human reproduction*, 50(8), 102080. <https://doi.org/10.1016/j.jogoh.2021.102080>
- Badawy, A. E.-A. (2009). Gonadotropin releasing hormone agonists for prevention of chemotherapy-induced ovarian damage: prospective randomized study. *Fertility and sterility*, 91(3), 694–697. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.12.044>
- Berjeb, K. K. (2021). Evaluation of ovarian reserve before and after chemotherapy. *Journal of gynecology obstetrics and human reproduction*, 50(5), 102035. <https://doi.org/10.1016/j.jogoh.2020.102035>
- Blumenfeld, Z. A. (2008). Gonadotropin releasing hormone agonist decreases chemotherapy-induced gonadotoxicity and premature ovarian failure in young female patients with Hodgkin lymphoma. *Fertility and sterility*, 89(1), 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.02.010>
- Brüel, A. C.-J. (2015). *Geneser Histología*. Madrid (España): Editorial médica panamericana.
- Cakmak, H. K. (2013). Effective method for emergency fertility preservation: random-start controlled ovarian stimulation. *Fertility and sterility*, 100(6), 1673–1680. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.07.1992>
- Calonge, R. N. (2016). *Manual de buena práctica clínica en reproducción asistida* (SEF, Ed.)
- Checa Vizcaíno, M. A. (2012). The effects of letrozole on ovarian stimulation for fertility preservation in cancer affected women. *Reproductive biomedicine online*, 24(6), 606–610. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.02.020>
- Cobo, A. G.-V. (2018). Elective and Onco-fertility preservation: factors related to IVF outcomes. *Human reproduction (Oxford, England)*, 33(12), 2222–2231. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey321>
- Dahhan, T. B. (2017). Stimulation of the ovaries in women with breast cancer undergoing fertility preservation: Alternative versus standard stimulation protocols; the study protocol of the STIM-trial. *Contemporary clinical trials*, 61, 96–100. <https://doi.org/10.1016/j.cct.2017.07.009>
- De la Fuente, G. M. (2011). Preservación de la fertilidad en pacientes oncológicas. Cuatro años de experiencia en el grupo IVI. *Reproducción*, 26:62-65
- Díaz-García, C. D.-V. (2018). Oocyte vitrification versus ovarian cortex transplantation in fertility preservation for adult women undergoing gonadotoxic treatments: a prospective cohort study. *Fertility and sterility*, 109(3), 478–485.e2. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.11.018>
- Dolmans, M. M. (2013). Risk of transferring malignant cells with transplanted frozen-thawed ovarian tissue. *Fertility*



- and sterility*, 99(6), 1514–1522.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.03.027>
- Donnez, J. D.-G. (2013). Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: A review of 60 cases of reimplantation. *Fertility and sterility*, 99(6), 1503–1513.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.03.030>
- ISFP Practice Committee, K. S. (2012). Recommendations for fertility preservation in patients with lymphoma, leukemia, and breast cancer. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 29(6), 465–468.
<https://doi.org/10.1007/s10815-012-9786-y>
- Jochum, F. S. (2019). Luteal phase stimulation, the future of fertility preservation? Retrospective cohort study of luteal phase versus follicular phase stimulation. *Journal of gynecology obstetrics and human reproduction*, 48(2), 91–94.
<https://doi.org/10.1016/j.jogoh.2018.11.003>
- Kim, J. D. (2013). Fertility preservation consultation for women with cancer: Are we helping patients make high quality decisions? *Reproductive biomedicine online*, 27(1), 96–103.
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.03.004>
- Lawrenz, B. F. (2012). Reduced pretreatment ovarian reserve in premenopausal female patients with Hodgkin lymphoma or non-Hodgkin-lymphoma evaluation by using antimüllerian hormone and retrieved oocytes. *Fertility and sterility*, 98(1), 141–144.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.04.021>
- Luo, Y. S. (2020). The best execution of the DuoStim strategy (double stimulation in the follicular and luteal phase of the same ovarian cycle) in patients who are poor ovarian responders. *Reproductive biology and endocrinology*, 18(1), 102.
<https://doi.org/10.1186/s12958-020-00655-3>
- Manau Trullás, D. (2018). *Recomendaciones sobre la preservación de la fertilidad en enfermedades hematológicas*. Madrid: YOU & US, S.A.
- Marín, L. V. (2021). Which is the optimal timing for starting chemoprotection with gonadotropin-releasing hormone agonists after oocyte cryopreservation? Reflections on a critical case of ovarian hyperstimulation syndrome. *Journal of gynecology obstetrics and human reproduction*, 50(4), 101815.
<https://doi.org/10.1016/j.jogoh.2020.101815>
- Meirow, D. D. (2007). Cortical fibrosis and blood-vessels damage in human. *Human reproduction*, 22(6), 1626–1633.
<https://doi.org/10.1093/humrep/dem027>
- Meirow, D. H. (2008). Searching for evidence of disease and malignant cell contamination in ovarian tissue stored from hematologic cancer patients. *Human reproduction*, 23(5), 1007–1013.
<https://doi.org/10.1093/humrep/den055>
- Moussaoui, D. B.-P. (2021). Hypergonadotropic hypogonadism after ovarian tissue cryopreservation on a 13-year-old female: A case report and review of the literature. *Journal of gynecology obstetrics and human reproduction*, 50(2), 102029.
<https://doi.org/10.1016/j.jogoh.2020.102029>



- Oktaý, K. T.-W. (2010). GnRH agonist trigger for women with breast cancer undergoing fertility preservation by aromatase inhibitor/FSH stimulation. *Reproductive biomedicine online*, 20(6), 783–788. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2010.03.004>
- Oktem, O. &. (2007). Quantitative assessment of the impact of chemotherapy on ovarian follicle reserve and stromal function. *Cancer*, 110(10), 2222–2229. <https://doi.org/10.1002/cncr.23071>
- Remohí, J. B. (2018). *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana* (5ª ed.). Madrid (España): Editorial médica Panamericana.
- Rodríguez., G. B. (2016). El laboratorio de reproducción asistida. *Reproducción humana y laboratorio clínico*.
- Ross, M. H. (2012). *Texto y atlas color con biología celular y molecular*. Madrid (España): Editorial médica panamericana.
- Ruggeri, M. P. (2019). Fertility concerns, preservation strategies and quality of life in young women with breast cancer: Baseline results from an ongoing prospective cohort study in selected European Centers. *Breast*, 47, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2019.07.001>
- Sánchez-Serrano, M. N.-M.-S. (2009). Malignant cells are not found in ovarian cortex from breast cancer patients undergoing ovarian cortex cryopreservation. *Human reproduction*, 24(9), 2238–2243. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep196>
- Sciorio, R. &. (2020). Fertility preservation and preimplantation genetic assessment for women with breast cancer. *Cryobiology*, 92, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.12.001>
- Campbell, S. B. (28 de November de 2019). An update on fertility preservation strategies for women with cancer. *Gynecologic Oncology*, 156(1):3-5. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2019.11.001>
- Tao, T. &. (2008). Human oocyte and ovarian tissue cryopreservation and its application. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 25(7), 287–296. <https://doi.org/10.1007/s10815-008-9236-z>
- Technology, P. C. (2013). Mature oocyte cryopreservation: A guideline. *Fertility and sterility*, 99(1), 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.09.028>
- Turan, V. B.-W. (2019). Utility of gonadotropin releasing hormone agonists for fertility preservation: Lack of biologic basis and the need to prioritize proven methods. *Journal of clinical oncology*, 37(1), 84–86. <https://doi.org/10.1200/JCO.18.00420>
- Vaiarelli, A. C. (2018). Double stimulation in the same ovarian cycle (DuoStim) to maximize the number of oocytes retrieved from poor prognosis patients: A multicenter experience and SWOT analysis. *Frontiers in endocrinology*, 9, 317. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00317>
- Varghese, A. C. (2008). Cryopreservation/transplantation of ovarian tissue and in vitro maturation of follicles and oocytes: Challenges for fertility preservation. *Reproductive biology and endocrinology*, 6, 47. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-6-47>
- Volodarsky-Perel, A. C. (2020). Influence of stage and grade of breast cancer on fertility



- preservation outcome in reproductive-aged women. *Reproductive biomedicine online*, 40(2), 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2019.11.006>
- Walls, M. L. (2018). In vitro maturation. . *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology*, 53, 60–72. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2018.06.004>
- Zhang, J. (2015). Luteal phase ovarian stimulation following oocyte retrieval: Is it helpful for poor responders? *Reproductive biology and endocrinology*, 13:76. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0076-2>